

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd

**Komplexní morfologická, imunohistochemická, molekulárně
genetická a klinicko patologická analýza vzácných typů
karcinomů ovaria**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Konzultant:

MUDr. Jan Galko

doc. MUDr. Kristýna Němejcová, Ph.D.

Hradec Králové 2022

Bc. Kamila Galko

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádné citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 17. 4. 2022

Poděkování

Tato práce vychází z výsledků výzkumu podpořeného grantem NV19-03-00007.

Abstrakt

Karcinomy ovaria jsou heterogenní skupina onemocnění, skládající se z různých histotypů. Představují nádory s nejvyšší letalitou ze všech nádorů ženských genitálu. V současnosti je přijímáno rozdělení do 5 základních typů: high grade serózní karcinom, low grade serózní karcinom, endometroidní karcinom, světlobuněčný karcinom a mucinózní karcinom. Malé procento tvoří velmi vzácné nádory, např. Brennerův nádor a další.

Jedná se o velmi rozmanitou skupinu onemocnění, s různými prekurzory, morfologií, genetickými změnami, epidemiologickými rysy, klinickými projevy, léčbou a prognózou. Nejvíce prostudovaným karcinomem je high grade serózní karcinom ovaria, s vysokou incidencí (až 70 % karcinomů ovaria). Počet studií věnovaných tomuto typu nádoru se stále zvyšuje. Ostatní uvedené typy nádorů jsou méně časté a kvůli jejich nízké incidenci je počet studií, které se jim věnují, nižší.

Díky rychlému rozvoji cílené léčby je žádoucí zjistit přesné charakterizace jednotlivých nádorů nejen na morfologické úrovni, ale i na úrovni imunohistochemické a genetické. Detekcí neoantigenů v nádoru můžeme nepřímo předpovědět mutační zátěž, hodnotí se i proteiny mismatch repair (MMR) nebo jiné změny vedoucí k chromozomálním aberacím. Na rozdíl od high grade serózního karcinomu jsou u ostatních typů nádorů znalosti genetických změn, mutační zátěže, stavu MMR proteinů a dalších proteinů značně omezené.

Porozumění a ucelení znalostí týkající se vzácných histotypů karcinomu ovaria má diagnostický, prediktivní a prognostický význam, úzce spojený s terapií těchto neoplazií.

Klíčová slova: karcinom ovaria, imunohistochemie, molekulárně genetická vyšetření

Abstract

Ovarian carcinomas are heterogenous group of diseases comprising various histotypes. Ovarian carcinomas as a whole are associated with the highest lethality among the female genital tumors. Currently, 5 main types of carcinomas are recognized: high grade serous carcinoma, low grade serous carcinoma, endometrioid carcinoma, clear cell carcinoma and mucinous carcinoma. Other types, e.g. Brenner tumors, are very rare.

Ovarian carcinomas are very diverse group with various precursors, morphology, genetic aberrations, epidemiologic and clinical, features, therapy and prognosis. The most studied and understood is high grade serous carcinoma with high incidence (up to 70 % of ovarian carcinomas). The number of studies dedicated to this tumor is still increasing. Other types of carcinomas are much less frequent, therefore related studies are rarer.

Due to the rapid development of targeted therapy, it is necessary to evaluate the tumors not only morphologically but also on immunohistochemical and genetic level. Detection of neoantigens may indicate the mutation load of a tumor, it is also possible to evaluate status of mismatch repair (MMR) proteins and other features leading to chromosomal aberrations. In contrast to the high grade serous carcinoma, as for other types of carcinomas, knowledge about their genetic changes, mutation load, status of MMR proteins etc. are considerably limited.

Comprehension of rare types of ovarian carcinomas has diagnostic, predictive, prognostic and therapeutic significance.

Key words: ovarian carcinoma, immunohistochemistry, molecular genetics

Obsah

1. Úvod	7
2. Literární přehled	8
2.1. Morfologie ovaria.....	8
2.2. Histologie ovaria	8
2.3. Klasifikace nádorů ovaria	9
2.3.1. Sex-cord stromální nádory	10
2.3.1.4.1. Smíšené nádory ze Sertoliho a Leydigových buněk.....	11
2.3.2. Germinální nádory	11
2.3.2.1.1. Dysgerminom ovaria	11
2.3.2.1.2. Nádor ze žlutkového vaku	11
2.3.2.1.3. Embryonální karcinom	11
2.3.2.1.4. Non-gestační choriokarcinom.....	12
2.3.3. Epitelové nádory.....	12
2.3.3.1. Epidemiologie.....	12
2.3.3.2. Etiopatogeneze	13
2.3.3.3. Serózní nádory ovaria.....	13
2.3.3.3.1. Benigní serózní nádory	13
2.3.3.3.2. Serózní borderline nádory	13
2.3.3.3.3. Serózní karcinomy	14
2.3.4. Endometroidní nádory ovaria	17
2.3.4.1. Endometroidní karcinom	17
2.3.5. Mucinózní nádory ovaria.....	18
2.3.5.1. Benigní mucinózní nádory	18
2.3.5.2. Mucinózní borderline nádory	18
2.3.5.3. Mucinózní karcinom.....	18
2.3.6. Světlobuněčné nádory ovaria	18
2.3.6.1. Světlobuněčný karcinom	18
2.4. Protilátky pro imunohistochemii.....	21
2.4.1. MMR proteiny	21
2.4.2. Protein p53	21
2.4.3. NTRK.....	22
2.4.4. IMP	23
2.4.5. CD56.....	24
2.4.6. L1CAM.....	24

2.4.7.	Synaptophysin (SYN).....	24
2.4.8.	Chromogranin A	24
2.4.9.	INSM1	25
2.4.10.	CK17.....	25
3.	Cíl práce.....	26
4.	Metodika.....	27
4.1.	Imunohistochemie (IHC).....	27
4.1.1.	Princip imunohistochemie	28
4.1.1.1.	Ruční zpracování IHC	28
4.1.1.2.	Strojové zpracování IHC	29
4.1.1.3.	Zpracování parafinových bloků pomocí TMA Master.....	30
4.2.	Molekulárně genetická analýza	34
4.2.1.	Princip NGS	34
4.2.1.1.	Izolace DNA/RNA	35
4.2.1.2.	Stanovení koncentrace a kvality DNA/RNA.....	36
4.2.1.3.	Postup NGS analýzy DNA Sequence Capture (Somatic)	37
4.2.1.4.	Postup NGS analýzy RNA Sequence Capture (Somatic).....	41
5.	Použitý panel protilátek	42
6.	Výsledky.....	44
7.	Diskuze	50
8.	Závěr.....	54
9.	Zkratky	55
10.	Seznam literatury	58
11.	Seznam grafů a obrázků.....	66

1. Úvod

Nádorová onemocnění jsou velká skupina chorob, která mohou postihnout jakýkoliv orgán. Nádor vzniká v důsledku nekontrolovatelné a autonomní proliferace transformovaných buněk. Proliferace nádorových buněk nereaguje na regulační mechanismy, jako je omezený počet replikačních cyklů, a vyhýbají se fyziologickým buněčným pochodům v podobě apoptózy či autofagie. Dokonce mají schopnost unikat dohledu imunitního systému, který by za normálních okolností nádorové buňky eliminoval. Pro zajištění svého růstu dokáží nádorové buňky indukovat angiogenezi v nádorové mase a tím si zajistit dostatek živin na úkor hostitele. Další vlastností nádorových buněk je schopnost migrovat a infiltrovat vzdálenější tkáň.

Většina nádorů vzniká z jediné nádorové buňky, ve které došlo k iniciační genetické poruše. Tato porucha se přenáší do populace dceřiných buněk. Nekontrolovatelná proliferace a expanze způsobuje genomickou nestabilitu, která vede k dalším genetickým i epigenetickým změnám a tím se nádor stává agresivnější. Ačkoli byl nádor zprvu tvořen jedním klonem, časem se populace stává heterogenní. (Patologie, svazek 1., 2019).

Dle WHO jsou zhoubné novotvary celosvětově druhou nejčastější příčinou úmrtí. (WHO, 2020) Počet nově zachycených zhoubných novotvarů v České republice z dlouhodobého pohledu setrvale roste, v posledních letech však růst zpomaluje. V roce 2018 bylo v ČR nově diagnostikováno 87 361 onemocnění, tedy 822,1 na 100 000 osob. V mezinárodním srovnání stojí ČR v incidenci zhoubných novotvarů v Evropě na 16.–17. místě.

Incidence zhoubného novotvaru vaječníku v posledních letech vykazuje lehký pokles. V roce 2018 bylo toto onemocnění 16. nejčastějším novotvarem v České republice při vyloučení nemelanomových kožních nádorů. U žen se jednalo o 8. nejčastěji diagnostikovaný novotvar. (ÚZIS, 2018) Klasifikace nádorů ovaria je složitá. Poslední klasifikace dle WHO zahrnuje více než 80 nádorů se samostatným morfologickým kódem. (Patologie, svazek 3., 2019)

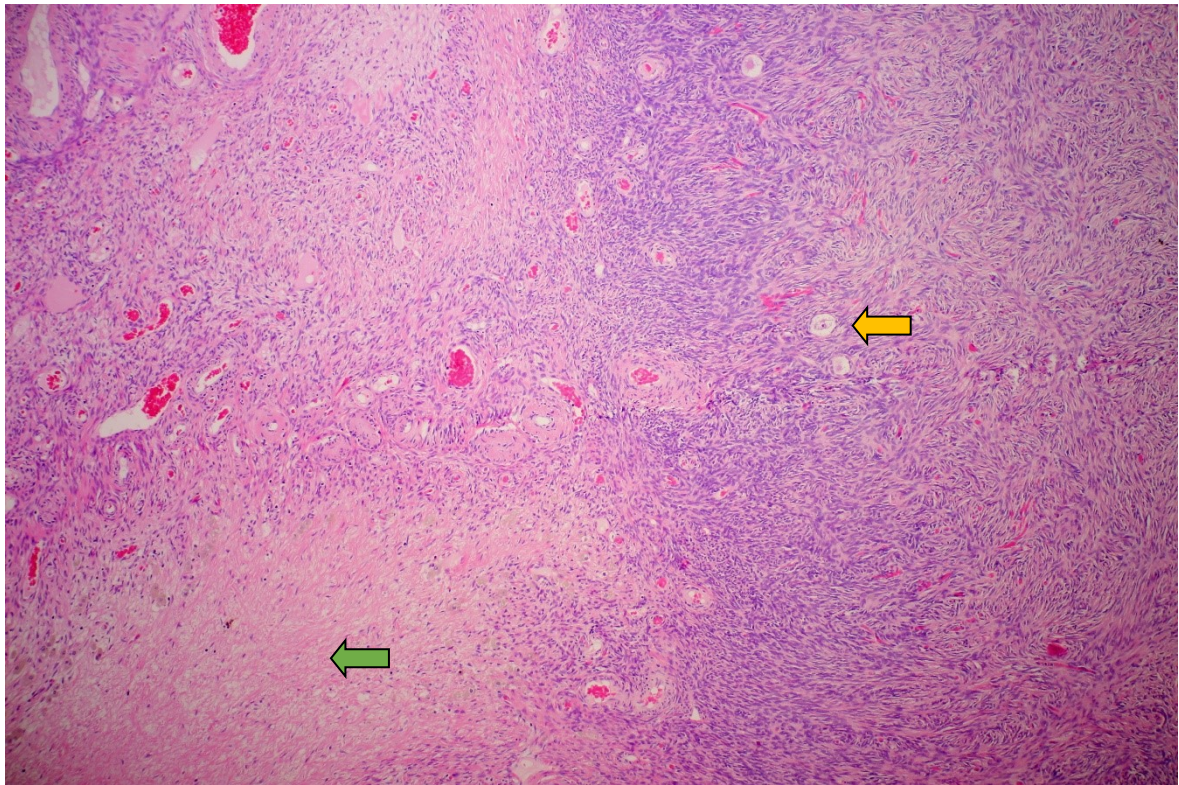
2. Literární přehled

2.1. Morfologie ovaria

Ženský reprodukční systém je tvořen vaječníky (ovaria), vejcovody (tubae uterinae), dělohou (uterus), pochvou (vagina) a zevními rodidly (vulva). (Základy histologie, 1999) Ovarium je párová pohlavní žláza ovoidního tvaru, s mírným předozadním oploštěním. Ovaria jsou zavěšená uvnitř pobřišnicové dutiny v prostoru malé pánve. Hlavní funkcí ovaria je tvorba a dozrávání vajíček a tvorba pohlavních hormonů (estrogenů a gestagenů). Obě funkce jsou na sobě závislé a probíhají v opakujících se cyklech. Celý cyklus je řízen hormony, které jsou uvolňovány z předního laloku hypofýzy. (Memorix histologie, 2017) Během cyklu dochází k strukturním změnám, včetně změn funkční aktivity. (Základy histologie, 1999) Ovarium je v poloze fixováno mesovariem, pobřišnicovým závěsem na přední straně, který je součástí širokého děložního vazů, dále ligamentem suspensorium ovarii, které fixuje ovarium ke stěně pánve a ligamentem ovarii proprium, které spojuje děložní pól ovaria s děložním rohem. (Memorix histologie, 2017)

2.2. Histologie ovaria

Povrch ovaria je tvořen vrstvou plochých až kubických buněk (epithelium superficiale), jejichž původ je odvozen z mezotelu, který vystýlá pobřišnicovou dutinu. Pod plochým epitelem se nachází vrstva hustého kolagenního vaziva (tunica albuginea). (Memorix histologie, 2017) Na průřezu lze rozlišit vnější kůru (zona corticalis) a uvnitř uloženou dřeň (zona medullaris). Hranice mezi kůrou a dřením není jasně definovaná. (Funkční histologie, 2000) Obě vrstvy jsou tvořené řídkým kolagenním stromatem, které hlavně ve dřeni představuje nosnou tkáň. Pro rozlišení obou vrstev je zásadní přítomnost folikulů, které se nachází v kůře. V kůře se folikuly vyskytují v různých stádiích vývoje, případně zde můžeme nalézt i žluté tělíčko. V řídkém kolagenním vazivu kůry se nachází fibroblasty, buňky hladké svaloviny a jemná síť kolagenních a retikulárních vláken. Dřeň je složena z hustého kolagenního vaziva, je zde menší zastoupení buněk a více kolagenních a retikulárních vláken. Dřeň ovaria je prostoupěna četnými cévami, lymfatickými kapilárami a nervovou tkání. (Funkční histologie, 2000) V oblasti vstupu cév do ovaria se nachází intersticiální hilové buňky, které produkují androgeny, podobně jako Leydigovy buňky ve varleti. (Memorix histologie, 2017) Histologie ovaria je zachycena na Obrázku 1.



Obrázek 1.: Histologie ovaria, barvení HE, 100x. Vpravo kůra s Graafovými folikuly (žlutá šipka). Vlevo dřev (nahore) a regredované žluté tělísko (zelená šipka).

Zdroj: Fotoarchiv Ústavu patologie I. LF a VFN v Praze

2.3. Klasifikace nádorů ovaria

Primární nádory ovaria můžeme rozdělit podle výchozí tkáně do tří základních skupin: epitelové, germinální a sex-cord stromální (ze stromatu zárodečných pruhů). Neméně důležitou skupinou jsou sekundární nádory-metastatické. (Patologie, svazek 3., 2019) V roce 2014 byla přijata nová kritéria WHO (platná i v aktuální verzi z roku 2020), která začlenila histopatologické poznatky a nyní rozlišujeme pět hlavních histotypů epitelového karcinomu ovaria: high grade serózní karcinom (HGSC), low grade serózní karcinom (LGSC), endometrioidní karcinom (EC), světllobuněčný karcinom (OCCC) a mucinózní karcinom (MC). (PERES, 2018) Nejčastějším maligním nádorem je high grade serózní karcinom (cca 70 %), na druhém místě jsou endometrioidní karcinom (10 %) a světllobuněčný karcinom (10 %), mezi méně časté patří low grade serózní karcinom (5 %) a mucinózní karcinom (3 %). Zbylá 2 % procenta zaujímají velmi vzácné typy, jako je Brennerův nádor a další. (Patologie, svazek 3., 2019)

2.3.1. Sex-cord stromální nádory

Sex-cord stromální nádory představují skupinu nádorů, které vycházejí ze zárodečných provazců nebo stromatu gonád. Dělení nádorů této skupiny je následující: čistě stromální (tékom-fibrom a nádory ze steroidogenních buněk), čistě sex-cord (nádory z buněk granulózy a ze Sertoliho buněk) a smíšené (ze Sertoliho-Leydigových buněk). (AL HARBI, 2021)

2.3.1.1. Nádory ze skupiny tékom-fibrom

Pro tyto nádory je charakteristická přítomnost buněk téky a stromálních fibroblastů, které mohou být tvořeny pouze fibroblasty (fibrom, fibrosarkom) či smíšené až po nádory s převahou buněk téky (tékom). Nejčastějším nádorem této skupiny je ovariální fibrom, benigní povahy. Vzácným typem benigního nádoru je tékom. Jedná se o většinou o jednostranné léze, které jsou často hormonálně aktivní (obvykle estrogenní, méně často androgenní). Maligní typ nádoru představuje fibrosarkom.

2.3.1.2. Nádory ze steroidogenních buněk

Asi 20 % steroidogenních nádorů tvoří nádory z Leydigových buněk. Tento nádor vzniká z tzv. hilových buněk, lokalizovaných v oblasti hilu ovaria. Diagnosticky významná je přítomnost tzv. Reinkeho krystalů, útvarů uvnitř cytoplazmy. Většinou jsou hormonálně aktivní s produkcí androgenů.

2.3.1.3. Nádory z buněk granulózy

Adultní typ nádoru se vyskytuje u pacientek středního věku nebo po menopauze. Je hormonálně aktivní. Hormonální aktivita je spojena s hyperplazií endometria, která může vyústit v karcinom. Z histologického pohledu je obtížné stanovit biologickou povahu, proto je nádor klasifikován jako maligní. Nádor může recidivovat mnoho let po prvním záchytu.

Juvenilní typ se vyskytuje v prvních třech dekadách života a je klasifikován jako nádor s nejistou biologickou povahou, avšak v 5 % případů se chová agresivně. Ve většině případů je spojován s předčasnou pseudopuberou, kdy nedochází k ovulaci a gravidita není možná. (Patologie, svazek 3., 2019)

2.3.1.4. Nádory ze Sertoliho a Leydigových buněk

Nádory pouze ze Sertoliho buněk jsou vzácné a výjimečně maligní.

2.3.1.4.1. Smíšené nádory ze Sertoliho a Leydigových buněk

Tento vzácný typ nádoru se vyskytuje s variabilní biologickou povahou, v závislosti na diferenciaci buněk. Dobře diferencované nádory jsou benigní, méně diferencované s nejistou biologickou povahou a málo diferencované bývají maligní. (AL HARBI, 2021)

2.3.2. Germinální nádory

Rozmanitá skupina nádorů vznikající ze zárodečných buněk. Histologicky identické nádory se vyskytují i ve varleti. Germinální nádory dělíme na nádory z primitivních germinálních buněk a teratomy, které představují asi 30 % všech ovariálních nádorů a většina z nich jsou zralé cystické teratomy.

2.3.2.1. Nádory z primitivních germinálních buněk

Do této kategorie maligních nádorů patří dysgerminom, nádor ze žloutkového váčku, embryonální karcinom a non-gestační choriokarcinom. Většinou se vyskytují v prvních třech dekádách života. Vyskytují se i ve smíšené formě, nejčastěji kombinace dysgerminomu a nádoru ze žloutkového váčku, ale vyskytují se i v kombinaci s teratomy. Nádory jsou spojovány s abnormální enzymatickou a hormonální aktivitou. Tyto látky se dostávají do krve, díky čemuž je můžeme využít pro diagnostiku a sledování odpovědi na léčbu. Mezi tyto markery patří β -hCG, α -fetoprotein a LDH. (DELLINO, 2020)

2.3.2.1.1. Dysgerminom ovaria

Tento nádor je histologicky totožný se seminomem varlete. Makroskopicky se jeví jako solidní, opouzdřený a většinou postihuje jedno ovarium.

2.3.2.1.2. Nádor ze žloutkového váčku

Velmi častý nádor u dětí a dospívajících. Téměř vždy postihuje pouze jedno ovarium.

2.3.2.1.3. Embryonální karcinom

Většinou se vyskytuje jako smíšený nádor a v ovariu se vyskytuje výjimečně.

2.3.2.1.4. Non-gestační choriokarcinom

Vzácný typ nádoru, se špatnou prognózou, který je často smíšený s jiným typem germinálního nádoru. (Patologie, svazek 3., 2019)

2.3.2.2. Teratomy

Germinální nádory, které mohou být tvořeny jedním, dvěma nebo třemi zárodečnými vrstvami (ektoderm, endoderm a mezoderm). Podle zastoupení vrstev teratomy dělíme na teratomy s jedním typem tkáně (monodermální), s dvěma až třemi typy vrstev. Podle biologické povahy teratomy dělíme na zralé, které jsou benigní, a nezralé, které bývají maligní.

Zralý teratom zastupuje většinu všech teratomů. V teratomu se mohou vyskytovat všechny typy tkání, např. tkáň nervová, kosti, chrupavky, zuby. Do kategorie zralých teratomů spadají i tzv. dermoidní cysty, které jsou vystlané epidermis. Vzácně může dojít k maligní transformaci. (PETERSON, 2012)

Nezralý teratom je vzácný maligní nádor, obsahující nezralou tkáň embryonálního typu, často je přítomna i tkáň zralá.

Monodermální teratomy jsou vzácné typy nádorů, tvořené pouze jedním typem tkáně. Nejčastější je tzv. struma ovarii, teratom tvořený tkání štítné žlázy. (Patologie, svazek 3., 2019)

2.3.3. Epitelové nádory

Epitelové nádory patří mezi nejčastější ovariální nádory, tvoří celkově asi 40 % benigních a 80-90 % maligních neoplazií. (Patologie, svazek 3., 2019) Dle histogeneze nádory dělíme na serózní, mucinózní, světlobuněčné a endometroidní. Podle biologické povahy lze nádory rozdělit na benigní, borderline (nádory hraniční malignity) a maligní. (Patologie, svazek 3., 2019)

2.3.3.1. Epidemiologie

Geografická incidence je nejvyšší v zemích s vysokým socioekonomickým statutem, naopak incidence je velmi nízká např. v oblastech Afriky, ačkoliv i zde se poslední dobou výskyt zvyšuje. (LISIO, 2019) Zdá se, že výskyt souvisí s životním stylem a reprodukčním chováním.

2.3.3.2. *Etiopatogeneze*

Rizikové faktory se liší dle histologických typů nádoru. Výskyt např. high grade serózního a světlobuněčného karcinomu je dáván do souvislosti s celkovým počtem ovulací během života, u žen s časnou menarché a pozdní menopauzou a také u žen, které nikdy nerodily či rodily v pozdějším věku. (Patologie, svazek 3., 2019) Příčiny nejsou zcela známe, ale předpokládá se, že na vznik karcinomu ovaria má vliv vyšší počet ovulací a tím i zvýšený výskyt reparativních procesů po ovulaci. Tento proces může mít za následek vznik metaplastických a genetických změn. (LISIO, 2019)

Dalšími rizikovými faktory pro vznik karcinomu ovaria, ale i dalších nádorů, mohou být mutace genů BRCA1 a BRCA2. (LISIO, 2019) U pacientek s prokázanou mutací genů BRCA1 a BRCA2 se provádí profylaktické odstranění děložních tub a ovarií. Právě chirurgické odstranění tub a ovarií přineslo zásadní poznatky o prekurzorech high grade serózního karcinomu ovaria. (Patologie, svazek 3., 2019)

Hereditární faktory endometroidního a světlobuněčného karcinomu zahrnují nepolypózní kolorektální karcinom (Lynchův syndrom), který má za následek mikrosatelitovou instabilitu (MSI). (LISIO, 2019) Mucinózní karcinom má na rozdíl od výše uvedených karcinomů jiné rizikové faktory, a to zejména kouření a vyšší tělesnou hmotnost (a tedy i vyšší body mass index). (Patologie, svazek 3., 2019)

2.3.3.3. *Serózní nádory ovaria*

2.3.3.3.1. *Benigní serózní nádory*

Dle makroskopie můžeme rozdělit tuto skupinu na *serózní cystadenom* (tvořen jednou či více cystami, s čirou nažloutlou tekutinou), *serózní adenofibrom* (tuhý a solidní nádor) a *povrchový serózní papilom* (na povrchu ovaria proliferace papilárně uspořádaná). (Patologie, svazek 3., 2019)

2.3.3.3.2. *Serózní borderline nádory*

Nádory s nejistou biologickou povahou. Vyznačují se zvýšenou proliferací epitelu, ale nevyskytuje se invazivní růst, nápadné jaderné atypie a ani vyšší procento mitóz. Nicméně se mohou šířit po peritoneu v dutině břišní. Morfologie je zachycena na Obrázku 2.

Podle morfologie rozdělujeme dvě samostatné jednotky: *serózní borderline nádor* a *mikropapilární variantu serózního borderline nádoru*. Serózní borderline nádor má schopnost rozsevu na peritoneum, které nazýváme *implantáty*. Výskyt invazivních ložisek

se již hodnotí jako low-grade serózní karcinom. Borderline nádory jsou tedy prekurzory low-grade serózního karcinomu. (HAUPTMANN, 2017)

S-BOT dle molekulární analýzy vykazuje podobné molekulární a genetické změny jako LGSC. Imunohistochemicky jsou S-BOT charakterizovány expresí WT1, PAX8, Bcl-2, estrogenového a progesteronového receptoru. Mutace KRAS a BRAF jsou přítomny asi u 30 %. (HAUPTMANN, 2017)

2.3.3.3.3. Serózní karcinomy

Skupina dvou onemocnění, které se navzájem liší morfologicky, genetickými změnami a prognózou. Rozlišujeme tedy low-grade serózní karcinom (LGSC) a high-grade serózní karcinom (HGSC). (Russell Vang, 2009)

High-grade serózní karcinom (HGSC) často postihuje obě ovaria. Průměrný věk pacientek v době diagnózy je kolem 60-63 let. Výskyt v nižším věku je vzácný. (LISIO, 2019) Časný záchyt nádoru bohužel není tak častý a k diagnóze dochází až v rozvinutém stádiu. Mezi příznaky patří bolesti břicha a zad, vaginální krvácení, zvětšující se břicho (ascites) a zvětšující se abdominální rezistence. Komplikace souvisí s šířením po peritoneu.

Makroskopicky je nádor solidní, může být i cystický a papilární. Velikost může být variabilní, od malých ložisek až po splývající infiltráty, ve kterých nejsou znatelné původní struktury tuby a ovaria. Mikroskopicky se vyznačuje jadernými atypiiemi s pleomorfními jádry. Obvykle se též vyznačuje četnými mitózami. (LISIO, 2019) Morfologie je zachycena na Obrázku 3.

Prognóza závisí na pokročilosti nádoru v době diagnózy. 5leté přežití nádorů I. stádia je až 90 %, u II. stádia 70 % a III. stádia 40-60 %. Nádor velmi dobře reaguje na terapii, bohužel velmi často dochází k relapsům, a nakonec vzniká rezistence na léčbu. (Patologie, svazek 3., 2019)

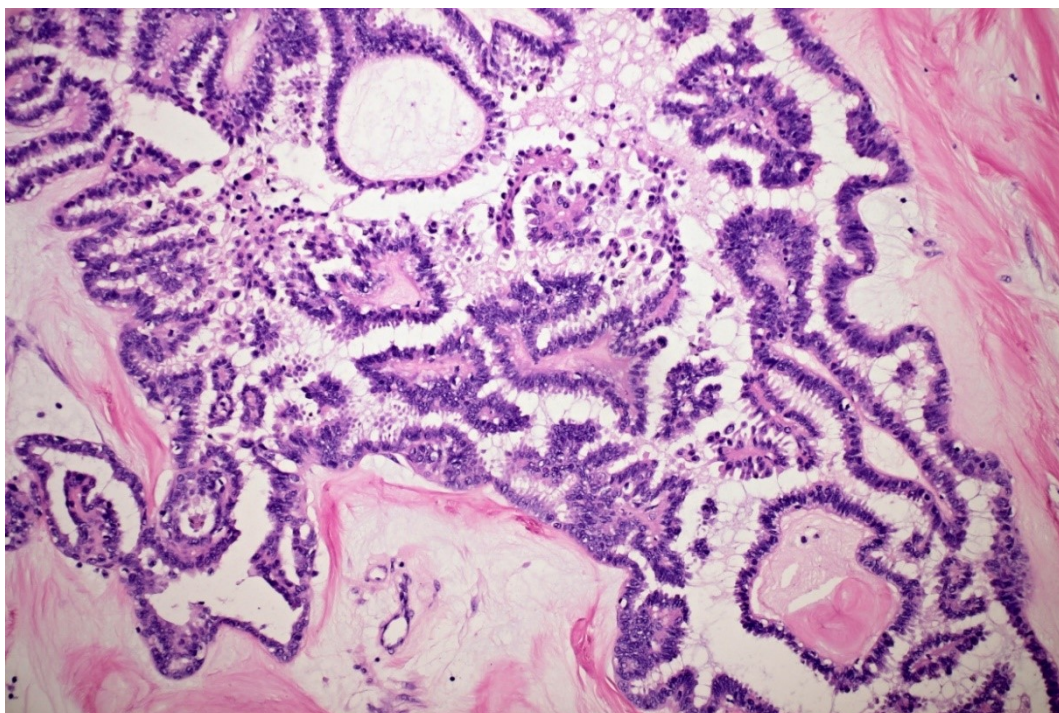
Low-grade serózní karcinom (LGSC) je vzácný typ nádoru, tvoří asi 3 % všech nádorů ovaria, 5-8 % serózních karcinomů. (SIEMON, 2019) Též často postihuje obě ovaria. Průměrný věk pacientek je 50 let. (VANG, 2009) Onemocnění je často diagnostikováno až v pokročilých stádiích, neboť je nádor klinicky němý. Později se objevují nespecifické příznaky v podobě bolestí břicha, abdominálního dyskomfortu a později ascites. Ascites je důvodem diseminace do břišní dutiny. Mikroskopicky se jedná hlavně o papilárně uspořádanou lézi, která se vyznačuje invazivním růstem. Častá je přítomnost kalcifikovaných psamomatózních tělísek. Morfologie je zachycena na Obrázku 4. Část léze

má oblasti charakteristické pro serózní borderline nádor, hlavně mikropapilární histotyp, který je považován za prekursor některých lézí LGSC. Prognóza u LGSC je v časných stádiích dobrá, ačkoliv se jedná o nádory, které nereagují na chemoterapii. V pokročilých stádiích se prognóza výrazně zhoršuje. (Patologie, svazek 3., 2019)

LGSC má odlišné klinické chování v porovnání s high-grade serózním karcinomem (HGSC) a také specifický molekulární profil, jako jsou somatické mutace KRAS a BRAF. (MOUJABER, 2022) Low-grade serózní karcinom ovaria (LGSC) a serózní borderline nádory (S-BOT) se vyznačují absencí mutovaného proteinu p53, který je naopak charakteristický pro HGSC. Jeho exprese tedy slouží k odlišení LGSC a S-BOT od HGSC. (VOUTSADAKIS, 2020)

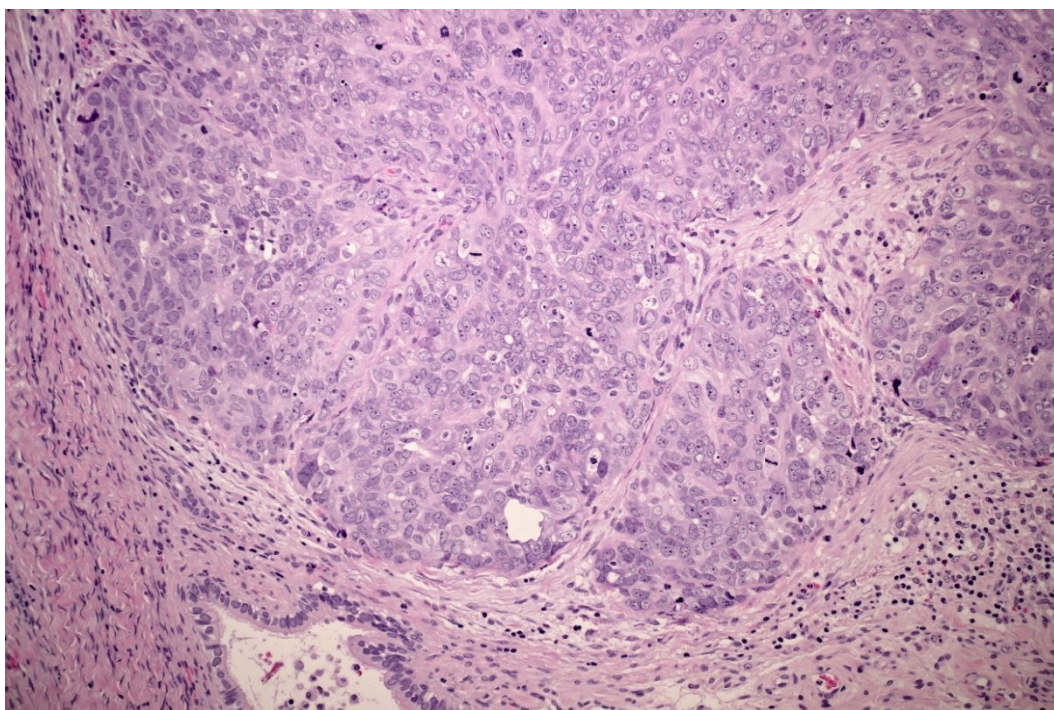
V současné době je primární léčba LGSC založena na chirurgickém odstranění nádoru a podávání chemoterapie na bázi platiny. Nicméně použití chemoterapie jak v počáteční fázi, tak v případě relapsu je zpochybňováno kvůli nízké míře odpovědi u LGSC. Většina LGSC exprimuje receptory steroidních hormonů, na které může cílit hormonální terapie u pacientek, kterým již byla podána chemoterapie, ale nebylo možné odstranit chirurgicky celý nádor. Hormonální terapie je relativně málo toxická a může stabilizovat onemocnění, bohužel i tato varianta má svá omezení. LGSC má vysokou prevalenci aktivačních somatických mutací v genech mitogenem aktivovaných proteinkinázových drah, nejčastěji v KRAS, BRAF a NRAS. Použití kombinovaných cílených terapií, imunoterapie a antiangiogenních látek zůstává aktivní oblastí zkoumání léčby LGSC. Například Trametinib, inhibitor MEK, prokázal účinnost oproti chemoterapii a hormonální terapii. Dále je předmětem zkoumání inhibitory CDK4/6. (MOUJABER, 2022)

Serózní tubulární intraepiteliální karcinom (STIC) je lokalizovaný v oblasti fimbrií tuby, méně často v ampulární části. Makroskopicky není rozeznatelný, ale mikroskopicky sekreční epitel tuby vykazuje stejné znaky jako buňky HGSC v podobě jaderných atypií a známek zvýšené proliferace buněk, včetně atypických mitóz. STIC byl objeven jako prekursorová léze většiny HGSC při vyšetření děložních tub a ovarií odstraněných profylakticky u pacientek s mutacemi genů BRCA1 a BRCA2. (Patologie, svazek 3., 2019)



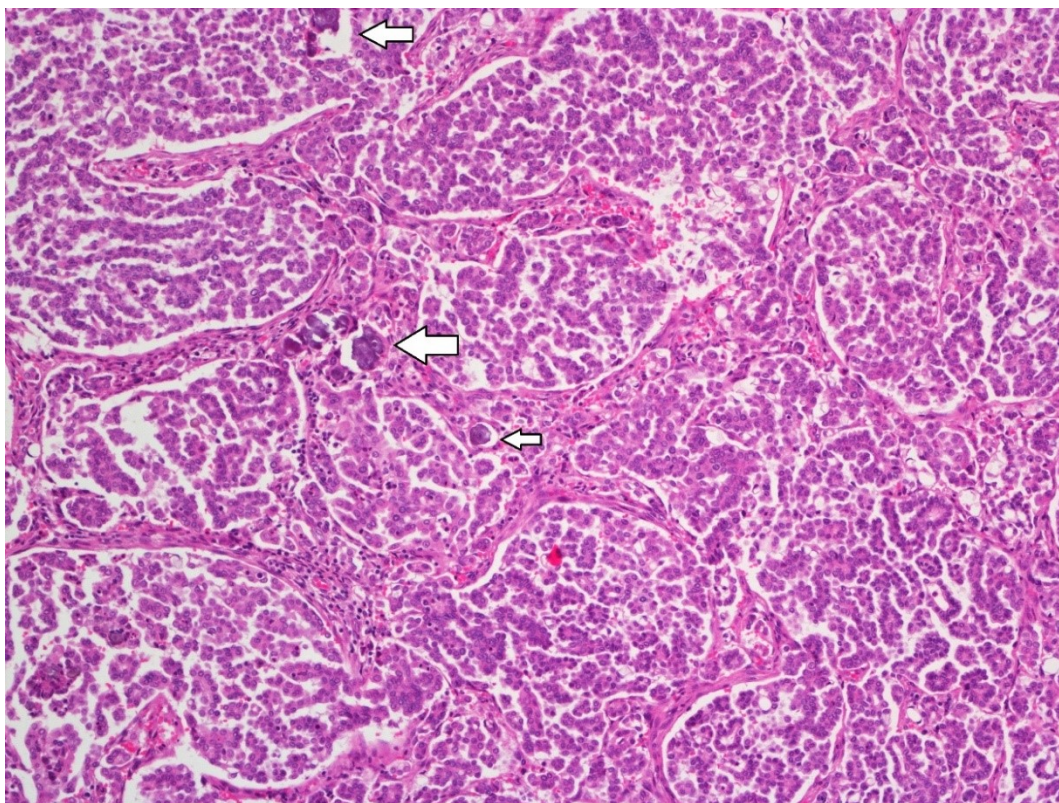
Obrázek 2.: Serózní borderline ovariální karcinom (S-BOT), barvení HE, 100x

Zdroj: Fotoarchiv Ústavu patologie 1. LF a VFN v Praze



Obrázek 3.: High grade serózní karcinom (HGSC) barvení HE, 200x

Zdroj: Fotoarchiv Ústavu patologie 1. LF a VFN v Praze



Obrázek 4.: Low grade serózní karcinom (LGSC) barvení HE, 100x. Psamomatózní tělíčka označena šipkou.

Zdroj: Fotoarchiv Ústavu patologie 1. LF a VFN v Praze

2.3.4. Endometroidní nádory ovaria

Benigní endometroidní nádory (endometroidní cystadenom a adenofibrom) a endometroidní borderline nádory jsou velmi vzácné.

2.3.4.1. Endometroidní karcinom

Endometroidní karcinom a světlobuněčný karcinom patří mezi častější typy karcinomu ovaria. Zajímavostí je, že jejich výskyt je spojován s endometriózou a také s Lynchovým syndromem. Morfologie a exprese imunohistochemických markerů napomáhá jejich rozlišení od sebe navzájem. (FADARE, 2019) Makroskopicky se jedná o solidní nebo cystický nádor, často s hemoragiemi i uvnitř cyst.

Endometrióza je časté onemocnění, které postihuje až 10 % žen v reprodukčním věku. Morfologicky se jedná o normální endometriální tkáň, nacházející se mimo dělohu. Prevalence endometriózy u ovariálního karcinomu je silně závislá na histotypu: 3,3 % u serózního karcinomu, 3,0 % u mucinózního karcinomu, 39,2 % u světlobuněčného karcinomu a 21,2 % u endometroidního karcinomu ovaria. (FADARE, 2019) U části

pacientek s endometroidním karcinomem ovaria se objeví endometroidní karcinom endometria. Důležité je rozlišit, zda se jedná o dva primární nádory nebo o metastázu jednoho z nádorů. Grading je třístupňový a kritéria jsou stejná jako pro nádory těla děložního. Prognóza bývá velmi dobrá, díky včasnému zachytu (Patologie, svazek 3., 2019)

2.3.5. Mucinózní nádory ovaria

U mucinózních nádorů je klíčové odlišení primárního nádoru od metastáz ze zažívacího traktu.

2.3.5.1. Benigní mucinózní nádory

Ve většině případů se jedná o mucinózní cystadenomy. Makroskopicky jde o objemné cysty, dosahující i více než 30 cm. Původ mucinózních nádorů není jasný, pravděpodobně jsou germinálního původu a z mezotelu nebo vznikají metaplazií epitelu.

2.3.5.2. Mucinózní borderline nádory

Nádory tvořené mucinózními buňkami gastrointestinálního typu. Tyto nádory se vyznačují jadernými atypii a zvýšenou proliferací, avšak chovají se benigně. Makroskopicky se vyznačují velkým objemem, často bývají větší než 50 cm a patří k největším nádorům, s nimiž se lidským v těle můžeme setkat. (Patologie, svazek 3., 2019)

2.3.5.3. Mucinózní karcinom

Vzácný typ nádoru, s výskytem jen 3 %. Jde o multicystický nádor s obrovským množstvím intracelulárního mucinu ve více než 90 % nádorových buněk. (RICCI, 2018)

2.3.6. Světlobuněčné nádory ovaria

Benigní nádory tohoto typu jsou velice vzácné.

2.3.6.1. Světlobuněčný karcinom

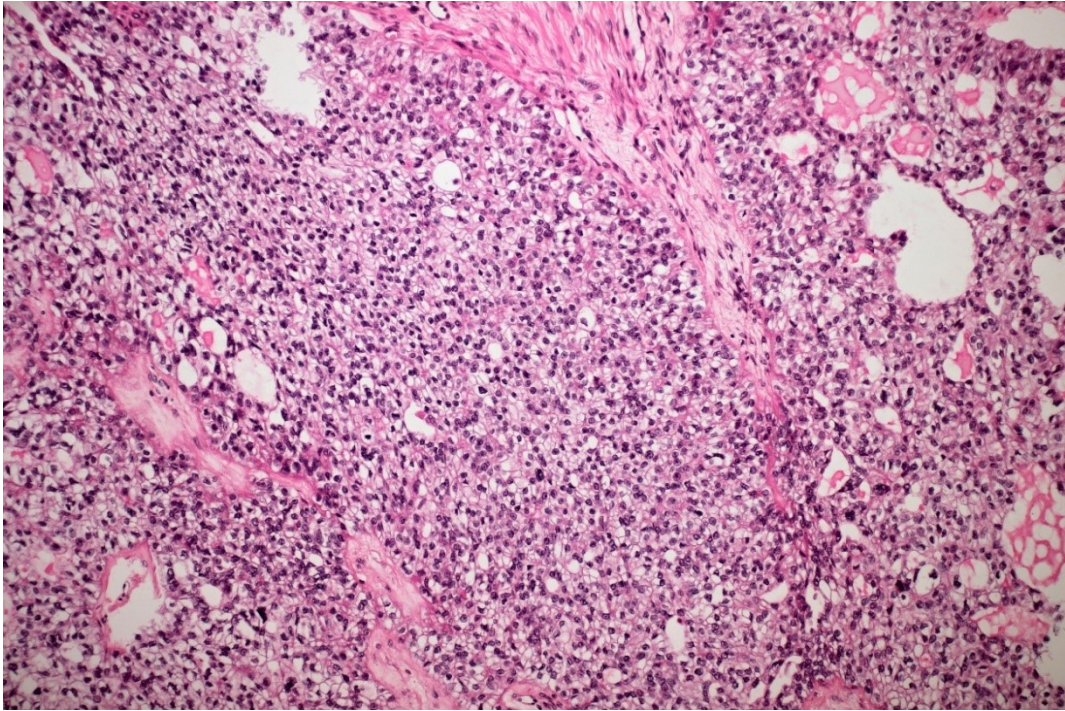
Výskyt světlobuněčného karcinomu ovaria je vázán na etnický původ. V Severní Americe a Evropě OCCC tvoří méně než 10 % z epitelových ovariálních karcinomů, v Japonsku to může být až 25 %. (ODA, 2018) Jak bylo zmíněno v kapitole endometroidního karcinomu, světlobuněčný karcinom je asociován s endometriózou. Zdá se, že riziko je výrazně vyšší, pokud je v době diagnózy pacientkám nad 50 let, což naznačuje, že k maligní změně endometriózy dochází v období menopauzy. K diagnóze většinou dochází v časném stádiu, v tomto případě je prognóza příznivá díky chirurgickému odstranění.

V pokročilejším stádiu je prognóza velmi špatná, neboť nádor je rezistentní k chemoterapii. (FUJIWARA, 2016)

Makroskopicky obvykle postihuje jedno ovarium, na řezu je solidní, solidní a cystický či čistě cystický. Mikroskopická struktura je variabilní, nádorové buňky jsou kubické či cvočkovité, uspořádané v jedné vrstvě. Cytoplazma je vodojasná, bohatá na glykogen. Morfologie je zachycena na Obrázku 5.

OCCC se vyznačuje genetickými/epigenetickými změnami a specifickým molekulárním profilem, odlišnými od těch, které se nacházejí v HGSC, včetně častého deficitu genů kódujících podjednotkové proteiny komplexů SWI/SNF remodelujících chromatin. Gen ARID1A, který kóduje protein BAF250A/ARID1A, je nejčastěji mutovaným genem podjednotky SWI/SNF v OCCC. Mutace ARID1A jsou detekovány asi u 50 % OCCC a s podobnou frekvencí je pozorována i ztráta exprese proteinu BAF250A/ARID1A, který funguje jako regulační podjednotka komplexu SWI/SNF. Ztráta exprese proteinu BAF250A/ARID1A je pozorována nejen u homozygotních, ale také u heterozygotních mutantních forem.

Nedávno byla odhalena role deficitu ARID1A během rozvoje OCCC. U endometriózy byly detekovány somatické mutace v genech ARID1A a PIK3CA a v souvislosti s tímto objevem se prokázalo, že nedostatek ARID1A s onkogenní mutací PIK3CA podporuje tvorbu OCCC in vivo posílením signalizace zánětlivých cytokinů. Další studie prokázala, že změny v drahách ARID1A i PI3-kinázy (PI3K) podporují epiteliální transdiferenciaci a invazi. ARID1A a další faktory SWI/SNF tedy pravděpodobně fungují epigeneticky jako nádorový supresor pro rozvoj karcinomu ovaria. Protein BAF250A/ARID1A funguje jako regulační podjednotka komplexu SWI/SNF, který reguluje více buněčných procesů, včetně transkripce a opravy DNA. Proto je možné, že nádorové buňky s deficitem ARID1A nebo jiných podjednotek SWI/SNF sdílejí vlastnosti, které chybí u buněk nenádorových. Cílení na tyto vlastnosti představuje potenciálně účinnou strategii pro léčbu OCCC. (TAKAHASHI, 2021)



Obrázek 5.: Světlobuněčný karcinom ovaria (OCCC), barvení HE, 200x

Zdroj: Fotoarchiv Ústavu patologie I. LF a VFN v Praze

2.4. Protilátky pro imunohistochemii

2.4.1. MMR proteiny

Primární funkcí dráhy MMR je identifikovat a opravit chyby způsobené během replikace DNA, a proto je oprava chybného párování DNA (MMR) zásadní pro zajištění integrity genomu. (SALEM, 2020) Funkce MMR proteinů může být inaktivována několika způsoby. Deaktivace může být trvalá či přechodná a může mít závažné důsledky. Ztráta funkce MMR omezuje apoptózu, zvyšuje přežití buňky a vede k rezistenci na chemoterapii. MMR proteiny tedy slouží jako senzory, aktivují kontrolní body buněčného cyklu a signalizují apoptózu. (KUNKEL, 2005) Mikrosatelity (MS) jsou tandemové repetice krátkých sekvencí DNA, vyskytující se v celém lidském genomu. Díky vysokému počtu mutací byly MS široce používány jako polymorfní markery v populační genetice a forenzní analýze. Fenotyp mikrosatelitní nestability (MSI) se vyskytuje u nádorů s narušenou opravou chybného párování DNA (MMR) a je hojně využíván jako diagnostický marker v nádorových buňkách. (CORTES-CIRIANO, 2017)

Za počáteční rozpoznání chyby DNA je zodpovědný proteinový komplex mutS α . Snížená nebo nedostatečná aktivita tohoto komplexu je způsobena mutací či inaktivací MSH2 nebo MSH6. K rozrušení DNA a zahájení opravy slouží proteinový komplex mutL α , jehož funkce může být narušena v důsledku mutace či inaktivace MLH1 nebo PMS2. Ztráta exprese proteinů mikrosatelitní instability (MLH1, MSH2, MSH6 a PMS2) se v nádorové tkáni detekují imunohistochemicky nebo NGS. Ztráta exprese MLH1/PMS2 a/nebo MSH2/MSH6 je nejčastějším vzorem pozorovaným u nádorů s deficitem MMR. (SALEM, 2020)

2.4.2. Protein p53

p53 je hlavním tumor supresorem, jehož funkce je klíčová pro ochranu proti vzniku nádorů. (OREN, 2010) Za stresových podmínek p53 reguluje buněčný růst podporou apoptózy a opravy DNA. Když p53 zmutuje, ztrácí svou funkci, což má za následek abnormální buněčnou proliferaci a progresi nádoru. (KANAPATHIPILLAI, 2018) Typicky postižené nádorové buňky akumulují nadměrné množství mutantního proteinu p53. Díky mutaci získává protein p53 nové vlastnosti přispívající k progresi nádoru, který se zároveň stává odolnější k terapii. Nashromážděné poznatky ukazují, že mutace genu TP53 patří mezi nejčastější typy genově specifických změn u malignit. Výsledkem je ztráta fyziologické

funkce p53, která se může projevovat sníženou expresí či produkcí nestabilních a zkrácených proteinů. Zjistilo se však, že většina mutací p53, souvisejících se vznikem nádorů, vede k expresi celého proteinu se substitucí jedné aminokyseliny. To má za následek hromadění p53 v nádorových buňkách. (OREN, 2010)

Mutace se mohou projevit třemi způsoby. Zaprvé, mutace inaktivuje tumor supresorovou aktivitu postižené alely TP53, čímž sníží celkovou kapacitu buňky vyvolat správnou odpověď p53. Pokud zmutují obě alely nebo pokud dojde ke ztrátě zbývající nezmutované alely, buňky jsou zcela zbaveny p53 ochrany proti vzniku nádoru. Zadruhé, mnoho izoform mutovaného proteinu p53 vykazuje dominantně-negativní účinky nad koexprimovaným nezmutovaným p53. Vzniklé tetramery nejdou schopny vazby na DNA. I když je zachována jedna alela nezmutovaného p53, buňka může být tímto mechanismem prakticky zbavena funkce p53, zejména pokud je mutantní protein exprimován v přebytku oproti svému protějšku. Zatřetí, změněný protein p53 může mít vlastní aktivitu, která není přítomna v původním proteinu, což může přispívat k progresi nádoru. (OREN, 2010)

Z histopatologického hlediska se typ exprese p53 hodnotí podle intenzity a četnosti. Wild-type (WT) varianta se vyznačuje různou intenzitou v různém počtu buněk. Exprese může být difuzní.

Mutantní forma p53 se exprimuje v aberantní podobě. Častější je varianta s difuzní silnou pozitivitou v alespoň 70 % nádorových buněk. Druhou variantou je kompletní negativita p53 v nádorových buňkách. V této situaci musí být v tkáni vnitřní kontrola, tedy nenádorová tkáň, kterou se ověří, že se nejedná o falešnou negativitu.

Imunohistochemické vyšetření exprese p53 se u karcinomů ovaria se provádí především pro odlišení HGSC od jiných karcinomů. HGSC v naprosté většině případů vykazuje aberantní expresi.

2.4.3. NTRK

Geny neutrofinových kináz tyrosinových receptorů (NTRK1, NTRK2 a NTRK3) kódují rodinu kináz tyrosinových receptorů (TrkA, TrkB a TrkC), které hrají důležitou roli při přežívání, proliferaci a diferenciaci u zdravých lidských buněk. Proteiny Trk jsou fyziologicky exprimovány převážně v centrálním a periferním nervovém systému a také v hladkém svalstvu. (SOLOMON, 2019) Genové fúze NTRK vedou k transkripci chimérických proteinů Trk s aktivovanou nebo nadměrně exprimovanou funkcí kinázy, která

má onkogenní potenciál. Tyto genetické abnormality mohou být cílem pro terapii, využívající inhibitory. Všechny tři receptory Trk jsou tvořené z extracelulární domény pro vazbu ligandu, transmembránové oblasti a intracelulární domény s kinázovou doménou. Vazba ligandu na receptor spouští oligomerizaci receptorů a fosforylaci specifických tyrosinových zbytků v intracytoplazmatické kinázové doméně. Tato reakce vede k aktivaci signálních transdukčních drah vedoucích k proliferaci, diferenciaci a přežití normálních a neoplastických nervových buněk. (AMATU, 2016)

2.4.4. IMP

IMP (insulin-like growth factor II mRNA-binding protein) je skupina proteinů složená z IMP1, IMP2 a IMP3. Proteiny vázající RNA (RBP) regulují genovou expresi tím, že zasahují do všech fází metabolismu mRNA, včetně transkripce, 5' zakončení, sestřihu prekurzorové mRNA, zpracování 3' konce, transportu, translace a stability. Zjistilo se, že rodina IMP je exprimována ve většině orgánů během embryogeneze, kde se předpokládá, že hrají důležitou roli při migraci buněk, metabolismu a obnově kmenových buněk. (DEGRAUWE, 2016)

IMP3 je onkofetální protein, exprimovaný ve vyvíjejícím se epitelu, svalu a placentě během časného vývoje plodu. Během embryogeneze IMP3 hraje významnou roli při migraci buněk. Nedávné studie ukázaly, že IMP3 podporuje buněčnou proliferaci nádorů a tvorbu metastáz a mohl by být asociován s mnoha agresivními a pokročilými novotvary, včetně malignit ženského genitálu. Specificky je exprimován v nádorové tkáni, ne však v tkáni nenádorové. (GONG, 2014)

Gen kódující IMP2 je amplifikován a nadměrně exprimován u mnoha lidských nádorů, což může mít za následek horší prognózu. Ve zdravých buňkách protein IMP2 pomáhá vytvářet nové genové produkty stabilizací určitých nově produkovaných molekul RNA a v některých případech podporuje translaci těchto RNA na proteiny. Například se IMP2 váže na mRNA, která kóduje protein IGF2, který podporuje buněčný růst a je produkován ve velkém množství nádorovými buňkami.

Předchozí výzkum ukázal, že myši, které postrádají protein IMP2, žijí déle a nádory u nich vznikají s nižší frekvencí, zatímco pacienti, jejichž nádor exprimuje velké množství IMP2, mají horší prognózu. (DAI, 2017)

2.4.5. CD56

CD56 je transmembránový glykoprotein, který je exprimován na NK buňkách, myoblastech, některých aktivovaných T lymfocytech a nervových tkáních. Také je exprimován různými maligními nádory, v jejichž diagnostice jej lze použít jako nespecifický neuroendokrinní marker. NK buňky jsou životně důležité pro vrozenou imunitu a hrají klíčovou roli v imunoregulaci, imunitním dohledu a produkci cytokinů. (HUANG, 2020)

2.4.6. L1CAM

L1CAM (L1 cell adhesion molecule) je jednou z prvních neurálních adhezních molekul, které hrají důležitou roli při vývoji nervového systému. (ALTEVOGT, 2016) Proto jsou mutace v genu L1CAM zodpovědné za různé neurologické poruchy. Studie dokázaly, že je L1CAM exprimován některými nádory a zároveň značí schopnost nádoru metastazovat. Přítomnost L1CAM v nádorové tkáni a kultivovaných buňkách souvisela se špatnou prognózou a pokročilejšími stádii onemocnění. L1CAM je užitečným diagnostickým a prognostickým markerem, který by mohl být využitelný v protinádorové léčbě, včetně imunoterapie. (RAVEH, 2009)

2.4.7. Synaptophysin (SYN)

Synaptophysin je membránový glykoprotein synaptických vezikul exprimovaný v neuroendokrinních, endokrinních a nervových buňkách. Tento marker napomáhá při diagnostice neuroendokrinních novotvarů, jako jsou neuroendokrinní nádory plic, gastrointestinálního traktu a pankreatu, a některých nádorů endokrinních orgánů. (Agilent, nedatováno)

2.4.8. Chromogranin A

Chromogranin A je glykoprotein, patřící do rodiny sekrečních proteinů. Nachází se v sekrečních granulích dřeně nadledvin a v mnoha dalších neuroendokrinních buňkách a neuronech. Chromogranin A je exprimován mnoha endokrinními a neuroendokrinními nádory, ale i jinými nádory, jako jsou karcinomy prostaty, prsu, žaludku.

Některé studie naznačují, že abnormální produkce chromograninu A v nádorové tkáni by mohla regulovat růst a progresi nádorů. (CORTI, 2010)

2.4.9. INSM1

INSM1 (insulinoma-associated protein 1) je transkripční faktor s motivem zinkového prstu, který byl izolován ze subtrakční knihovny lidského inzulinomu. (CHEN, 2020)

Strukturní motiv zinkového prstu je rozšířen u řady proteinů. Motivy zinkového prstu mají zásadní vliv při transkripci, degradaci proteinů, opravě DNA a migraci buněk. (ABBEHAUSEN, 2019) Fyziologicky je exprimován ve vyvíjejících se neuroendokrinních tkáních a nervovém systému u savců. INSM1 tedy představuje důležitou roli v rané embryonální neurogenезi a při diferenciaci endokrinních buněk pankreatu. Exprese INSM1 je ve zdravých dospělých tkáních velmi nízká, případně úplně chybí. (LAN, 2009)

INSM1 společně s CD56, synaptofyzinem a chromograninem A slouží k diagnostice různých neuroendokrinních nádorů. (TING, 2021)

2.4.10. CK17

Cytokeratin 17 je exprimován bazálními buňkami různých epitelů, např. bazálními buňkami kůže, myoepiteliemi prsu či rezervními buňkami hrdla děložního. V hrdle děložním se rezervní buňky podílejí na vzniku dlaždicové metaplazie. Během dozrávání metaplastického epitelu exprese CK17 klesá až postupně zmizí. (REGAUER, 2007) Exprese CK17 byla zkoumána u karcinomů kůže a také u mnoha preinvazivních epiteliálních malignit. (FERNANDEZ-FLORES, 2016) Protilátka proti CK17 může pomoci v rozlišení mezi nezralou dlaždicovou metaplazií a dysplastickými změnami. (REGAUER, 2007)

3. Cíl práce

Diplomová práce je zaměřena na komplexní analýzu vzácných typů karcinomu ovaria.

Hlavními cíli je:

- Analýza imunohistochemického profilu
- Zhodnocení výsledků imunohistochemického profilu se zaměřením na možnosti využití v diferenciální diagnostice a případné cílené léčbě
- Analýza změn proteinů mismatch repair (MMR) imunohistochemicky a metodou sekvenování nové generace (NGS)

4. Metodika

Cílem projektu je řešit komplexní analýzu vzácných ovariálních karcinomů s ohledem na morfolologii, imunohistochemii, genetické a nádorové mikroprostředí. První krok v celém projektu byl výběr a příprava souboru vzorků se všemi klinicko-patologickými údaji z archivů Ústavu patologie 1. LF UK VFN v Praze a participujících institucí s ohledem na hlavní výsledky. Laboratoře imunohistochemie a laboratoř molekulární patologie, které analýzy prováděly, se nachází na Ústavu patologie 1. LF UK VFN v Praze.

Celkový počet vzorků pro analýzu byl:

- 124 případů světlobuněčného karcinomu ovaria (OCCC)
- 101 případů LGSC
- 114 případů HGSC (kontrolní skupina)
- 43 případů S-BOT (kontrolní skupina)

Pro analýzu DNA byly preferovány nativní vzorky, zmrazené v kapalném dusíku a uložené v Bance biologického materiálu (BBM), která se nachází v Hlavově ústavu patologie, 1. LF UK a VFN v Praze. Vzhledem k vzácnosti těchto nádorů nejsou vzorky všech pacientek, zařazených do této studie, v BBM dostupné. Z tohoto důvodu byly použity parafinové bloky, uložené v archivech. Menší kvalita DNA v parafinových blocích není překážkou pro imunohistochemické vyšetření, pro NGS analýzu se očekává 50-60 % všech vybraných vzorků vhodných pro analýzu.

4.1. Imunohistochemie (IHC)

Imunohistochemie je široce využívaná metoda, která pomocí specifické primární protilátky detekuje hledaný antigen. Základním principem je tedy vazba antigen-protilátka. Antigeny jsou proteiny, které jsou exprimovány živou buňkou. Specifita antigenů je závislá na druhu buňky a zda se jedná o buňku nádorovou. Antigeny se mohou nacházet na povrchu buňky, v cytoplazmě nebo v jádře a tohoto jevu se využívá v histopatologii. Pomocí IHC můžeme detekovat antigeny ve tkáni, které jsou specifické pro nádory i nenádorové struktury.

Ústav patologie 1. LF a VFN v Praze disponuje veškerým přístrojovým vybavením a diagnostickými reagensy, které jsou potřebné pro analýzu.

4.1.1. Princip imunohistochemie

4.1.1.1. Ruční zpracování IHC

Laboratoř imunohistochemie je jedno ze stěžejních míst. Vytvoří a zpracuje se zde 4000-4500 preparátů měsíčně. Veškeré pracovní postupy jsou uvedeny ve Standardních operačních postupech VFN (SOP-PAT-03).

Vybavení zahrnuje PT Link (Dako) vodní lázeň (Obrázek 6.), která kombinuje proces deparafinace, rehydratace a odhalení antigenů v tkáni. (Agilent). V jednom přístroji se nachází dvě kovové lázně, do kterých se ředí roztoky EnVision FLEX Target Retrieval (low pH nebo high pH) 1:50, speciálně vyvinutý pro PT Link. Pufr je složen tak, aby v jednom cyklu vaření došlo k deparafinaci a odhalení antigenů. Předkrájené a sušené preparáty jsou umístěny do speciálních hřebenů a vloženy do PT Linku. Deparafinace a odhalení antigenů se děje při teplotě 97 °C po dobu 20 minut. Po této době PT Link zahájí chlazení až na teplotu 65 °C. Tato teplota zajišťuje bezpečnou manipulaci s hřebenem. Hřeben je dále přenesen na 5 minut do připravených nádob s naředěným Wash Bufferem EnVision FLEX 1:20. Preparáty jsou následně opláchnuty v destilované vodě, tkáň je označena pomocí delimitačního pera, které zajistí zadržení tekutin v místě tkáně (Obrázek 7.). Preparáty jsou následně uloženy do vlhké komory. Na připravené preparáty se aplikuje Peroxidase-Blocking reagent, EnVision FLEX na 5 minut. Blokování endogenní peroxidázy ve tkáni brání výskytu falešných pozitivit. Reagencie je následně opláchnuta destilovanou vodou a dále laborant ručně aplikuje primární protilátky, které mohou být RTU (ready to use) nebo jsou laboranty ředěny z koncentrátů. Takovéto protilátky jsou ředěny pomocí speciální tekutiny (Antibody Diluent) do lahvíček, které jsou značeny názvem primární protilátky, klonem a ředěním. Každé nové ředění je laborantem zaznamenáváno do připraveného formuláře. Inkubace primární protilátky probíhá za pokojové teploty po dobu 50 minut (Obrázek 8.). Po této době je primární protilátka smyta roztokem EnVision FLEX Wash Buffer, který je připravený ve stříčce. Zásobní roztok Wash Bufferu je ředěn laborantem do zásobní láhve, označené datem ředění a parafou. Následuje aplikace sekundární protilátky EnVision FLEX/HRP a inkubace 20 minut. Poté je sekundární protilátka smyta EnVision FLEX Wash Bufferem a na preparáty je aplikována destilační voda na 5 minut, která má také zabránit nespecifickým pozitivitám. Destilovaná voda se z preparátů odstraní a aplikuje se roztok substrát-chromogen (DAB) na 10 minut. DAB slouží k vizualizaci peroxidázy in situ a vytváří hnědé pozitivitu. Roztok DAB se připravuje každý den čerstvý, smícháním 1 ml EnVision FLEX Substrate Buffer a jednou kapkou EnVision FLEX DAB+ Chromogen.

Po inkubaci jsou komory opatrně opláchnuty tekoucí vodou a společně s DAB nality do nádoby s roztokem Desam PRIM. Kohoutková voda zajišťuje zastavení reakce a tím zabrání přibarvování tkáně. Posledním krokem je obarvení struktur tkáně hematoxylinem, inkubace 3 minuty a následné opláchnutí pod tekoucí vodou. Preparáty se nechají ve vodní lázni několik minut, aby došlo ke zmodrání jader. Po zmodrání se preparáty přemístí do odvodňovací baterie, která se skládá ze čtyř kyvet s 96 % alkoholem, dvou kyvet s acetonem, jednou kyvetou s aceton xylenem a dvěma kyvetami s xylenem, který slouží k projasnění tkáně. Z xyleny se preparáty přemístí do montovacího automatu, který preparáty přikryje montovacím médiem (Pertex) a krycím sklem. Po zaschnutí montovacího media laborant provádí interní kontrolu kvality preparátů (SOP-PAT-03).

pH pufru a ředění primární protilátky se vybírá na základě doporučení výrobce protilátky a následných zkouškách na kontrolním materiálu a vybrané skupině nádorů. Celý proces se provádí v souladu s podmínkami pro validaci a verifikaci (SM-PAT-03) a ve spolupráci s patologem. U primárních protilátek, které vyžadují více času pro vazbu s antigenem se využívá postup inkubace přes noc v lednici a druhý den ráno laboratorní pracovník pokračuje od aplikace sekundární protilátky stejně jako u protilátek, které se zpracovávají v denním režimu.

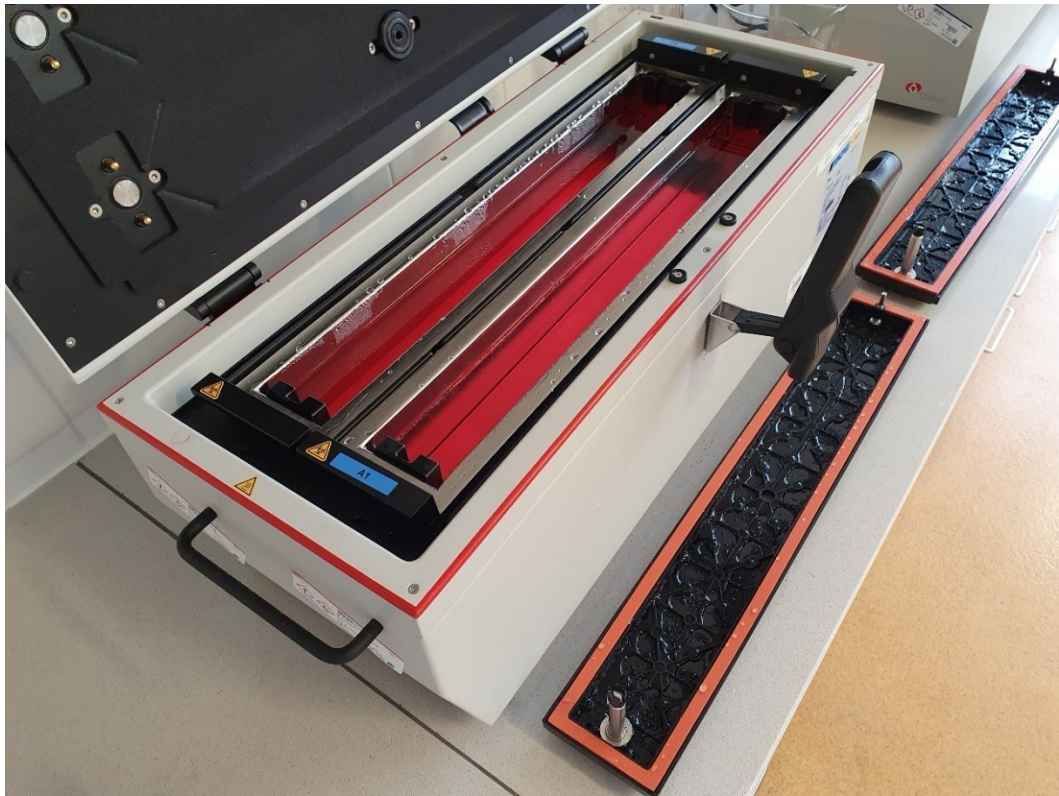
4.1.1.2. Strojové zpracování IHC

Přístrojové vybavení dále zahrnuje dva imunostainery Ventana BenchMark Ultra (Roche) (Obrázek 9.). Jde o plně automatický imunostainer, vhodný jak pro imunohistochemii, tak pro in situ hybridizaci. Jeden cyklus zahrnuje maximálně 30 preparátů a doba zpracování se různí, podle nastaveného protokolu. (Roche Diagnostics) Tento systém je vhodný pro protilátky, které jsou málo citlivé pro ruční zpracování IHC nebo je nutné použít certifikovaný kit (např. vyšetření exprese proteinu Her-2/Neu). Většina protilátek je však aplikována laboranty po zaznění signálu. Protilátky jsou ředěny stejným způsobem jako protilátky pro ruční zpracování IHC. Ventana BenchMark Ultra využívá výrobcem prodávané detekční kity, UltraView DAB IHC Detection kit a OptiView DAB IHC Detection kit. OptiView DAB IHC kit se využívá k detekci protilátek, u kterých byl signál nedostatečný a je tedy třeba vazbu amplifikovat.

Hotové preparáty jsou přemístěny do teplé vody se saponátem, promyty pod tekoucí vodou a dále prochází stejným procesem odvodnění a montování jako preparáty s ruční detekcí.

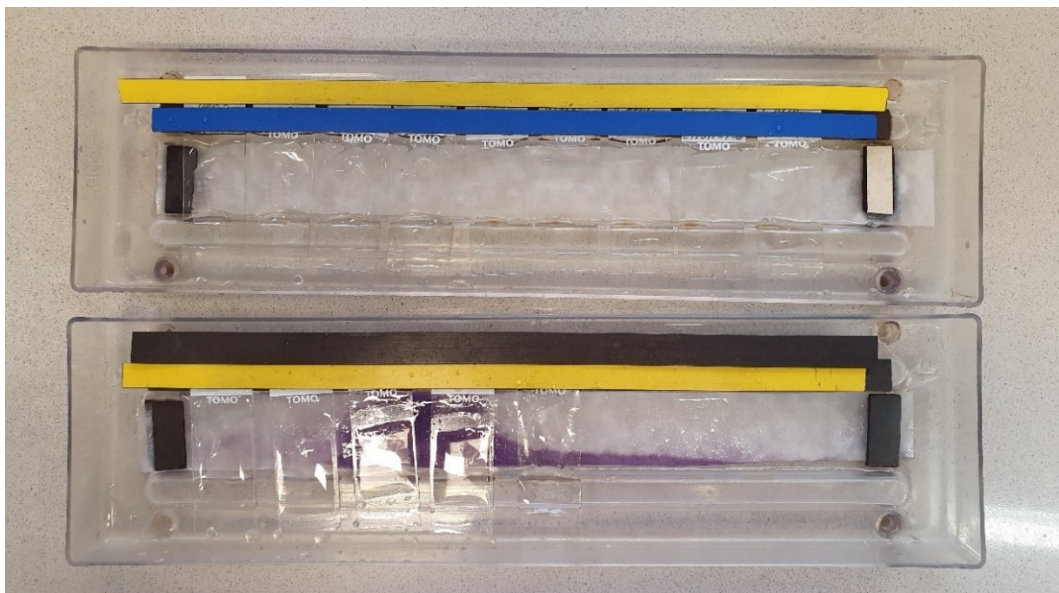
4.1.1.3. Zpracování parafinových bloků pomocí TMA Master

TMA Master je počítačem řízený nástroj pro vytváření tkáňových mikročipů (tissue microarray-TMA). (HISTECH). Příklad je zobrazen na Obrázku č. 10. Principem je přesné zaměření požadované struktury a vyvrtání z původního parafinového bloku. Následně je pomocí počítače přesně definovaná pozice a tkáň je zasazena do nového parafinového TMA bloku. Takto je do parafinu vloženo i několik desítek biopsií. Jakmile je vytvořen TMA blok, laborant může krájet preparáty podle požadavku patologa. Hotový TMA blok je zobrazen na Obrázku č. 11.



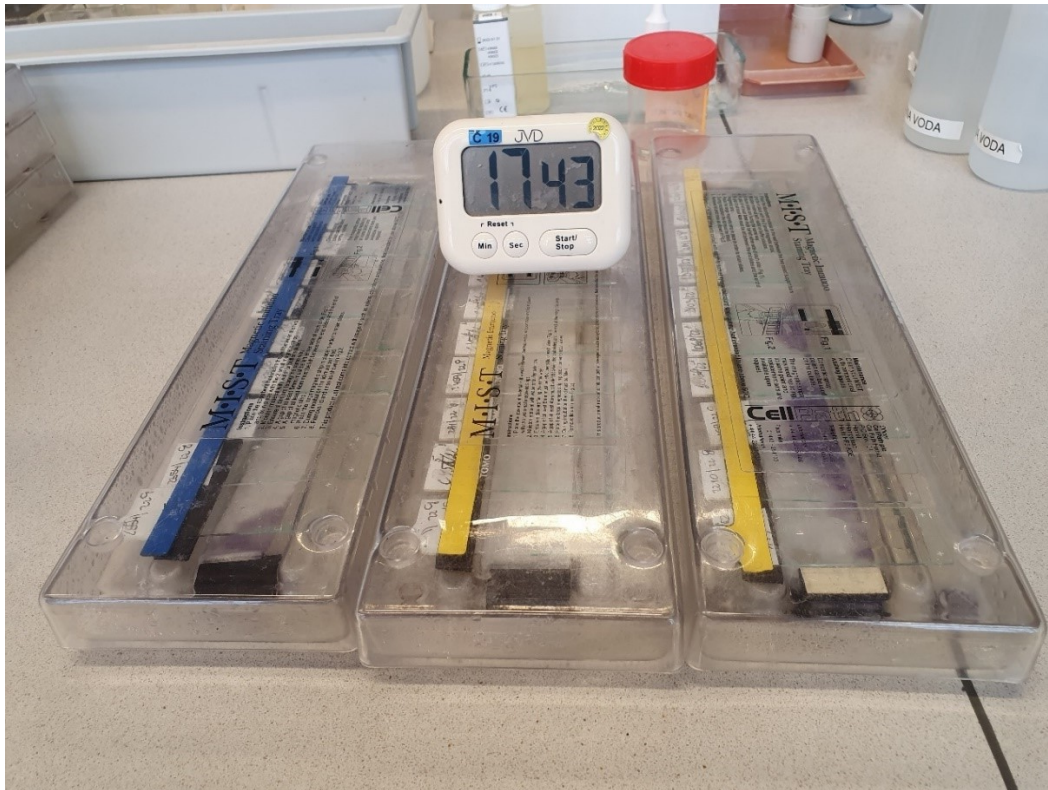
Obrázek 6.: Vodní lázně PT Link, Low pH

Zdroj: Fotoarchiv Ústavu patologie 1. LF a VFN v Praze



Obrázek 7.: IHC komory s preparáty

Zdroj: Fotoarchiv Ústavu patologie 1. LF a VFN v Praze



Obrázek 8.: Inkubace protilátek

Zdroj: Fotoarchiv Ústavu patologie 1. LF a VFN v Praze



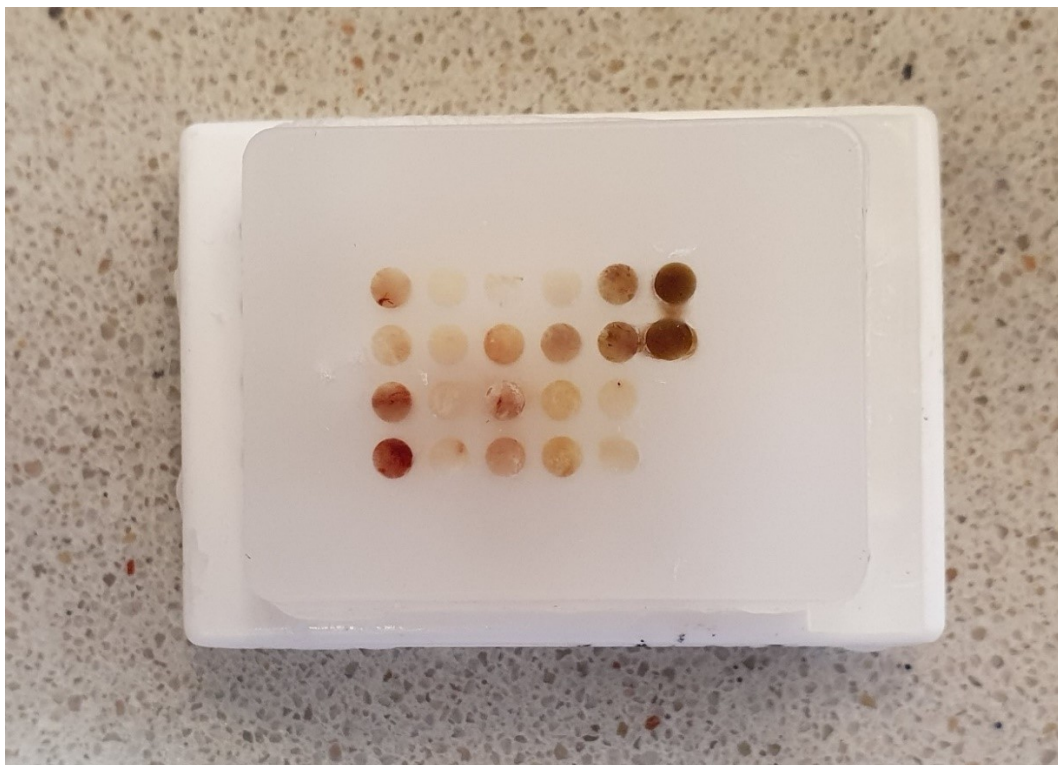
Obrázek 9.: Imunostainer Ventana BenchMark Ultra

Zdroj: Fotoarchiv Ústavu patologie 1. LF a VFN v Praze



Obrázek 10.: TMA Master

Zdroj: Fotoarchiv Ústavu patologie 1. LF a VFN v Praze



Obrázek 11.: Hotový TMA blok

Zdroj: Fotoarchiv Ústavu patologie 1. LF a VFN v Praze

4.2. Molekulárně genetická analýza

Molekulárně genetická analýza metodou NGS (Next Generation Sequencing) neboli masivní paralelní sekvenování, je technologie sekvenování DNA či RNA, která způsobila revoluci ve výzkumu genomu. Pomocí NGS lze sekvenovat celý lidský genom i vybrané oblasti u několika pacientů v jedné analýze, během velmi krátké doby. (BEHJATI, 2013) Základním předpokladem genomiky je, že rakovina je způsobena somaticky získanými mutacemi a jde tedy o onemocnění genomu. Pomocí NGS lze genom, nebo jeho části, u onkologických pacientů systematicky studovat v jejich celistvosti. V klinické praxi se NGS využívá k identifikaci mutací v nádorech a vyhledávání pacientů vhodných pro podání cílené léčby. (BEHJATI, 2013)

4.2.1. Princip NGS

Analýza DNA zahrnuje přípravu knihovny, včetně fragmentace, označení a amplifikaci jednotlivých úseků. Následně sekvenování obvykle vybraných úseků a biostatistické zpracování výstupů a porovnání sekvence vzorku s referenční sekvencí.

Analýza celkové RNA je obdobná jako v případě DNA s rozdílem kroku syntézy komplementární DNA (cDNA) z RNA.

Výhodou metody je velmi nízká chybovost analyzátoru, která je na úrovni 0,1 %, tzn. jedna chybně přečtená báze na 1000 bází. Pro vlastní vyšetření nádorové genetické informace je také důležité, aby vzorky obsahovaly co nejméně nenádorového pozadí, v praxi minimálně 20 % nádorových buněk, optimálně ale > 50 %. Vyšetření může být ovlivněno velikostí cílové oblasti, množstvím vzorků v sekvenačním běhu, množstvím a kvalitou vstupního materiálu, výkonem analyzátoru. V případě sekvenace RNA je vyšetření ovlivněno i aktuální genovou expresí v buňkách. (SOP-PAT-23)

Pro NGS se využívá buď sekvenátor MiSeq (Illumina), se sekvenační kapacitou 3-5 miliard bází nebo sekvenátor NextSeq (Illumina), který má sekvenační kapacitu řádově vyšší, v rozmezí 20 – 120 miliard bází. Výsledky sekvenování jsou hodnoceny certifikovanými programy pro biostatistické vyhodnocení dat CLC Genomic Workbench (QIAGEN) anebo NextGENe (Softgenetics).

4.2.1.1. Izolace DNA/RNA

Genomová DNA / celková RNA může být získána z parafinových bloků (FFPE), z cytologických nátěrů, z nativních tkání nebo nativních tkání zmrazených v tekutém dusíku či uložených ve fixačním činidle jako např. RNAlater. Také je možná analýza volně cirkulující DNA (tzv. cell-free DNA; cfDNA) z krevní plazmy. (SOP-PAT-03)

K izolaci DNA/RNA z FFPE vzorků bývá využíván Quick-DNA/RNA FFPE Miniprep Kit (Zymoresearch). Před každou izolací patolog určuje oblast, ze které je vhodné odebrat nádorovou tkáň. Makrodisekce nebo mikrodisekce tkáně z parafinových řezů se používá pro nabohacení vstupního materiálu o nádorové buňky, neboť pro NGS vyšetření je žádoucí minimálně 20 % nádorových buněk. Pro izolaci z parafinových bloků je třeba získat alespoň jeden až dva řezy o tloušťce 5 μm , o celkové ploše 1 cm^2 . Pokud je tkáň menší než 1 cm^2 , navýší se počet řezů dle potřeby, až do počtu 10 řezů. Izolace z nativní čerstvé či čerstvě zamražené tkáně nebo tkáně z RNAlater vyžaduje obvykle 10-25 mg tkáně. Minimum krevní plazmy pro izolaci cfDNA jsou 2 ml.

Izolace DNA/RNA dle (PP-PAT-LMP 35) začíná v případě parafinových bloků deparafinací pomocí Deparaffinization Solution (DS). Po přidání 400 μl DS se vzorek řádně protřepe (vortex) a centrifuguje při 20 000 x g po dobu 2 min. Odstraní se supernatant a vzorek se vysuší. Po vysušení se k vzorku přidá 95 μl DNase/RNase Free water, 95 μl 2X Digestion Buffer a 10 μl Proteinase K. Následuje inkubace při 55 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 1-4 h (v průběhu se vzorek protřepává) a poté se vzorek dále inkubuje při 94 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 20 min.

K vzorku se přidá 600 μl DNA/RNA Lysis Bufferu, řádně se protřepe (vortex) a stočí 16000 x g po dobu 1 min. Vzniklý supernatant se opatrně přenesse na izolační kolonku se sběrnou zkumavkou, kolonka musí být řádně popsána identifikací pro vzorek a označená jako „DNA frakce“. Následně se vzorek centrifuguje 16 000 x g po 30 s. Nyní je DNA navázána na kolonku, RNA protekla kolonkou do sběrné zkumavky. Do nové sběrné zkumavky se vloží takto připravená kolonka s DNA, která může být skladována v chladničce do dalšího zpracování, viz izolace DNA. Původní sběrnou zkumavku se supernatantem označíme jako „RNA frakci“. Se supernatantem se dále pracuje podle protokolu „izolace RNA“.

Izolace RNA využívá vzniklý supernatant, ke kterému se přidá 750 µl absolutního etanolu a směs se promíchá. Maximálně 700 µl tohoto mixu se přenesse na novou izolační kolonku se sběrnou zkumavkou, poté následuje centrifugace 16 000 x g po 30 s a supernatant se odstraní. Na kolonku se znovu přidá zbylý supernatant (etanol s RNA frakcí) a opět následuje centrifugace (16 000 x g po 30 s) a odstranění supernatantu. Následuje promývací fáze. Kolonka se promývá celkem 3x. V prvním kroku se přidá 400 µl DNA/RNA Prep bufferu, centrifugace 16 000 x g po 30 s, supernatant se odstraní. V druhém kroku se přidá 700 µl DNA/RNA Wash bufferu, centrifugace 16 000 x g po 30 s, supernatant se odstraní a ve třetím kroku se přidá 400 µl DNA/RNA Wash bufferu, centrifugace 16 000 x g po 2 min. Kolonka se nyní přemístí do eluční zkumavky (s označením identifikace vzorku a „RNA“) a přidá se 50 µl DNase/RNase-Free water. Voda se nechá inkubovat 1 minutu na filtru a následně se centrifuguje při 16 000 x g po dobu 30 s. Vzorek se může krátkodobě skladovat při -20 °C nebo dlouhodobě -70 °C.

Izolace DNA pokračuje s kolonkou, která byla označena jako „DNA frakce“. Podobně, jako u izolace RNA se na kolonku se přidá 400 µl DNA/RNA Prep bufferu, následuje centrifugace 16 000 x g po 30 s, supernatant se odstraní. Dále se přidá 700 µl DNA/RNA Wash bufferu, centrifugace 16 000 x g po 30 s, supernatant se odstraní a opět se přidá 400 µl DNA/RNA Wash bufferu, centrifugace 16 000 x g po 2 min. Kolonka se umístí do nové eluční zkumavky, která se označí názvem vzorku a „DNA“. Na kolonku se přidá 50 µl DNase/RNase-Free water. Kolonka se nechá inkubovat 1 min a následně centrifugujeme 16 000 x g po dobu 30 s. Vzorek se skladuje krátkodobě při -20 °C.

4.2.1.2. Stanovení koncentrace a kvality DNA/RNA

Měření koncentrace DNA se provádí fluorometricky (Qubit) a měření RNA spektrofotometricky (NanoDrop 2000). Minimální koncentrace a množství vstupní DNA je 5,7 ng/µl (tj. 100 ng DNA do reakční směsi v objemu 17,5 µl) nebo 1,43 ng/µl (tj. 50 ng DNA v reakční směsi v objemu 35 µl). Minimální koncentrace a množství vstupní RNA je 5 ng/µl (tj. 50 ng RNA v reakční směsi 10 µl). Spektrofotometrické metoda zároveň slouží pro kontrolu čistoty vzorku. Hodnocení kvality (integrity) materiálu je možno také provádět elektroforetickým dělením DNA/RNA na agarózovém gelu. (SOP-PAT-03)

Elektroforéza – do vzorkového platička nebo do eppendorfek připravíme vzorky smísením 2 µl DNA/RNA vzorku + 1µl příslušného vzorkového pufru. Do jamek gelu se napipetují postupně všechny vzorky a na každý gel přidáme minimálně do jedné jamky 2 µl velikostního žebříčku (marker, 100bp ladder). Elektroforéza probíhá 30-60 min, 120 V/ 400 mA (pro 2% gel). DNA/RNA se pohybuje od záporné elektrody (katoda) ke kladné (anoda). Gel se prohlíží a fotí na UV transluminátoru. Snímek se popíše a uloží v elektronické podobě. Normální velikostní rozsah je 200-700 bp pro DNA/RNA izolovanou z FFPE. Vzorky s kratším rozložením jsou z další analýzy případně vyřazeny. (PP-PAT-LMP 08)

4.2.1.3. Postup NGS analýzy DNA Sequence Capture (Somatic)

Masivní paralelní sekvenování metodou DNA Sequence Capture, která využívá hybridizace celkové DNA se specifickými sondami pro obohacení cílových oblastí.

NGS analýza metodou Sequence Capture (Somatic) je rozložena do tří dnů. První den se izoluje DNA pomocí Quick-DNA/RNA FFPE Miniprep kitu (Zymo Research) dle pokynů výrobce. Koncentrace izolované DNA se měří fluorimetricky pomocí přístroje Qubit. Pro přípravu knihovny se používá KAPA HyperPrep kit (Roche). Chemikálie pro syntézu sekvenační knihovny se připraví rozmrazením na ledu. Pufry a enzymy, alikvoty primerů a adapter mixy se po rozmrazení krátce protřepou (vortex) a stočí. V excelu se připraví elektronický NGS protokol, kde se zapíše vzorky a jejich koncentrace. Protokol pomůže vypočítat vstupní množství vzorku a ddH₂O, která se odpipetuje dle pokynů kitu pro přípravu knihoven. Zároveň se označí vzorky, které nesplňují vstupní podmínky. Optimálně pracujeme s 300 ng nebo minimálně 50 ng genomové DNA ve vstupním objemu, tj. 17,5 µl. U vzorků s nízkou koncentrací DNA je možné provádět reakce v dvojnásobném objemu. U vzorků s nízkou koncentrací DNA je možné provádět reakce v dvojnásobném objemu společně se všemi následujícími kroky.

Do jamek 96 jamkového plata (0,2 ml Non-skirted 96-well PCR Plate; Thermo Fisher Scientific) se napipetuje genomová DNA a příslušné množství ddH₂O a připraví se fragmentační pufr (2,5 µl) a fragmentační enzym (5 µl). Připravené plato se vloží do termocykleru a pustí se protokol na fragmentaci na 24 minut při 37 °C, víko nastavené na teplotu 47 °C. Po fragmentaci se musí opracovat přesahující konce a přidat A přesahy (tzv. End repair and A-tailing). Ke vzorkům se přidá 5 µl předem připravené směsi ER a AT enzymu (1,5 µl) a ER a AT pufru (3,5 µl), obsah v jamkách se protřepe (vortex) a stočí. Vzorky se vloží do termocykleru a pustí se protokol 65 °C – 30 minut. Do plata se vzorky

se poté přidá 25 μ l předem připravené směsi, ligačního pufru (15 μ l) a DNA ligázy (4 μ l) s ddH₂O (4 μ l) a udeverzálními adaptory (2 μ l), a celou směs (25 μ l) přidáme ke vzorku, promícháme na vortexu a krátce stočíme. Vzorky se opět vloží do termocykléru a pustí se program ligace (20 °C – 30 minut). Po ligaci je třeba před dalšími kroky syntézy sekvenční knihovny vzorky přečistit (purifikovat). Ke každému vzorku se připipetuje 45 μ l ddH₂O a dále 80 μ l řádně promíchané směsi SPRIselect činidla (Agencourt; směs porézních magnetických kuliček s polyethylenglykolem, který způsobí vysokou afinitu DNA k magnetickým kuličkám). Vzorky se důkladně promíchají a nechají 5 minut inkubovat při pokojové teplotě. Plato se poté vloží do magnetického stojánku, hnědé magnetické kuličky s DNA se přichytí k magnetům a roztok se tak stane čirým. Supernatant se opatrně odstraní pipetou. K přečištění se používá 2x oplach pomocí 80 % etanolu a proces s magnetickým stojánkem se tak opakuje. Po druhém oplachu etanolem necháme jeho zbytky odpařit. K vysušeným peletám se připipetuje ddH₂O (23,5 μ l) a vzorek se protřepe, aby vznikl homogenní roztok. Směs se nechá inkubovat 2 minuty při pokojové teplotě, kdy dochází ve vzorku k eluci DNA z kuliček do roztoku a poté se vzorky stočí a opět vloží do magnetického stojánku. Do nového plata se od každého vzorku napipetuje supernatant s DNA (23 μ l), ke každému vzorku se připipetuje KAPA HiFi HotStart Ready Mix polymeráza (25 μ l) a primery s indexovými oblastmi navržené tak, aby každý vzorek měl unikátní kombinaci nukleotidů v rámci tzv. indexu, což nám umožní po sekvenaci jednotlivé vzorky od sebe odlišit. Plato se promíchá vortexováním, krátce stočí a vloží do termocykléru s nastaveným protokolem pro tzv. 1. PCR (pre-capture PCR). PCR běží dle programu 98 °C – 45 vteřin; 7 cyklů: 98 °C – 15 vteřin, 60 °C – 30 vteřin a 72 °C – 30 vteřin; ukončené finální polymerací 72 °C – 5 minut. Po PCR následuje opět krok přečištění pomocí porézních magnetických kuliček s polyethylenglykolem (Agencourt SPRIselect).

Druhý den se změří koncentrace knihoven jednotlivých vzorků (pre-capture knihoven jednotlivých vzorků) pomocí fluorimetru Qubit (ThermoFisher Scientific) dle pokynů výrobce. Dalším krokem je příprava na hybridizaci směšného vzorku se sondami navržené knihovny. Na ledu se rozpustí KAPA Universal Enhancing Oligos (součást KAPA HyperCapture Reagent kit), Hybridizační pufr (součást KAPA HyperCapture Reagent kit), Hybridizační komponenta H (součást KAPA HyperCapture Reagent kit), COT Human DNA (1 mg/ml, KAPA HyperCapture Reagent kit), připravený alikvót hybridizačních sond (4 μ l; KAPA HyperChoice MAX). Následuje příprava hybridizačního vzorku. S použitím

naměřené koncentrace vzorku se zhodnotí koeficient amplifikovatelnosti a výsledná koncentrace vzorku po PCR. Vyplníme, kolik procent vzorku budeme do hybridizace vkládat. Standardně se vkládá 100 %. Pokud se vzorek amplifikuje s nízkou účinností a má nízkou koncentraci po PCR, cca 2-10 ng/ul, může do hybridizace vložit až 130 % vzorku, naopak, pokud se vzorek amplifikuje s vysokou účinností a má vysokou koncentraci po PCR, cca 60-90 ng/ul, může se snížit vstup až na 80 %. Od každého vzorku se napipetuje vypočítané množství do 1,5ml zkumavky s nízkou vazebnou kapacitou stěn. Smísením všech vzorků se získá 1,5 µg DNA (Multiplex DNA Sample Library). Ke knihovně se přidá COT Human DNA. Dále se přidá dvojnásobný objem SPRISelect a přečistěním směsi se redukuje objem. K vysušeným kuličkám se přidá 13,4 µl KAPA Universal Enhancing Oligos, obsah se resuspenduje, dokud nevznikne homogenní směs. Poté se ke každé knihovně přidá směs Hybridizačního pufru (28 µl), Hybridizační komponenty H (24 µl) a ddH₂O (3 µl) pro každou knihovnu. Zkumavky se vloží na magnetický stojánek a po projasnění tekutiny se celý supernatant přepipetuje do nové zkumavky, ve které je připraven alikvót sond. Směs se vloží do cyklu a spustíme program hybridizace (95 °C – 5 minut; 55 °C – 16 hodin.)

Třetí den probíhá vlastní obohacení vzorku (purifikace vychytaných oblastí našeho zájmu) a amplifikace obohacené knihovny. Připraví se streptavidinové kuličky (50 µl; Capture Beads – KAPA HyperCapture Bead Kit), které se nechají vytemperovat 30 minut při pokojové teplotě. Roztok se protřepe, dokud nezmizí usazeniny a nevznikne homogenní směs. Dále se připraví omývací pufr 1 (300 µl), 2 (200 µl) a 3 (200 µl), Stringent Wash buffer (400 µl) a promývací pufr 7 (500 µl; KAPA HyperCapture Reagent kit) naředěním zásobního roztoku příslušným množstvím ddH₂O pufr 1 (100 µl) a Stringent Wash buffer (400 µl) se vloží temperovat do termocyklu (55 °C), ve kterém se hybridizuje z předchozího dne knihovna.

Streptavidinové kuličky se odpipetují do nové zkumavky s nízkou vazebnou kapacitou stěn a 2x se promyjí pomocí promývacího pufru 7 (2x200 µl). Po druhém promytí se objem přepipetuje do 200µl zkumavky, supernatant se odstraní. Takto připravená zkumavka se vloží do termocyklu předehřát, na 2-3 minuty při 55 °C. Do zkumavky ke kuličkám se poté přepipetuje hybridizační vzorek, který se temperuje z předchozího dne v termocyklu a směs se krátce protřepe na vortexu. Tato směs se dále hybridizuje 15 minut. Do skončení hybridizační fáze následuje omývání Streptavidinových kuliček se sondami s navázanou DNA. Při promývání během inkubace pracujeme rychle, aby teplota vzorku neklesla po 55

°C. Po skončení 15minutové inkubace se vzorek postupně omyje predehřátými pufrů (pufr 1 a pufr 4 s 5minutovou inkubací při 55 °C mezi omytími) a poté se omyje při pokojové teplotě postupně pufrů 1 až 3. Po každém přidání pufru se zkumavka protřepe na vortexu, nechá se 1 minutu inkubovat při pokojové teplotě a pak se vloží do magnetického stojánku, kde se po vyčerpání tekutiny odebere supernatant a přidá se další pufr. Po promytí posledním pufrů se do zkumavky přidá 20 μ l ddH₂O.

Připraví se pracovní směs primerů (Post Capture PCR oligos; 2,5 μ l), KAPA HiFi HotStart ReadyMix (25 μ l) a ddH₂O (2,5 μ l). Tato směs se přidá do zkumavky se vzorkem a celý objem (50 μ l) se propipetuje, tím se promíchá. Zkumavka se vloží do termocykleru a pustí se program pro tzv. 2. PCR (post-capture PCR). Po PCR následuje přečistění s pomocí SPRISelect. Postup je stejný jako přečistění po 1. PCR.

V den sekvenace se změří koncentrace finální knihovny na přístroji Qubit (Thermo Fisher Scientific). Dále se měří profil finální knihovny pomocí kapilární elektroforézy (Fragment Analyzer).

Před vlastním sekvenováním se připraví sekvenační Sample Sheet, ve kterém je definováno množství vzorků a jednotlivé Index sekvence pro rozpoznání a přiřazení jednotlivých čtení ke vzorkům.

Dále se připraví vzorek pro sekvenování v přístroji MiSeq nebo NextSeq (Illumina). V nové zkumavce se připraví 0,2M NaOH a připraví se sekvenační kit Illumina, který se nechá temperovat při pokojové teplotě. Pomocí změřené koncentrace finální knihovny a její průměrné délky se vypočítá molarita. Knihovna se naředí tak, aby byla její výsledná koncentrace 4nM a výsledný objem byl vyšší než 5 μ l.

Ze 4 nM směsi se odpipetuje 5 μ l do nové zkumavky a přidá se 5 μ l 0,2M NaOH, pro každou knihovnu zvlášť (v případě sekvenace více knihoven) a jednou pro kontrolní knihovnu PhiX (PhiX z již připravené, rozmražené směsi; jedná se o definovanou knihovnu, která slouží pro kontrolu průběhu sekvenace). Tyto směsi se nechají denaturovat 5 minut.

Všechny denaturované vzorky (10 μ l) se přenesou do zkumavky s připraveným HT1 pufrů (990 μ l), čímž vzniknou 20pM ředěné denaturované knihovny. Denaturované vzorky se pipetují dohromady dle požadavků pro příslušnou použitou sekvenační chemii, čímž se získá finální směs pro sekvenaci. Celý objem připravené směsi se přepipetuje do sekvenační kazety s chemikáliemi, vloží se společně se sekvenačním pufrů a sekvenační destičkou do sekvenátoru a spustí se sekvenační běh dle připraveného sample sheetu.

Analýzu hrubých sekvenačních DNA dat pomocí software NextGENe a kompletní analýzu sekvenačních dat (DNA i RNA) pomocí software CLC Genomics Workbench zajišťují VŠ pracovníci Laboratoře molekulární patologie 1. LF UK a VFN v Praze.

4.2.1.4. Postup NGS analýzy RNA Sequence Capture (Somatic)

Masivním paralelním sekvenováním metodou RNA Sequence Capture se detekují a analyzují fúze v prediktorových a jiných genech na úrovni RNA pomocí syntézy komplementární DNA (cDNA). cDNA z celkové RNA a její hybridizace se specifickými sondami umožňuje získání cílových oblastí.

NGS RNA metodou SEQUENCE CAPTURE (SOMATIC) se shoduje téměř v celém postupu s NGS DNA SEQUENCE CAPTURE (SOMATIC). Po fragmentaci 300 ng celkové RNA (s 5 µl FPE pufru při teplotě 85 °C po dobu 5 minut) se syntetizuje první řetězec cDNA (1st Strand Synthesis). Ke vzorkům na ledu se připipetuje směs 1st Strand Synthesis Buffer (4,5 µl) a Script reverzní transkriptázy (0,5 µl). Plato se vloží do termocykleru a pustí se protokol pro syntézu prvního řetězce cDNA (25 °C – 10 minut; 42 °C – 15 minut; 70 °C – 15 minut). Poté se vyndá plato se vzorky, vloží se zpátky na led. A dále se syntetizuje druhý řetězec cDNA (2nd Strand Synthesis) při kterém se provádí zároveň a A-tailing. Do plata se vzorky se přidá 15 µl předem připravené směsi 2nd Strand Marking pufru (14 µl) se 2nd Strand Synthesis and A-tailing enzyme mix (1 µl), směs se promíchá pomocí vortexu a krátce stočí. Poté se vloží do termocykleru a pustí se příslušný program (16 °C – 30 minut; 62 °C – 10 minut). V reakci se tak vytvoří druhý řetězec cDNA s A přesahy, čímž docílíme vyšší stability syntetizované cDNA.

Po syntéze druhého řetězce následuje ligace adaptorů, stejně jako v protokolu přípravy NGS DNA. Všechny následující kroky probíhají identicky s rozdílem množství cyklů tzv. 1. PCR, kterých je v případě RNA 11.

5. Použitý panel protilátek

Vzhledem k nízké incidenci těchto typů nádoru, je práce zaměřena na imunohistochemický profil, který by mohl být zásadní nejen pro diferenciální diagnostiku, ale také by mohl sloužit pro vyhodnocení prognózy, predikci odpovědi na léčbu a nastavení optimální terapie. Imunohistochemický profil je zároveň doplněn o molekulárně genetická vyšetření. Tabulka 1. obsahuje použité protilátky, včetně zavedených protokolů.

Protilátka	Klon	Výrobce	Katalog. č.	Ředění	Odhalení
CD 56	123C3.D5	Zeta Corporation	Z2038	1:25	nízké pH
Synapto	DAK-SYNAP	Dako	M7315	1:200	vysoké pH
Chromo	LK2H10	Zytomed	MSK062-05	1:400	nízké pH
INSM 1	A-8	Santa Cruz	Sc-271408	1:500	vysoké pH
CK 17	E3	Zeta Corporation	Z2254	1:200	Ventana
L1CAM	UJ127	Invitrogen	MA5-14140	1:100	Ventana
MLH1	G168-15	Zytomed	MSK045-15	1:50	vysoké pH
MSH2	FE11	Zytomed	MSK031-15	1:50	vysoké pH
MSH6	44	Cell Marque	287M-15	1:50	vysoké pH
PMS2	EP51	Dako	IR087	RTU	nízké pH
NTRK	EPR17341	Abcam	Ab181560	1:100	Ventana
p53	DO7	Dako	M7001	1:400	Ventana
IMP2	OT13F9	Novus Bio	NBP2-02627	1:200	Ventana
IMP2	EPR6741(B)	Abcam	Ab124930	1:100	Ventana
IMP3	69.1	Dako	M3626	1:200	vysoké pH

Tabulka 1.: Protokoly panelu protilátek

Zdroj: Ústav patologie I. LF a VFN v Praze

Imunoterapie vedla k podstatným změnám v léčbě zhoubných nádorů a je trvale oblíbeným tématem výzkumu, protože mohou zlepšovat účinnost léčby a přežití pacientů s různými typy nádorů. Bohužel pouze malá část je citlivá na imunoterapii a specifické biomarkery jsou potřeba k oddělení pacientů reagujících na léčbu od nereagujících. (ZHAO, 2019)

V posledních letech se ukázalo, že u nádorů ovaria je změněno mnoho epigenetických regulátorů, včetně EZH2, SMARCA2/4 a ARID1A. Stejně tak je tomu u většiny jiných novotvarů. Narušení epigenetických regulátorů často vede ke ztrátě transkripční kontroly a narušení apoptotických a proliferčních drah. Tyto epigenetické změny jsou zvláště slibnými cíli terapie, protože jsou do značné míry reverzibilní.

Epigenetika, reverzibilní modifikace jak DNA, tak histonů, reguluje základní geny a narušení mechanismu vede k aberantní aktivaci/represi klíčových genů souvisejících se vznikem nádoru. (COUGHLAN, 2021)

6. Výsledky

Analýze byly podrobeny nádory LGSC a OCCC. Do kontrolní skupiny byly zařazeny HGSC, který je dobře prozkoumán, a S-BOT, z něhož LGSC vychází.

V tabulce 2. je uveden věk pacientek v době diagnózy. Věkové rozmezí pacientek, zařazených do studie, bylo u HGSC 36-81 let (průměrný věk 59,6 let, medián 60 let), u LGSC 19-83 let (průměrný věk 52 let, medián 55 let), u S-BOT 25-85 let (průměrný věk 50,5 let, medián 49 let) a u OCCC 34-87 (průměrný věk 61,1 let, medián 62 let). Z výsledků je patrné, že průměrný věk žen u LGSC a S-BOT je o 5-10 let nižší, a tedy postihují častěji mladší ženy než HGSC a OCCC. Věk některých pacientek nebyl znám, a proto jsou v tabulce uvedeny v kolonce „NA“.

Typ	Rozmezí	Průměr	Medián	NA
HGSC	36-81	59,6	60	0
LGSC	19-83	52	55	8
S-BOT	25-85	50,5	49	9
OCCC	34-87	61,1	62	2

Tabulka 2.: Věk pacientek v době diagnózy v závislosti na typu nádoru

Zdroj: Ústav patologie I. LF a VFN v Praze

V grafu č. 1. a tabulce č. 3. jsou znázorněny souhrnné výsledky imunohistochemického vyšetření LGSC a OCCC, včetně kontrolních skupin HGSC a S-BOT.

Do studie bylo zařazeno 114 pacientek s dg. HGSC, 101 pacientek LGSC, 43 pacientek S-BOT a 124 pacientek OCCC. U většiny markerů bylo hodnoceno jednak procento pozitivních buněk, jednak intenzita exprese, a to čtyřstupňovým systémem (0 = negativní, 1+ = slabá exprese, 2+ = středně silná exprese a 3+ = silná exprese). V případě exprese proteinů MMR bylo hodnocení dvoustupňové: za negativní byly považovány nádory s kompletní ztrátou exprese daného proteinu, ostatní byly řazeny mezi pozitivní. Exprese p53 může mít charakter aberantní, či wild-type, jak bylo uvedeno výše.

Z neuroendokrinních markerů (CD56, Chromogranin A, Synaptofyzin a INSM 1), byl nejvíce exprimován marker CD56, a to u kontrolní skupiny HGSC (31,58 % případů). U HGSC, LGSC a S-BOT byly pozorovány převážně slabé až středně silné exprese CD56.

U OCCC bylo zaznamenáno malé procento pozitivních případů, ale jednotlivé stupně intenzity byly zastoupeny rovnoměrně. Expres synaptofyzinu byla u všech typů nádorů velmi nízká, nejvíce bylo zaznamenáno 5,05 % LGSC s nečetnými slabě až středně silně pozitivními buňkami (do 5 %). Chromogranin A byl nejvíce exprimován u OCCC (11,29 %), přičemž u většiny z nich (10,48 %) jsme pozorovali silnou intenzitu. U ostatních typů nádorů byl chromogranin A zastižen jen v malém procentu, a to povětšinou slabě až středně silně. Marker INSM 1 nejvíce exprimovala skupina HGSC (17,54 %), největší zastoupení měly slabě pozitivitu. Ostatní nádory byly pozitivní jen v malém procentu, u OCCC byly obdobně jako u CD56 jednotlivé stupně intenzity zastoupeny rovnoměrně.

CK17 nejvíce exprimovaly skupiny LGSC (72 %) a S-BOT (69,11 %), a to slabě a středně silně intenzivně. Z HGSC bylo pozitivních 16,81 % případů (Obrázek č. 12) a z OCCC 8,06 % případů, v obou nádorech rovněž převážně se slabou a středně silnou intenzitou.

IMP 3 byl prokázán ve velké části všech skupin nádorů. Nejvíce pozitivních případů bylo zaznamenáno u HGSC (77,19 %) a OCCC (68,55 %), které vykazovaly variabilní intenzitu exprese. U LGSC (48 % pozitivních) a S-BOT (46,34 % pozitivních) převažovala slabá intenzita.

IMP 2, oba klony, byly hojně exprimovány u všech skupin nádorů. U HGSC, LGSC a S.BOT se jednalo o 99-100 % případů, u OCCC 91,13 % (klon IMP2/OTI3F9) a 95,16 % (klon IMP2/EPR6741(B)) případů.

Stav MMR proteinů je podrobněji znázorněn v tabulce č. 4. Případy se ztrátou exprese byly pouze ojedinělé. U proteinu MLH1 byla exprese ve 100 % případů LGSC, S-BOT a OCCC a v 98,25 % HGSC. 2 případy (1,75 %) HGSC byly negativní. U proteinu MHS2 byla exprese ve 100 % případů HGSC, LGSC a S-BOT a v 99,19 % OCCC. 1 případ (0,81 %) OCCC byl negativní. U proteinu MSH6 byla exprese ve 100 % u případů HGSC, LGSC a S-BOT a v 98,37 % OCCC. 2 případy (1,63 %) byly negativní. U proteinu PMS2 byla exprese ve 100 % všech nádorů.

Expres NTRK byla prokázána pouze u jednoho případu (0,88 %) HGSC a u dvou případů (1,64 %) OCCC. Všechny LGSC a S-BOT byly negativní.

L1CAM exprimovaly variabilně intenzivně především skupiny HGSC (43 %) a OCCC (27,5 %). Mezi LGSC a S-BOT byly pozitivní ojedinělé případy.

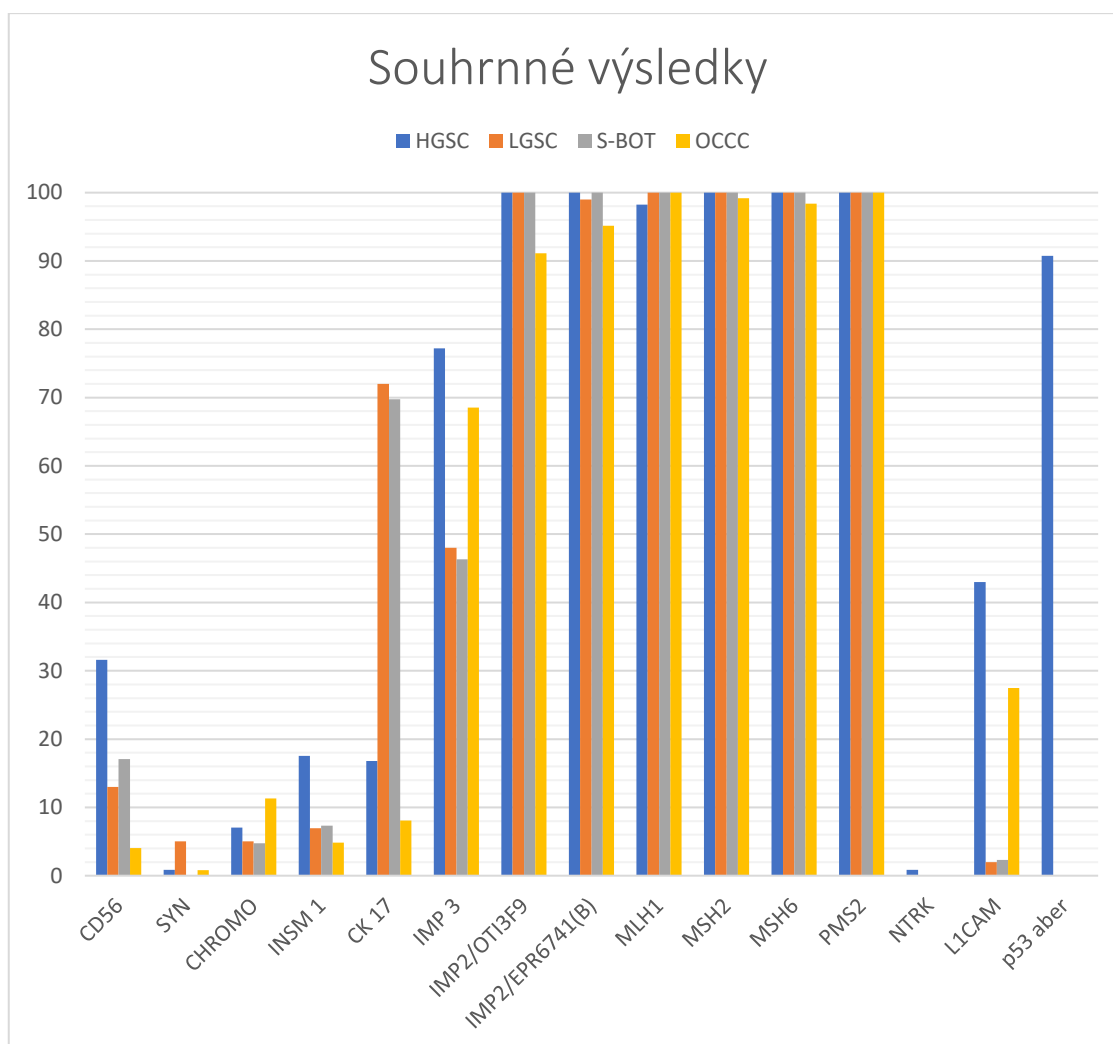
p53 protein byl aberantně exprimován u velké většiny HGSC (90,74 %; Obrázek č. 13) a u minority OCCC (7,38 %). Většinou se jednalo o difuzní silnou pozitivitu (66,67 % HGSC,

5,74 % OCCC), méně často o kompletní ztrátu exprese (24,07 % HGSC, 1,64 % OCCC).
Všechny LGSC a S-BOT vykazovaly wild-type expresi.

	HGSC (n=114)		LGSC (n=101)		S-BOT (n=43)		OCCC (n=124)	
	% celkem	% buněk průměr (rozmezí)	% celkem	% buněk průměr (rozmezí)	% celkem	% buněk průměr (rozmezí)	% celkem	% buněk průměr (rozmezí)
CD56	31,58	25 (0-82)	13	16,2 (2-50)	17,07	2 (1-7)	4,03	50 (10-90)
SYN	0,88	65 (65)	5,05	2,4 (1-5)	0	0	0,81	10 (10)
CHROMO	7,02	27 (1-80)	5,05	3,6 (2-5)	4,76	2 (2)	11,29	20,1 (1-60)
INSM 1	17,54	9,7 (1-30)	6,93	9,7 (1-45)	7,32	2 (2)	4,84	9 (3-30)
CK 17	16,81	12,8 (1-60)	72	16,1 (1-95)	69,77	4,6 (1-30)	8,06	11 (1-75)
IMP 3	77,19	59,5 (2-100)	48	14,6 (1-100)	46,34	19,4 (1-100)	68,55	62,2 (5-100)
IMP2/OTI3F9	100	91,4 (5-100)	100	88 (3-100)	100	98,4 (53-100)	91,13	81,3 (1-100)
IMP2/EPR6741	100	92,6 (10-100)	99	89,9 (2-100)	100	99,3 (90-100)	95,16	88 (1-100)
MLH1	98,25		100		100		100	
MSH2	100		100		100		99,19	
MSH6	100		98		100		98,37	
PMS2	100		99		100		100	
NTRK	0,88	20 (20)	0	0	0	0	1,64	100 (100)
L1CAM	43	28 (2-100)	1,98	46 (2-90)	2,33	1 (1)	27,5	28,4 (1-90)
p53 aber	90,74		0		0		7,38	

Tabulka 3.: Přehled výsledků imunohistochemického barvení

Zdroj: Ústav patologie I. LF a VFN v Praze



Graf 1.: Souhrnné výsledky imunohistochemického vyšetření LGSC, OCCC a kontrolních skupin HGSC a S-BOT

Zdroj: Ústav patologie 1. LF a VFN v Praze

		MLH1	MSH2	MSH6	PMS2	MSI (NGS)
HGSC	%	1,75	0	0	0	NA
	NA	0	0	0	0	
LGSC	%	0	0	0	0	0
	NA	2	1	3	2	22
S-BOT	%	0	0	0	0	0
	NA	1	1	3	1	11
OCCC	%	0	0,81	1,63	0	3,85
	NA	0	0	1	0	20

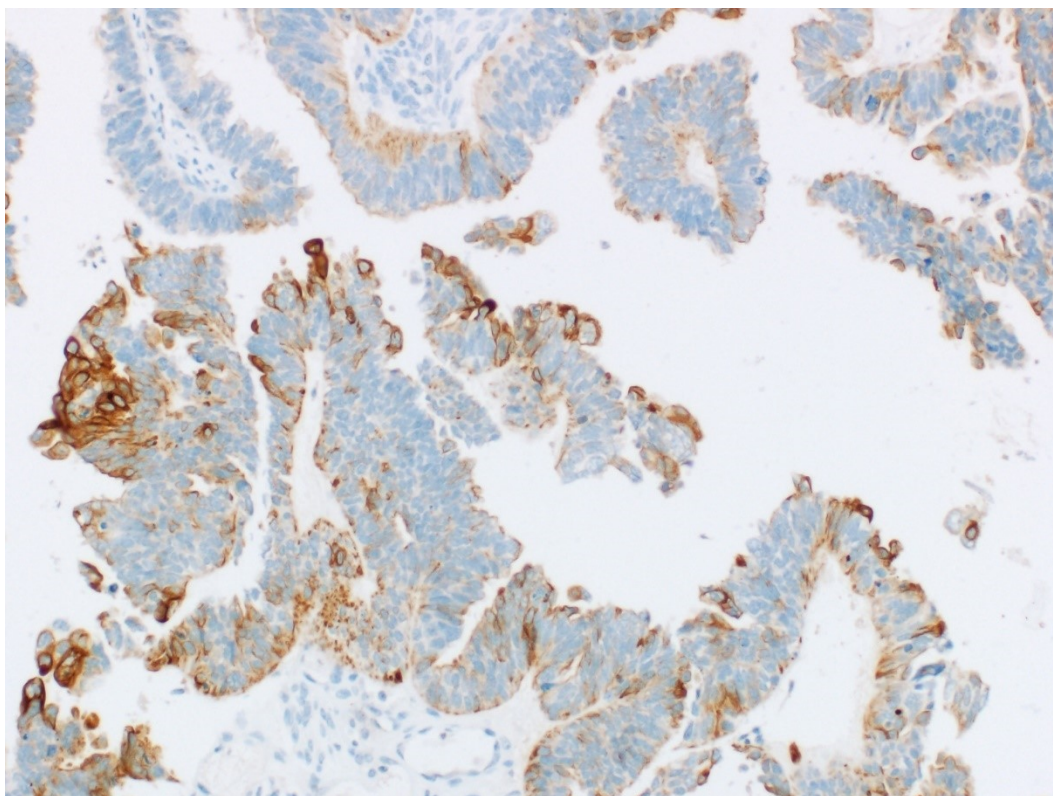
Tabulka 4.: Přehled exprese MMR proteinů a výsledků NGS analýzy. Řádek % uvádí podíl nádorů se ztrátou exprese proteinů a s prokázanou MSI.

Zdroj: Ústav patologie 1. LF a VFN v Praze

Molekulárně genetická analýza metodou NGS byla provedena u skupin LGSC, S-BOT a OCCC. V tabulce 4 je uveden přehled výsledků NGS analýzy.

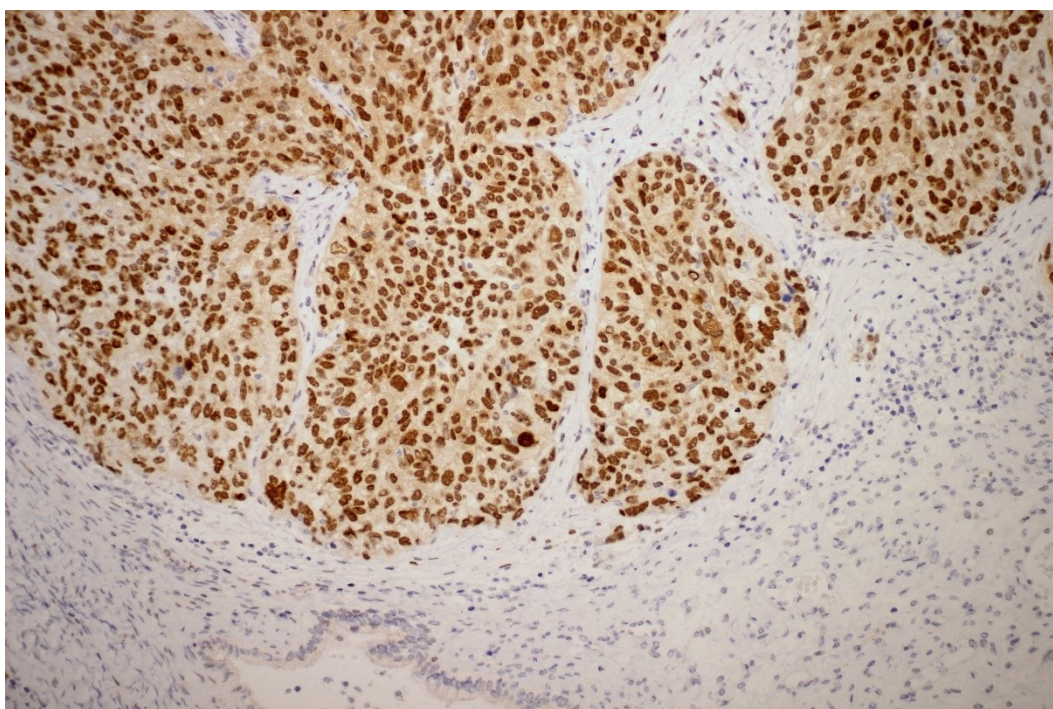
Všechny hodnotitelné případy LGSC a S-BOT byly mikrosatelitově stabilní (MSS). Část případů nebylo možné analyzovat kvůli nízké kvalitě DNA.

U skupiny OCCC 4 případy (3,84 %) vykazovaly mikrosatelitovou instabilitu (MSI-H). 20 případů nebylo možné analyzovat.



Obrázek 12.: CK17 pozitivní buňky v HGSC, 200x

Zdroj: Ústav patologie I. LF a VFN v Praze



Obrázek 13.: p53 pozitivní buňky v HGSC, 200x

Zdroj: Ústav patologie I. LF a VFN v Praze

7. Diskuze

Relativně nízký výskyt low-grade serózního karcinomu ovaria a světlobuněčného nádoru ovaria zapříčinil na dlouhá léta přehlížení těchto nádorů. S nástupem pokročilých technologií je možné mnoho malignit vyšetřit i na molekulární úrovni. Díky tomu jsme schopni nejen diagnostikovat různá onemocnění, ale také poodhalit příčiny vzniku nádorů, určit prognózu a predikovat úspěšnost cílené léčby.

Imunohistochemická analýza vzácných typů nádoru ovaria byla provedena za účelem rozšířit znalostí, které antigeny jsou těmito nádory exprimovány. Dalším cílem této práce bylo zjistit, je-li možné studované markery použít v diferenciaciální diagnóze, případně jako prediktory využitelné k léčbě.

Posledních několik let se onkologie zaměřuje na alternativní terapii nádorů, u nichž konvenční léčba selhává. Cílem je odhalit příčiny vzniku nádorů a novými postupy a léčivy tyto příčiny odstraňovat či inhibovat.

Příkladem jsou proteiny MMR, respektive mikrosatelitová instabilita (MSI), která byla objevena u různých typů solidních nádorů a vyšetřování MMR proteinů je v klinické praxi na vzestupu. Několik klinických studií prokázalo, že narušená oprava chybného párování (dMMR) nebo vysoká mikrosatelitová instabilita (MSI-H) jsou významné pro imunoterapii a lepší prognózou u kolorektálních a nekolorektálních malignit. (ZHAO, 2019) Protilátka proti proteinu programované buněčné smrti-1 (PD-1) je inhibítoem imunitního kontrolního bodu, který spouští protinádorovou odpověď posílením imunitní odpovědi. (LI, 2018) Inhibitory proteinu programované buněčné smrti-1 (anti-PD-1), jako jsou pembrolizumab a nivolumab, byly již schváleny pro léčbu některých solidních tumorů s narušenou MMR/vysokou mikrosatelitovou instabilitou (MSI-H). (ZHAO, 2019) Ačkoliv je protilátka PD-1 účinná u některých maligních nádorů, ani tato léčba není bez rizik. Bylo již popsáno, že může vyvolat významné, imunitně podmíněné nežádoucí účinky, jako je např. autoimunitní diabetes. (LI, 2018)

Studie publikovaná na začátku 2022 naznačuje, že v případě OCCC může mít MSI jen omezený klinický význam pro léčbu a prognózu. (LIU, 2022) Řešitelé se zaměřili na prevalenci mutací genu homologní rekombinace (HRR) a deficitu homologní rekombinace (HRD), která zůstává u tohoto agresivního karcinomu do značné míry neznámá. Porozumění etiopatogeneze tohoto nádoru je zásadní, neboť je méně citlivý na standardní chemoterapii na bázi platiny, má horší prognózu než jiné hlavní histologické podtypy ovariálního

karcinomu, u většiny pacientek s OCCC dochází k recidivě nádoru a terapeutické strategie jsou omezené, zejména u pokročilých nebo recidivujících nádorů. (LIU, 2022)

V naší sestavě jsme prokázali imunohistochemicky ztrátu exprese alespoň jednoho MMR proteinu u ojedinělých případů HGSC a OCCC. 4 případy (3,84 %) OCCC pak vykazovaly mikrosatelitovou instabilitu (MSI-H) při vyšetření metodou NGS. U LGSC nebyla MSI prokázána imunohistochemicky ani pomocí NGS.

Při imunofenotypizaci serózních nádorů ovaria, konkrétně HGSC, se zjistilo, že serózní ovarialní nádory mohou vykazovat neuroendokrinní diferenciaci, často jen v minoritním zastoupení. Neuroendokrinní diferenciace u ovarialních nádorů může mít prognostický význam, neboť exprese těchto proteinů značí nepříznivý vývoj nemoci. (TAUBE, 2015) Na základě tohoto zjištění byl zařazen i neuroendokrinní panel (Synaptofyzin, Chromogranin A, INSM1 a CD56) u LGSC a OCCC.

Nejvíce byly exprimovány CD56 a INSM1 v HGSC (31,58 % a 17,54 % případů) a chromogranin A v OCCC (11,29 % případů). U všech ostatních markerů a nádorů se zastoupení pozitivních případů pohybovalo v rozmezí 0 – 7,32 %.

Byly provedeny studie na pokusných zvířatech, které se zaměřily na léčbu L1CAM pozitivních nádorů. Jednou z možností je použití monoklonálních protilátek. Anti-L1 monoklonální protilátky působí prostřednictvím imunologického a neimunologického efektorového mechanismu a vedly k blokování růstu nádoru. Protilátky proti L1CAM by se tedy mohly stát užitečnými nástroji pro terapii L1-pozitivních karcinomů. (WOLTERINK, 2010)

L1CAM je často spojován s endometroidním karcinomem ovaria. Již proběhlo několik studií, které se zaměřily na klinicko-patologický význam exprese tohoto proteinu. Například publikace z roku 2017 (SOOVARES, 2017) byla zaměřena na porovnání významu exprese u endometroidního (EC) a světlobuněčného karcinomu ovaria (OCCC). Výsledky naznačují, že významným prognostickým markerem by L1CAM mohl být právě u EC, ale ne u OCCC. Autoři publikace poukazují na fakt, že pozitivita L1CAM v OCCC není asociována s velikostí nádoru a exprese proteinu také nebyla asociována s odezvou na primární léčbu. Autoři druhé publikace (VAN GOOL, 2016) hodnotili vztah exprese L1CAM a mutovaného proteinu p53 u endometroidního karcinomu ovaria. Výsledky naznačují, že by zvýšená exprese L1CAM mohla mít silný vztah s p53. Je tedy možné, že právě proto exprese L1CAM u OCCC není využitelná jako prognostický marker, neboť OCCC neexprimuje p53

v mutované formě. Naše výsledky ukazují vyšší pozitivitu L1CAM u OCCC a HGSC, který také často exprimuje p53 v aberantní podobě jako EC.

Léčba pacientů s NTRK pozitivními karcinomy spočívá v podávání inhibitorů TRK první generace, jako je larotrektrinib nebo entrektinib. Léčba je spojena s vysokou mírou odpovědi (>75 %), bez ohledu na histologický typ nádoru. Inhibitory TRK první generace jsou většinou pacientů dobře snášeny. Navzdory trvalé kontrole onemocnění u mnoha pacientů se nádory s pozitivní fúzí NTRK v pokročilém stadiu nakonec stanou odolnými vůči inhibici TRK. Rezistence může být dána získáním mutací NTRK kinázové domény. Určité rezistentní mutace by mohly být překonány inhibitory TRK druhé generace, včetně LOXO-195 a TPX-0005, které jsou zkoumány v klinických studiích. (COCCO, 2018)

Genová fúze NTRK má onkogenní potenciál, nicméně u gynekologických nádorů je vzácná. Výsledky v naší studii byly také negativní u LGSC, S-BOT i OCCC. Pouze jeden případ z kontrolní skupiny HGSC vykazoval slabou pozitivitu.

V současnosti probíhají studie, které se zaměřují na IMP2, jako na potenciální cíl při léčbě nádorů. Na buněčných kulturách se prokázalo, že u buněk s vyřazeným genem IMP2 došlo ke snížení jejich životaschopnosti, migrace a proliferace. Některá potencionální testována léčiva vykazovala in vitro biologickou účinnost a specificitu. Nejúčinnější sloučeniny byly také testovány in vivo a u pokusných zvířat vedly k inhibici růstu nádorových buněk. Na základě těchto výsledků se zdá, že by IMP2 mohl být využitelný pro cílenou léčbu. (DAHLEM, 2022)

Antigeny IMP2 a IMP3 pomáhají v endometriu odlišit serózní karcinomy, které jsou pozitivní, od ostatních karcinomů, které proteiny IMP neexprimují. Cílem tedy bylo zjistit, zda je možné tyto markery použít i v případě ovarialních nádorů. Vyšetření LGSC a OCCC, včetně kontrolních skupin (S-BOT a HGSC) ukázaly vysokou expresi ve všech vyšetřovaných nádorech. Specifickou inhibicí proteinů IMP by mohlo dojít potlačení růstu nádoru.

CK17 je exprimován různých typech nádorů (např. dutiny ústní, prsu). U některých z nich, např. u nádorů pankreatobiliárního traktu, zatím není znám specifický marker. Zajímalo nás tedy, zda tento marker mohl napomoci v diferenciální diagnostice primárních nádorů ovaria od metastáz nádorů pankreatobiliárního traktu.

V naší sestavě byla pozitivní velká část LGSC (72 %) a S-BOT (69,11 %), mezi HGSC a OCCC se jednalo o 16,81 % a 8,06 % případů. CK17 by tedy mohl být využit jako

pomocný marker v odlišení metastáz od HGSC a OCCC, nicméně nezbytné je jeho hodnocení v kontextu s dalšími imunohistochemickými vyšetřeními.

8. Závěr

Diplomová práce byla zaměřena na imunohistochemickou a molekulárně genetickou analýzu vzácných typů nádorů ovaria. Úkolem bylo vyšetřit vybrané imunohistochemické markery a jejich expresi v nádorové tkáni. Molekulárně genetická analýza sekvenováním nové generace měla za úkol prozkoumat případné odchylky v MMR proteinech.

Vyšetřením nových markerů u vzácných typů nádorů ovaria mohou mít zásadní vliv na diagnostiku a onkologům mohou poskytovat cenné informace, které se uplatní v terapii. Zároveň nabízejí cesty, kterými by se mohl ubírat výzkum zaměřený na nové trendy v léčbě.

9. Zkratky

ARID1A	(<u>A</u> T- <u>R</u> ich <u>I</u> nteractive <u>D</u> omain-containing protein <u>1A</u>) protein, který je součástí velkého komplexu remodelace chromatinu závislého na ATP SWI/SNF, jenž je nezbytný pro transkripční aktivaci genů
BBM	<u>B</u> anka <u>B</u> iologického <u>M</u> ateriálu
Bcl-2	(<u>B</u> - <u>C</u> ell <u>L</u> ymphoma – <u>2</u>) antiapoptotický protein
BRAF	(v- <u>r</u> af murine sarcoma viral oncogene homolog <u>B</u>) lidský gen, který kóduje protein nazývaný B-Raf
BRCA1	(<u>B</u> Reast <u>C</u> Ancer <u>1</u>) tumor supresorový gen, účastní se kontroly buněčného cyklu a oprav poškozené DNA
BRCA2	(<u>B</u> Reast <u>C</u> Ancer <u>2</u>) tumor supresorový gen, účastní se kontroly buněčného cyklu a oprav poškozené DNA
CD56	(<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation <u>56</u>) antigen, exprimovaný NK buňkami, myoblasty, některými aktivovanými T lymfocyty a nervovými buňkami
cDNA	<u>k</u> omplementární <u>D</u> N <u>A</u>
CK17	(<u>C</u> yto <u>K</u> eratin 17) antigen exprimován bazálními buňkami různých epitelů
DAB	(<u>D</u> iaminobenzidin) chromogen pro imunohistochemické vyšetření
ddH ₂ O	čištěná voda vysoké kvality (<u>d</u> ouble- <u>d</u> istilled Water)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (<u>D</u> eoxyribonucleic <u>A</u> cid)
EC	(Ovarian <u>E</u> ndometrid <u>C</u> arcinoma) endometroidní karcinom ovaria
EZH2	(<u>E</u> nhancer of <u>Z</u> este <u>H</u> omolog <u>2</u>) histone-lysine N-methyltransferase enzym

HGSC	(<u>H</u> igh <u>G</u> rade <u>S</u> erous <u>C</u> arcinoma) high grade serózní karcinom
IHC	<u>I</u> munohistochemie
IMP2	(<u>I</u> nsulin-like growth factor II <u>m</u> RNA binding <u>p</u> rotein <u>2</u>) proteiny vázající RNA (RBP), které regulují genovou expresi
IMP3	(<u>I</u> nsulin-like growth factor II <u>m</u> RNA binding <u>p</u> rotein <u>3</u>) proteiny vázající RNA (RBP), které regulují genovou expresi
INSM1	(insulinoma-associated protein 1) transkripční faktor s motivem zinkového prstu, který byl izolován z lidského inzulinomu
KRAS	(<u>K</u> irsten <u>r</u> at <u>s</u> arcoma virus oncogene homolog) onkogen, kódující protein důležitý pro intracelulární signalizaci
L1CAM	(<u>L</u> 1 <u>C</u> ell <u>A</u> dhesion <u>M</u> olecule) hraje důležitou roli při vývoji nervového systému. Je exprimován i v nádorové tkáni
LGSC	(<u>L</u> ow <u>G</u> rade <u>S</u> erous <u>C</u> arcinoma) low grade serózní karcinom
MLH1	(<u>M</u> ut <u>L</u> <u>H</u> omolog <u>1</u>) protein MMR komplexu
MMR	(<u>M</u> ismatch <u>R</u> epair) oprava chybného párování DNA
MSH2	(<u>M</u> ut <u>S</u> <u>H</u> omolog <u>2</u>) protein MMR komplexu
MSH6	(<u>M</u> ut <u>S</u> <u>H</u> omolog <u>6</u>) protein MMR komplexu
MSI	<u>M</u> ikrosatelitová <u>I</u> nstabilita
NA	(<u>N</u> ot <u>A</u> vailable) není k dispozici
NaOH	Hydroxid sodný
NGS	(<u>N</u> ext <u>G</u> eneration <u>S</u> equencing) sekvenování nové generace
NK buňky	(<u>N</u> atural <u>K</u> illers) buňky přirozené imunity

NTRK	(<u>N</u> eurotrophic <u>T</u> yrosine <u>R</u> eceptor <u>K</u> inase) neutrofinové kinázy tyrosinových receptorů
OCCC	(<u>O</u> varian <u>C</u> lear <u>C</u> ell <u>C</u> arcinoma) světlobuněčný karcinom ovaria
p53	Protein p53, exprimován genem TP53, který patří mezi tumor supresorové geny.
PAX8	Protein, který je exprimován především tkáněmi vnitřního ženského genitálu a ledvin, včetně nádorů z nich vznikajících (<u>P</u> aired <u>B</u> ox <u>P</u> rotein <u>8</u>)
PCR	(<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction) Polymerázová řetězová reakce
PD-1	(<u>P</u> rogramed cell <u>d</u> eath <u>1</u>) receptor na povrchu buněk imunitního systému
PI3K	(<u>P</u> hosphatidylinositol- <u>3</u> - <u>k</u> inase) katalyzuje navázání fosfátové skupiny na inositolový kruh fosfatidylinositidů. Změny hladin ovlivňují vlastnosti membrán i proteinů a signálních drah.
PMS2	(<u>P</u> ostmeiotic <u>S</u> egregation <u>2</u>) protein MMR komplexu
RNA	(<u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid) Ribonukleová kyselina
S-BOT	<u>S</u> erózní <u>B</u> orderline <u>O</u> variální <u>T</u> umor
SMARCA4	SMARCA4, také známý jako BRG1, slouží jako transkripční faktor
STIC	<u>S</u> erózní tubární intraepiteliální karcinom
TMA	(<u>T</u> issue <u>M</u> icroarray) tkáňové mikročipy
WHO	(<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganization) Světová zdravotnická organizace
WT	(<u>W</u> ild- <u>T</u> ype) nezmutovaný typ
WT1	(<u>W</u> ilms <u>T</u> umor <u>1</u>) protein má v buňce funkci tumor supresorového transkripčního faktoru

10. Seznam literatury

ABBEHAUSEN, C. Zinc finger domains as therapeutic targets for metal-based compounds – an update. *Metallomics* [online]. 2019, 11(1), 15-28 [cit. 2022-03-26]. ISSN 1756-5901. Dostupné z: doi:10.1039/C8MT00262B

AGILENT PT Link <https://www.agilent.com/en/product/pt-link-for-pre-treatment/pt-link-accessories>

AL HARBI, Rehab, Iain A MCNEISH a Mona EL-BAHRAWY. Ovarian sex cord-stromal tumors: an update on clinical features, molecular changes, and management. *International Journal of Gynecologic Cancer* [online]. 2021, 31(2), 161-168 [cit. 2022-02-09]. ISSN 1048-891X. Dostupné z: doi:10.1136/ijgc-2020-002018

ALTEVOGT, Peter, Kai DOBERSTEIN a Mina FOGEL. L1CAM in human cancer. *International Journal of Cancer* [online]. 2016, 138(7), 1565-1576 [cit. 2022-03-14]. ISSN 00207136. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.29658

AMATU, Alessio, Andrea SARTORE-BIANCHI a Salvatore SIENA. NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open* [online]. 2016, 1(2) [cit. 2022-03-13]. ISSN 20597029. Dostupné z: doi:10.1136/esmoopen-2015-000023

BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. *Memorix histologie*. (str. 384) 2. vydání. Praha: Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-249-7.

BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. *Memorix histologie*. (str. 387) 2. vydání. Praha: Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-249-7.

BEHJATI, Sam a Patrick S TARPEY. What is next generation sequencing?. *Archives of disease in childhood - Education & practice edition* [online]. 2013, 98(6), 236-238 [cit. 2022-02-24]. ISSN 1743-0585. Dostupné z: doi:10.1136/archdischild-2013-304340

COCCO, Emiliano, Maurizio SCALTRITI a Alexander DRILON. NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* [online]. 2018, 15(12), 731-747 [cit. 2022-03-26]. ISSN 1759-4774. Dostupné z: doi:10.1038/s41571-018-0113-0

CORTES-CIRIANO, Isidro, Sejoon LEE, Woong-Yang PARK, Tae-Min KIM a Peter J. PARK. A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. *Nature Communications* [online]. 2017, 8(1) [cit. 2022-03-13]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms15180

CORTI, Angelo. Chromogranin A and the Tumor Microenvironment. *Cellular and Molecular Neurobiology* [online]. 2010, 30(8), 1163-1170 [cit. 2022-03-14]. ISSN 0272-4340. Dostupné z: doi:10.1007/s10571-010-9587-8

COUGHLAN, Aisling Y. a Giuseppe TESTA. Exploiting epigenetic dependencies in ovarian cancer therapy. *International Journal of Cancer* [online]. 2021, 149(10), 1732-1743 [cit. 2022-03-26]. ISSN 0020-7136. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.33727

DAHLEM, Charlotte, Ali ABUHALIEMA, Sonja M. KESSLER, et al. First Small-Molecule Inhibitors Targeting the RNA-Binding Protein IGF2BP2/IMP2 for Cancer Therapy. *ACS Chemical Biology* [online]. 2022, 17(2), 361-375 [cit. 2022-03-17]. ISSN 1554-8929. Dostupné z: doi:10.1021/acscchembio.1c00833

DAI, Ning, Fei JI, Jason WRIGHT, Liliana MINICHIELLO, Ruslan SADREYEV a Joseph AVRUCH. IGF2 mRNA binding protein-2 is a tumor promoter that drives cancer proliferation through its client mRNAs IGF2 and HMGA1. *ELife* [online]. 2017, 6 [cit. 2022-03-17]. ISSN 2050-084X. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.27155

DEGRAUWE, Nils, Mario-Luca SUVÀ, Michalina JANISZEWSKA, Nicolo RIGGI a Ivan STAMENKOVIC. IMPs: an RNA-binding protein family that provides a link between stem cell maintenance in normal development and cancer. *Genes & Development* [online]. 2016, 30(22), 2459-2474 [cit. 2022-03-13]. ISSN 0890-9369. Dostupné z: doi:10.1101/gad.287540.116

DELLINO, Miriam, Erica SILVESTRIS, Vera LOIZZI, Angelo PARADISO, Rosalia LOIACONO, Carla MINOIA, Antonella DANIELE a Gennaro CORMIO. Germinal ovarian tumors in reproductive age women. *Medicine* [online]. 2020, **99**(39) [cit. 2022-02-09]. ISSN 0025-7974. Dostupné z: doi:10.1097/MD.00000000000022146

FADARE, Oluwole a Vinita PARKASH. Pathology of Endometrioid and Clear Cell Carcinoma of the Ovary. *Surgical Pathology Clinics* [online]. 2019, **12**(2), 529-564 [cit. 2022-02-10]. ISSN 18759181. Dostupné z: doi:10.1016/j.path.2019.01.009

FERNANDEZ-FLORES, Angel. Cytokeratin 17 immunoexpression in actinic keratosis (bowenoid and nonbowenoid) and in Bowen disease. *Annals of Diagnostic Pathology* [online]. 2016, 20, 1-6 [cit. 2022-03-17]. ISSN 10929134. Dostupné z: doi:10.1016/j.anndiagpath.2015.11.001

FUJIWARA, K., D. SHINTANI a T. NISHIKAWA. Clear-cell carcinoma of the ovary. *Annals of Oncology* [online]. 2016, 27, i50-i52 [cit. 2022-02-10]. ISSN 09237534. Dostupné z: doi:10.1093/annonc/mdw086

GONG, Yuna, Bruce A. WODA a Zhong JIANG. Oncofetal Protein IMP3, a New Cancer Biomarker. *Advances in Anatomic Pathology* [online]. 2014, 21(3), 191-200 [cit. 2022-03-13]. ISSN 1072-4109. Dostupné z: doi:10.1097/PAP.0000000000000021

HAUPTMANN, Steffen, Katrin FRIEDRICH, Raymond REDLINE a Stefanie AVRIL. Ovarian borderline tumors in the 2014 WHO classification: evolving concepts and diagnostic criteria. *Virchows Archiv* [online]. 2017, 470(2), 125-142 [cit. 2022-02-09]. ISSN 0945-6317. Dostupné z: doi:10.1007/s00428-016-2040-8

HUANG, Hongxing, Ying LIU, Xiaoming OUYANG, Hua WANG a Yan ZHANG. Identification of a peptide targeting CD56. *Immunobiology* [online]. 2020, 225(4) [cit. 2022-03-14]. ISSN 01712985. Dostupné z: doi:10.1016/j.imbio.2020.151982

CHEN, Chiachen a Michael S. LAN. A promoter-driven assay for INSM1-associated signaling pathway in neuroblastoma. *Cellular Signalling* [online]. 2020, 76 [cit. 2022-03-26]. ISSN 08986568. Dostupné z: doi:10.1016/j.cellsig.2020.109785

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa, José CARNEIRO a Robert O. KELLEY. *Základy histologie*. (str. 419) Jinočany: H & H, 1997. ISBN 80-85787-37-7.

KANAPATHIPILLAI, Mathumai. Treating p53 Mutant Aggregation-Associated Cancer. *Cancers* [online]. 2018, 10(6) [cit. 2022-03-13]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers10060154

KONRÁDOVÁ, Václava. *Funkční histologie*. (str. 214) 2. vyd. Jinočany: H & H, 2000. ISBN 80-86022-80-3.

KUNKEL, Thomas A. a Dorothy A. ERIE. DNA MISMATCH REPAIR. *Annual Review of Biochemistry* [online]. 2005, 74(1), 681-710 [cit. 2022-03-12]. ISSN 0066-4154. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.biochem.74.082803.133243

LAN, Michael S. a Mary B. BRESLIN. Structure, expression, and biological function of INSM1 transcription factor in neuroendocrine differentiation. *The FASEB Journal* [online]. 2009, 23(7), 2024-2033 [cit. 2022-03-17]. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fj.08-125971

LI, Sicheng, Yi ZHANG, Zhichun SUN, Ji HU a Chen FANG. Anti-PD-1 pembrolizumab induced autoimmune diabetes in Chinese patient. *Medicine* [online]. 2018, 97(45) [cit. 2022-03-27]. ISSN 0025-7974. Dostupné z: doi:10.1097/MD.00000000000012907

LISIO, Michael-Antony, Lili FU, Alicia GOYENECHE, Zu-hua GAO a Carlos TELLERIA. High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences, Clinical and Therapeutic Standpoints. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, 20(4) [cit. 2022-02-09]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20040952

LIU, Hangqi, Zhiwen ZHANG, Longyun CHEN, Junyi PANG, Huanwen WU a Zhiyong LIANG. Next-Generation Sequencing Reveals a Very Low Prevalence of Deleterious Mutations of Homologous Recombination Repair Genes and Homologous Recombination Deficiency in Ovarian Clear Cell Carcinoma. *Frontiers in Oncology* [online]. 2022, 11 [cit. 2022-04-07]. ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2021.798173

MOUJABER, Tania, Rosemary L BALLEINE, Bo GAO, Ida MADSEN, Paul R HARNETT a Anna DEFAZIO. New therapeutic opportunities for women with low-grade serous ovarian cancer. *Endocrine-Related Cancer* [online]. 2022, 29(1), R1-R16 [cit. 2022-03-26]. ISSN 1351-0088. Dostupné z: doi:10.1530/ERC-21-0191

ODA, Katsutoshi, Junzo HAMANISHI, Koji MATSUO a Kosei HASEGAWA. Genomics to immunotherapy of ovarian clear cell carcinoma: Unique opportunities for management. *Gynecologic Oncology* [online]. 2018, 151(2), 381-389 [cit. 2022-03-26]. ISSN 00908258. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygyno.2018.09.001

OREN, M. a V. ROTTER. Mutant p53 Gain-of-Function in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2010, 2(2), a001107-a001107 [cit. 2022-03-12]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a001107

OVARIAN LOW-GRADE AND HIGH-GRADE SEROUS CARCINOMA: Pathogenesis, Clinicopathologic and Molecular Biologic Features, and Diagnostic Problems

PERES, Lauren C., Kara L. CUSHING-HAUGEN, Michael ANGLÉSIO, et al. Histotype classification of ovarian carcinoma: A comparison of approaches. *Gynecologic Oncology*

[online]. 2018, 151(1), 53-60 [cit. 2022-02-07]. ISSN 00908258. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygyno.2018.08.016

PETERSON, Christine M., Celine BUCKLEY, Susan HOLLEY a Christine O. MENIAS. Teratomas: A Multimodality Review. *Current Problems in Diagnostic Radiology* [online]. 2012, 41(6), 210-219 [cit. 2022-02-09]. ISSN 03630188. Dostupné z: doi:10.1067/j.cpradiol.2012.02.001

(PP-PAT-LMP-08) ELEKTROFORÉZA DNA A PCR PRODUKTŮ

(PP-PAT-LMP 29) NGS METODOU DNA SEQUENCE CAPTURE (SOMATIC)

(PP-PAT-LMP 44) NGS METODOU RNA SEQUENCE CAPTURE (SOMATIC)

RAVEH, Shani, Nancy GAVERT a Avri BEN-ZE'EV. L1 cell adhesion molecule (L1CAM) in invasive tumors. *Cancer Letters* [online]. 2009, 282(2), 137-145 [cit. 2022-03-14]. ISSN 03043835. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2008.12.021

REGAUER, S a O REICH. CK17 and p16 expression patterns distinguish (atypical) immature squamous metaplasia from high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Histopathology* [online]. 2007, 50(5), 629-635 [cit. 2022-03-17]. ISSN 0309-0167. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2559.2007.02652.x

RICCI, Francesca, Roberta AFFATATO, Laura CARRASSA a Giovanna DAMIA. Recent Insights into Mucinous Ovarian Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, 19(6) [cit. 2022-02-10]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19061569

ROSENBAUM, Jason N., Zhenying GUO, Rebecca M. BAUS, Helen WERNER, William M. REHRAUER a Ricardo V. LLOYD. INSM1: A Novel Immunohistochemical and Molecular Marker for Neuroendocrine and Neuroepithelial Neoplasms. *American Journal of Clinical Pathology* [online]. 2015, 144(4), 579-591 [cit. 2022-03-17]. ISSN 1943-7722. Dostupné z: doi:10.1309/AJCPGZWXXBSNL4VD

Russell Vang, M.D., Ie-Ming Shih, M.D., Ph.D., and Robert J. Kurman, M.D. *Int J Mol Sci.* 2019 Feb; 20(4): 952.

SALEM, Mohamed E., J. Nicholas BODOR, Alberto PUCCINI, et al. Relationship between MLH1, PMS2, MSH2 and MSH6 gene-specific alterations and tumor mutational burden in 1057 microsatellite instability-high solid tumors. *International Journal of Cancer* [online].

2020, 147(10), 2948-2956 [cit. 2022-03-12]. ISSN 0020-7136. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.33115

SIEMON, John, David M GERSHENSON, Brian SLOMOVITZ a Matthew SCHLUMBRECHT. Low grade serous ovarian carcinoma: identifying variations in practice patterns. *International Journal of Gynecologic Cancer* [online]. 2019, 29(1), 174-180 [cit. 2022-02-10]. ISSN 1048-891X. Dostupné z: doi:10.1136/ijgc-2018-000018

(SM-PAT-03) Validace a verifikace

SOLOMON, James P. a Jaelyn F. HECHTMAN. Detection of NTRK Fusions: Merits and Limitations of Current Diagnostic Platforms. *Cancer Research* [online]. 2019, 79(13), 3163-3168 [cit. 2022-03-12]. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-0372

SOOVARES, Piret, Annukka PASANEN, Ralf BÜTZOW a Heini LASSUS. L1CAM expression associates with poor outcome in endometrioid, but not in clear cell ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology* [online]. 2017, 146(3), 615-622 [cit. 2022-04-07]. ISSN 00908258. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygyno.2017.06.010

(SOP-PAT-03) princip IHC

(SOP-PAT-23) NGS princip

(SOP-PAT-03) IZOLACE A KONTROLA KVALITY DNA

TAKAHASHI, Kazuaki, Masataka TAKENAKA, Aikou OKAMOTO, David D. L. BOWTELL a Takashi KOHNO. Treatment Strategies for ARID1A-Deficient Ovarian Clear Cell Carcinoma. *Cancers* [online]. 2021, 13(8) [cit. 2022-03-26]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers13081769

TAUBE, E. T., C. DENKERT, K. PIETZNER, M. DIETEL, J. SEHOULI a S. DARB-ESFAHANI. Prognostic impact of neuroendocrine differentiation in high-grade serous ovarian carcinoma. *Virchows Archiv* [online]. 2015, 466(3), 333-342 [cit. 2022-04-07]. ISSN 0945-6317. Dostupné z: doi:10.1007/s00428-014-1710-7

TING, Ching-Heng, Tao-Yeuan WANG a Pao-Shu WU. Insulinoma-associated Protein 1 Expression and Its Diagnostic Significance in Female Genital Tract Neuroendocrine Carcinomas. *International Journal of Gynecological Pathology* [online]. 2021, 40(5), 452-459 [cit. 2022-03-17]. ISSN 0277-1691. Dostupné z: doi:10.1097/PGP.0000000000000722

VANG, Russell, Ie-Ming SHIH a Robert J. KURMAN. Ovarian Low-grade and High-grade Serous Carcinoma. *Advances in Anatomic Pathology* [online]. 2009, 16(5), 267-282 [cit. 2022-02-10]. ISSN 1072-4109. Dostupné z: doi:10.1097/PAP.0b013e3181b4fffa

ÚZIS <https://www.uzis.cz/>

VAN GOOL, Inge C, Ellen STELLOO, Remi A NOUT, et al. Prognostic significance of L1CAM expression and its association with mutant p53 expression in high-risk endometrial cancer. *Modern Pathology* [online]. 2016, 29(2), 174-181 [cit. 2022-04-07]. ISSN 0893-3952. Dostupné z: doi:10.1038/modpathol.2015.147

Ventana BenchMark Ultra

<https://diagnostics.roche.com/global/en/products/instruments/benchmark-ultra.html>

VOUTSADAKIS, Ioannis A. Low-grade serous ovarian carcinoma: an evolution toward targeted therapy. *International Journal of Gynecologic Cancer* [online]. 2020, 30(10), 1619-1626 [cit. 2022-03-26]. ISSN 1048-891X. Dostupné z: doi:10.1136/ijgc-2019-000832

WHO <https://www.who.int/>

WOLTERINK, Silke, Gerhard MOLDENHAUER, Mina FOGEL, et al. Therapeutic Antibodies to Human L1CAM: Functional Characterization and Application in a Mouse Model for Ovarian Carcinoma. *Cancer Research* [online]. 2010, 70(6), 2504-2515 [cit. 2022-03-26]. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3730

ZÁMEČNÍK, Josef, ed. *Patologie. Svazek 1.* (str. 181) Praha: LD Prager Publishing, 2019. ISBN 978-80-270-6457-1.

ZÁMEČNÍK, Josef, ed. *Patologie. Svazek 3.* (str. 629) Praha: LD Prager Publishing, 2019. ISBN 978-80-270-6457-1.

ZÁMEČNÍK, Josef, ed. *Patologie. Svazek 3.* (str. 630) Praha: LD Prager Publishing, 2019. ISBN 978-80-270-6457-1.

ZÁMEČNÍK, Josef, ed. *Patologie. Svazek 3.* (str. 631) Praha: LD Prager Publishing, 2019. ISBN 978-80-270-6457-1.

ZÁMEČNÍK, Josef, ed. *Patologie. Svazek 3.* (str. 632) Praha: LD Prager Publishing, 2019. ISBN 978-80-270-6457-1.

ZÁMEČNÍK, Josef, ed. *Patologie. Svazek 3.* (str. 633) Praha: LD Prager Publishing, 2019. ISBN 978-80-270-6457-1.

ZÁMEČNÍK, Josef, ed. *Patologie. Svazek 3.* (str. 634) Praha: LD Prager Publishing, 2019. ISBN 978-80-270-6457-1.

ZÁMEČNÍK, Josef, ed. *Patologie. Svazek 3.* (str. 635) Praha: LD Prager Publishing, 2019. ISBN 978-80-270-6457-1.

ZÁMEČNÍK, Josef, ed. *Patologie. Svazek 3.* (str. 636) Praha: LD Prager Publishing, 2019. ISBN 978-80-270-6457-1.

ZHAO, Pengfei, Li LI, Xiaoyue JIANG a Qin LI. Mismatch repair deficiency/microsatellite instability-high as a predictor for anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy efficacy. *Journal of Hematology & Oncology* [online]. 2019, 12(1) [cit. 2022-03-26]. ISSN 1756-8722. Dostupné z: doi:10.1186/s13045-019-0738-1

3D HISTECH <https://www.3dhistech.com/research/tissue-microarrays/tma-master-2/>

11. Seznam grafů a obrázků

Obrázek 1.: Histologie ovaria, barvení HE, 100x.....	9
Obrázek 2.: Serózní borderline ovariální karcinom (S-BOT), barvení HE, 100x	16
Obrázek 4.: Low grade serózní karcinom (LGSC) barvení HE, 100x.....	17
Obrázek 5.: Světlobuněčný karcinom ovaria (OCCC), barvení HE, 200x	20
Obrázek 6.: Vodní lázně PT Link, Low pH.....	31
Obrázek 7.: IHC komory s preparáty	31
Obrázek 8.: Inkubace protilátek	32
Obrázek 9.: Imunostainer Ventana BenchMark Ultra	32
Obrázek 10.: TMA Master.....	33
Obrázek 11.: Hotový TMA blok.....	33
Obrázek 12.: CK17 pozitivní buňky v HGSC, 200x	49
Obrázek 13.: p53 pozitivní buňky v HGSC, 200x.....	49
Tabulka 1.: Protokoly panelu protilátek	42
Tabulka 2.: Věk pacientek v době diagnózy v závislosti na typu nádoru.....	44
Tabulka 3.: Přehled výsledků imunohistochemického barvení	46
Tabulka 4.: Přehled exprese MMR proteinů a výsledků NGS analýzy	47
Graf 1.: Souhrnné výsledky imunohistochemického vyšetření	47