

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
**Katedra biologických a lékařských věd**

## **Prognostické markery nádoru ovaria**

**bakalářská práce**

**Hradec Králové, 2007**

**Lucie Barvířová**

**Podpořeno grantem IGA MZ NR8363-3/2005**

Děkuji svému školiteli Doc. RNDr. V. Semeckému, CSc. za odborné vedení mé bakalářské práce, za četné rady a mnohé konzultace v průběhu celé práce.

Mé velké díky patří mé školitelce - specialistce MUDr. Markétě Tomšové, Ph.D. Velmi si cením jejích připomínek, rad a hlavně její trpělivosti, kterou mi projevovala při vzniku této práce.

Mé díky také patří prof. MUDr. B. Melicharovi, Ph.D. za pomoc při statistickém zpracování dat a vyhledávání klinických údajů o pacientkách.

Také bych velmi ráda poděkovala celému kolektivu Fingerlandova ústavu patologie Fakultní nemocnice Hradec Králové za podporu nejen při práci na tomto textu.

*Tato práce vznikla za podpory IGA MZ NR8363-3/2005*

## Obsah

1.	Teoretický úvod.....	4
1.1.	Karcinom ovaria.....	4
1.2.	Klasifikace nádorů ovaria.....	6
1.2.1.	Klasifikace nádorů z povrchového epitelu.....	6
1.2.2.	Klasifikace nádorů gonadostromálních.....	11
1.2.3.	Klasifikace nádorů germinálních.....	12
1.2.4.	Klasifikace smíšených germinálních a gonadostromálních nádorů.....	12
1.2.5.	Klasifikace nádorů nespecifických pro ovarium.....	13
1.2.6.	Klasifikace nádorů sekundárních.....	13
1.3.	Grading a staging karcinomu ovaria.....	13
1.3.1.	Grading nádoru.....	13
1.3.2.	Staging nádoru.....	15
1.4.	Prognostické markery stanovitelné imunohistochemicky.....	18
1.4.1.	Průkaz exprese hormonálních receptorů.....	18
1.4.2.	Průkaz proliferační aktivity nádoru.....	19
1.4.3.	Průkaz onkoproteinu HER-2/neu.....	20
1.4.4.	Průkaz onkoproteinů mající vztah k apoptóze.....	21
1.4.5.	Angiogeneze.....	22
1.4.6.	Tumor infiltrující lymfocyty (TIL).....	23
2.	Cíle studie.....	24
3.	Experimentální část.....	25
3.1.	Charakteristika souboru.....	25
3.2.	Histologické vyšetření.....	25
3.3.	Imunohistochemické vyšetření.....	26
3.3.1.	Pomůcky a přístroje.....	26
3.3.2.	Roztoky.....	26
3.3.3.	Pracovní postup.....	27
3.3.4.	Hodnocení imunohistochemické reakce.....	28
3.4.	Statistická analýza dat.....	29
4.	Výsledky.....	30
5.	Diskuze.....	36
6.	Závěr.....	41
7.	Souhrn.....	42
8.	Summary.....	43
9.	Literatura.....	44
10.	Seznam tabulek, grafů a obrázků.....	50
11.	Seznam zkratk.....	51

# 1. Teoretický úvod

## 1.1. Karcinom ovaria

Ovaria (vaječníky) jsou párový orgán uložený v malé pánvi. Dosahují velikosti až 3 cm. Mesovariem jsou připojena k děloze. Na řezu lze rozpoznat kůru a dřeň. V kůře jsou rozloženy oocyty a folikuly v různém stadiu vývoje. Dřeň je tvořena řídkou pojivovou tkání a obsahuje nervy, lymfatické a krevní cévy. Ovaria plní dvě hlavní funkce: 1) produkují ženské pohlavní hormony (estrogeny a progesteron) a 2) dozrávají zde vajíčka (22).

Karcinom ovaria je jedním z nejčastějších nádorových onemocnění u žen (šestým nejčastějším maligním onemocněním u žen na světě), vyskytuje se nejčastěji ve věku 50–70 let. Toto onemocnění je častější u žen žijících ve vyspělých zemích (25). Jeho incidence v České republice v roce 2004 byla 24 případů 100 tisíc žen / rok (58).

Časná stadia karcinomu jsou obvykle asymptomatická. Nádor bývá proto diagnostikován až v pozdějších stadiích, kdy dochází k rozsevu po dutině břišní. Pokročilá onemocnění pak bývají provázena těmito klinickými příznaky: bolesti a vyklenování břicha (způsobeno nádorovým ascitem), hubnutí, bolesti zad apod (32).

Mezi nejznámější rizikové faktory pro vznik ovariálního karcinomu patří nuliparita, časná menarché a pozdní menopauza. Vysoká životní úroveň a s ní související pokles parity je dáována do souvislosti s celosvětově se zvyšující incidencí ovariálního karcinomu. Ochranný význam mají tedy zvyšující se parity, užívání hormonální antikoncepce a chirurgicky navozené protektivní faktory jako např. adnexektomie. Dědičnou formu tohoto nádoru se vyskytuje přibližně u 10% pacientek (21, 24).

Diagnóza se stanoví na základě gynekologického palpačního vyšetření, to však dokáže odhalit až nádor větších rozměrů. Dále se využívá ultrazvukové vyšetření zejména s pomocí vaginální sondy, příp. počítačová tomografie. Ke stanovení diagnózy může přispět též stanovení hladiny nádorového markeru CA 125,

jehož vysoká hladina svědčí pro karcinom. Definitivní diagnosu však dokáže stanovit až histologické vyšetření (32).

Prognosa onemocnění závisí na celé řadě faktorů. Ty zahrnují klinické stadium (tzv. staging), histologický typ nádoru, jeho diferenciaci (tzv. grading), velikost reziduálního tumoru po primární operaci, chybění či přítomnost ascitu, věk a celkový stav pacientky v době diagnózy (4, 7, 8, 9, 11, 27, 48).

V současné době je problém ovariálního karcinomu ve světové literatuře velmi diskutovaným tématem. Existuje velké množství studií, které však často přinášejí rozporuplné údaje. Rozsáhle studovanou oblastí je zejména určení možných prognostických markerů, které by mohly předvídat další vývoj onemocnění a pomoci tak při volbě vhodné protinádorové terapie (36). Mezi intenzivně studované prognostické faktory patří zejména určení proliferační aktivity nádoru: imunohistochemicky pomocí antigenů Ki-67 či topoizomerázy II $\alpha$ , průkaz exprese hormonálních receptorů, markerů apoptózy či jiných onkoproteinů, zejména proteinu HER-2/neu (8, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 28, 37, 51).

Léčebný postup zahrnuje jednak chirurgickou léčbu. Radikální operace se skládá z oboustrané adnexektomie, hysterektomie, omentektomie, paraaortální lymfadenektomie a apendektomie. Pacientky jsou dále léčeny chemoterapií, nejčastěji kombinací platinových preparátů s Taxolem(25).

## **1.2. Klasifikace nádorů ovaria**

Nádory ovaria jsou různorodou skupinou. Dělí se na základě původu z povrchového (coelomového) epitelu, zárodečných buněk, mesenchymu – viz tabulka 1. Nádory se obecně dělí podle svého chování na maligní (zhoubné, karcinomy), na benigní (nezhoubné) a nádory o nízké malignitě (syn. borderline tumors) (23, 32, 47).

**Tabulka 1: Klasifikace nádorů ovaria dle WHO**

I	Nádory z povrchového epitelu
II	Nádory gonadostromální
III	Nádory germinální
IV	Nádory smíšené germinální a gonadostromální
V	Nádory nespecifické pro ovárium (mesenchymální, lymfomy)
VI	Nádory sekundární
VII	Nádory neklasifikovatelné

### **1.2.1. Klasifikace nádorů z povrchového epitelu**

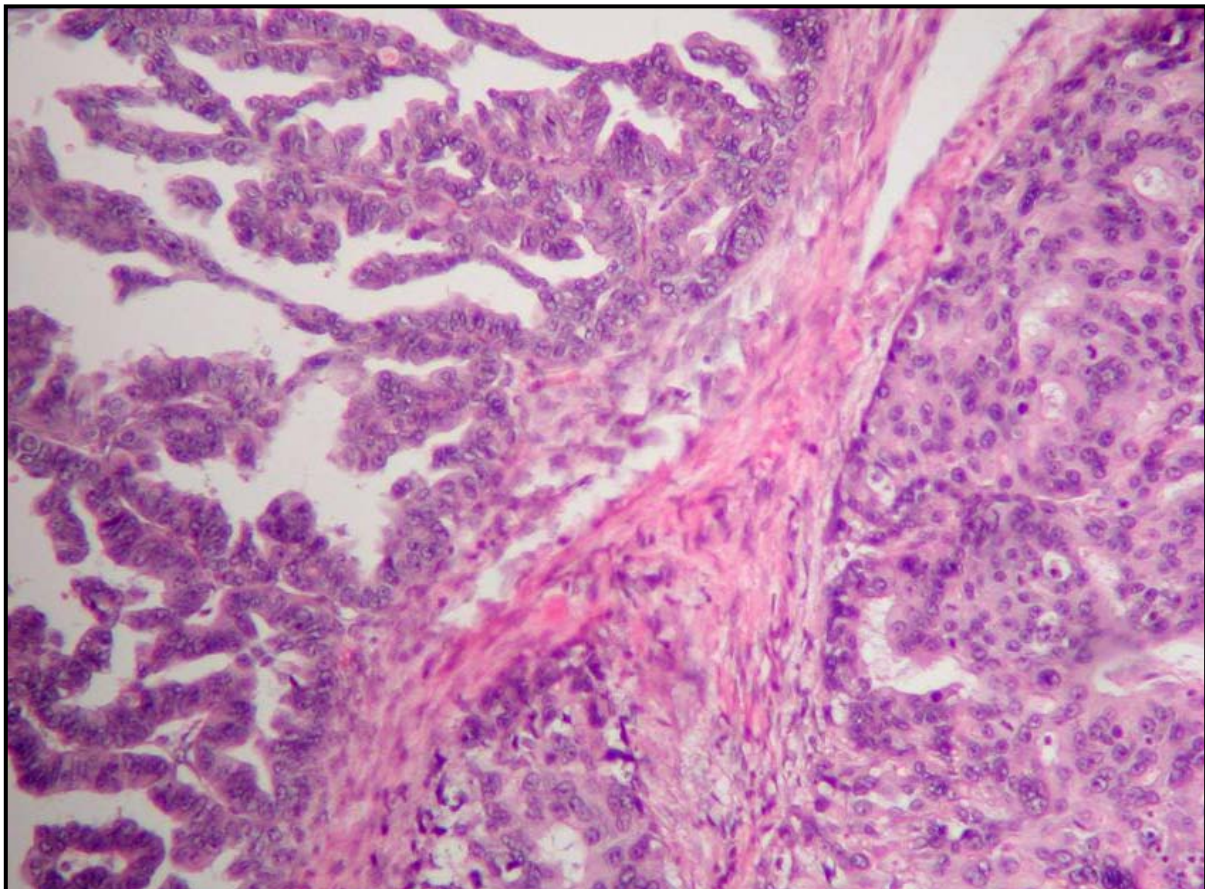
Nádory vznikající z povrchového epitelu tvoří asi polovinu až dvě třetiny všech ovariálních tumorů. Tyto nádory se dále rozdělují podle své diferenciaci nádorových buněk:

- Nádory serózní
- Nádory mucinózní
- Nádory endometroidní
- Nádory světlobuněčné
- Nádory přechodobuněčné
- Nádory dlaždicobuněčné

- Nádory smíšené epiteliální
- Nádory nediferencované

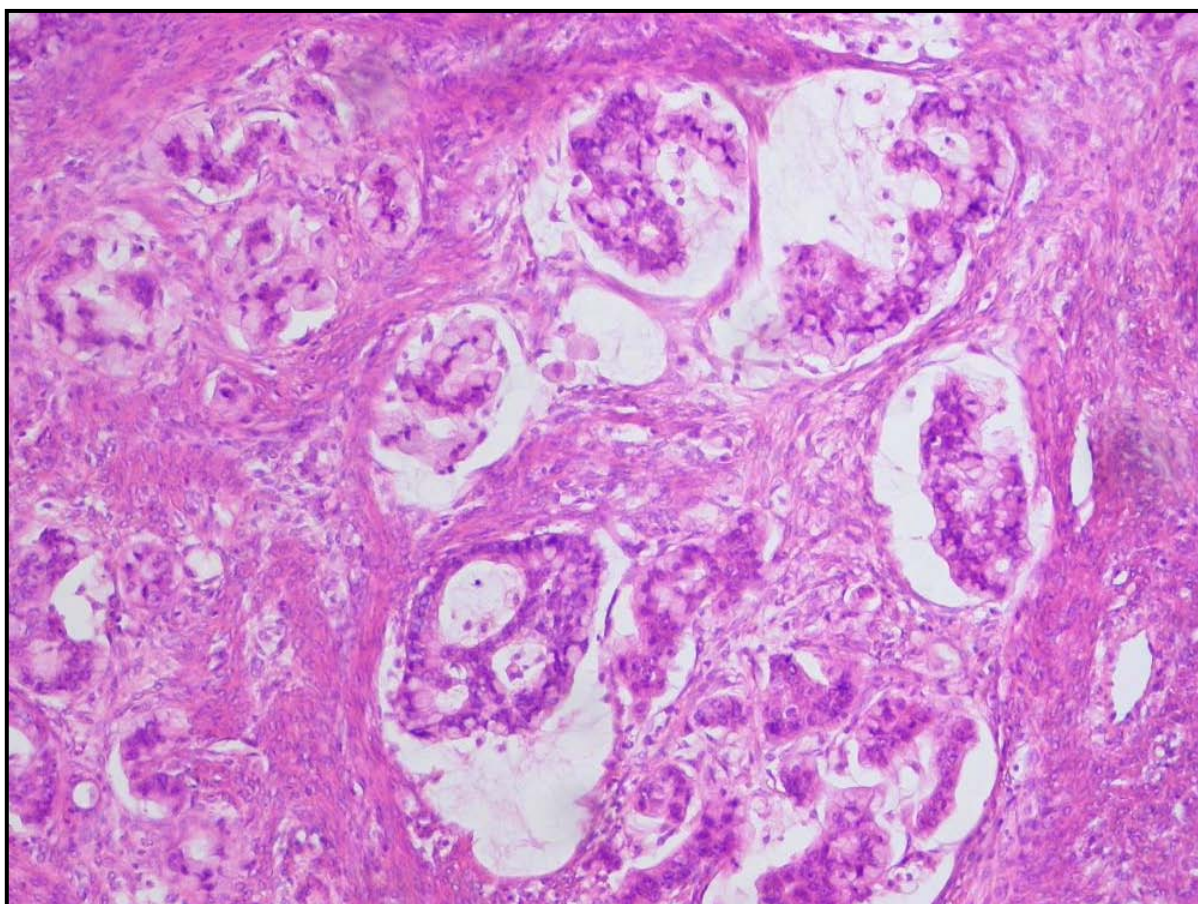
**Serózní** nádory jsou tvořeny plochými, kubickými až nízce cylindrickými buňkami, které mohou mít na povrchu řasinky (zejména u benigní varianty); epitel tak připomíná výstelku vejcovodu. Tyto nádory jsou v ováriu nejčasnější a tvoří až třetinu všech epiteliálních tumorů. Serózní karcinom je nejčastější ovariální karcinom (tvoří asi 50% všech maligních nádorů ovária). V 70 - 80% jsou diagnostikovány v pozdních stádiích. Ve dvou třetinách případů serózní karcinom postihuje obě ovária. Karcinom obvykle vytváří objemné nádory (často až 20 cm v průměru), které jsou multilokulární, cystické s papilárními a solidními ložisky. Histologická stavba je tvořena papilárně a solidně uspořádanými okrsky (47).

**Obr. 1: Serózní karcinom ovária, HE, zvětšeno 200x**



**Mucinózní** nádory tvoří buňky cylindrické obsahující hlen v cytoplazmě. Benigní mucinosní nádory tvoří až 40% všech benigních nádorů ovaria. Naopak mucinózní karcinomy jsou poměrně vzácné. Více jak polovina mucinózních karcinomů je diagnostikována ve I. stádiu a jsou na rozdíl od serózních karcinomů jednostranné. Jde také o objemné nádory, cystické a multilokulární. Histologicky tvoří cystické a glandulární struktury (47).

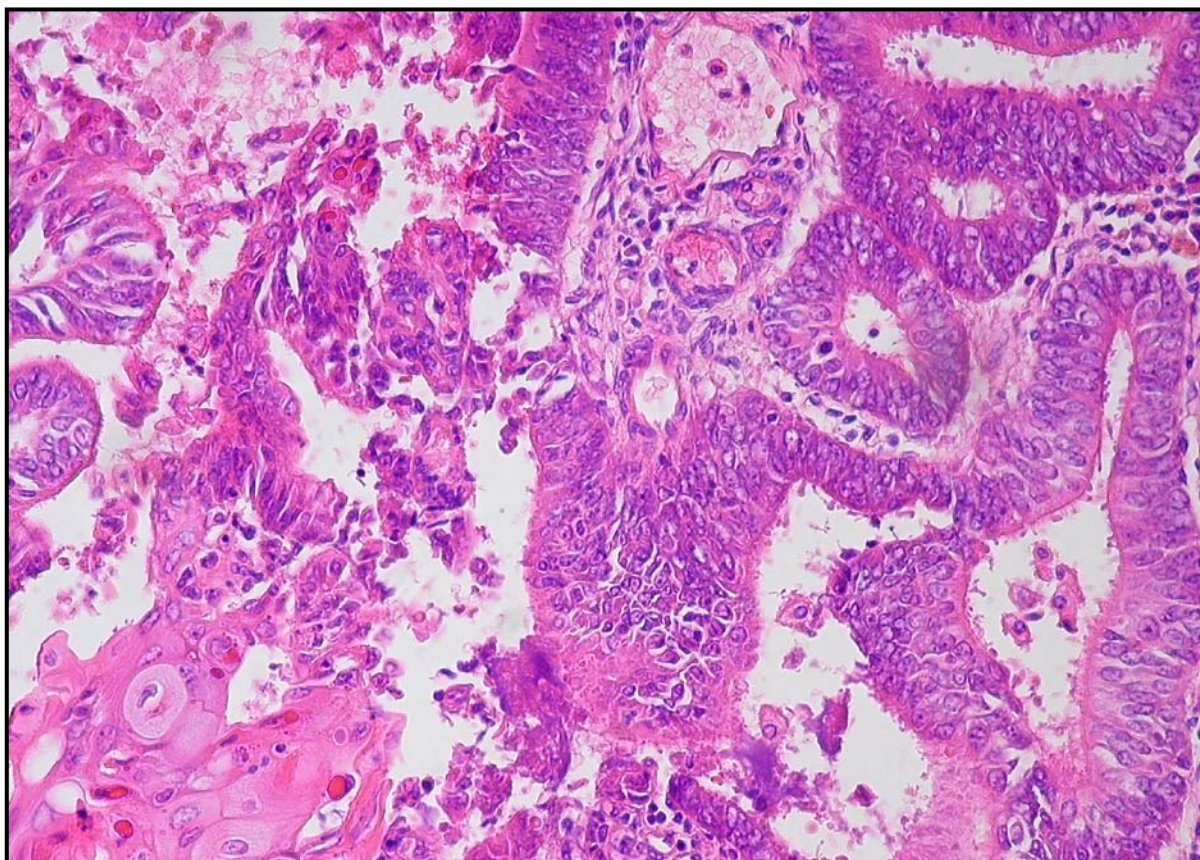
**Obr. 2: Mucinózní karcinom ovária, HE, zvětšeno 200x**





**Endometroidní** nádory jsou charakteristické přítomností epiteliálních elementů, stromálních elementů nebo jejich kombinací a připomínají endometrium. Tyto nádory jsou převážně maligní. Často jsou spojeny s endometriózou buď v ovariu nebo kdekoliv v pánvi, a v 15% - 20% případů též s karcinomem endometria. Histologicky je tvořen žlazovými strukturami (47).

**Obr. 3: Endometroidní karcinom ovária, HE, zvětšeno 400x**

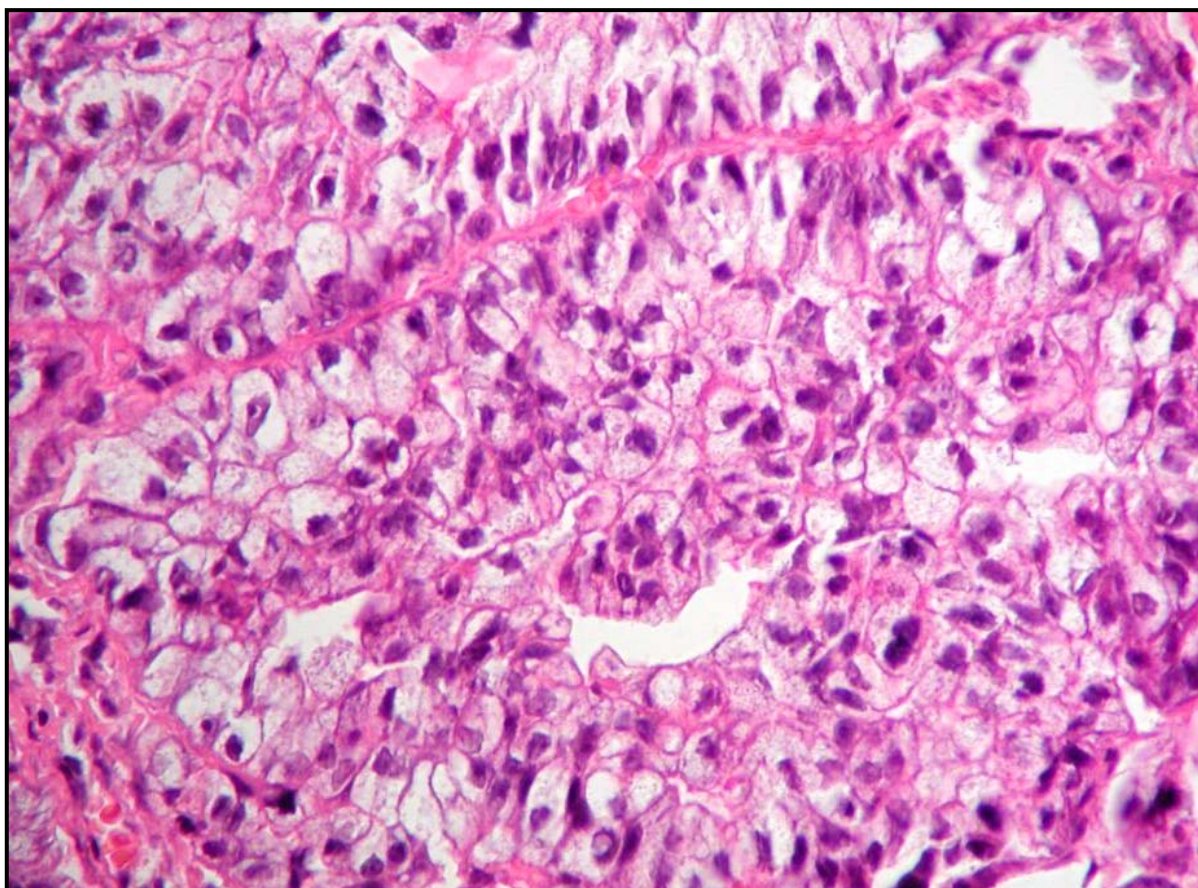


**Světlobuněčné** nádory jsou typické přítomností buněk obsahující hojný glykogen v cytoplasmě, což způsobuje její vodojasnost. Benigní světlobuněčné nádory jsou velmi vzácné, karcinom tvoří asi 5 - 10% všech ovariálních karcinomů.

Nejčastěji se jedná o solidní nádor nebo unilokulární tlustostěnnou cystu, do které prominují solidní nádorové uzly (47).

**Přechodnobuněčné** tumory jsou charakteristické přítomností ostrůvků epiteliálních buněk připomínajících urotel, které jsou rozptýleny ve fibrózním stromatu. Tyto nádory představují asi 3% všech epiteliálních ovariálních tumorů a jsou převážně benigní. Přechodnobuněčný karcinom je často promíšen s jiným typem karcinomů, hlavně se serózním (47).

**Obr. 4: Světlobuněčný karcinom ovária, HE, zvětšeno 400x**

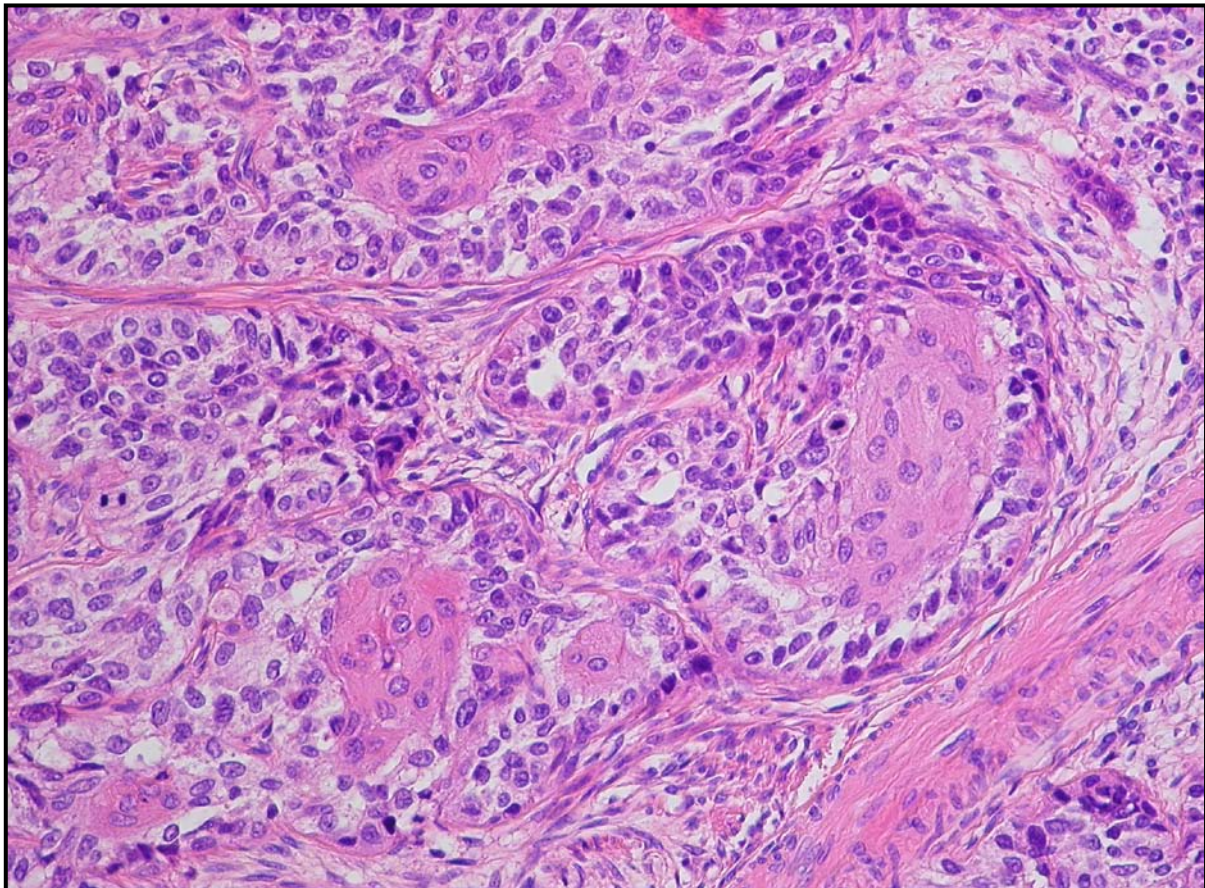


**Dlaždicobuněčný** karcinom je v ovariu vzácný nádor (47).

**Smíšený epitelální** nádory jsou tvořeny z více druhů nádorové populace. Například jde o kombinaci serózní a endometroidní diferenciace (47).

**Nediferencovaný** karcinom nevykazuje žádné známky diferenciace (47).

**Obr. 5: Dlaždicobuněčný karcinom ovária, HE, zvětšeno 200x**



### **1.2.2. Klasifikace nádorů gonadostromálních**

Tumory této skupiny vycházejí ze specializovaného stromatu ovária a mohou být hormonálně aktivní (produkovat např. estrogény, gestageny či androgeny) či být

endokrinně němé. Tyto nádory představují zhruba 10% všech ovariálních tumorů.

Gonadostromální nádory se rozdělují na 3 skupiny:

- Nádor z buněk granulozy
- Nádory ze Sertoliho a Leydigových buněk
- Nádory ze steroidogenních buněk (32).

### **1.2.3. Klasifikace nádorů germinálních**

Jde o nádory vznikající ze zárodečných buněk. Převažují u mladých žen.

Rozlišujeme tyto nejčastější typy:

- Dysgerminom
- Embryonální karcinom
- Teratom zralý
- Teratom nezralý
- Nádor ze žloutkového váčku
- Choriokarcinom
- Smíšený maligní germinální nádor (32).

### **1.2.4. Klasifikace smíšených germinálních a gonadostromálních nádorů**

Tato kategorie vzácných pseudotumorózních a nádorových afekcí složených ze zárodečných buněk a buněk specializovaného stromatu ovárií zahrnuje gonadoblastom a strukturně podobný maligní nádor Talermanův (32).

### **1.2.5. Klasifikace nádorů nespecifické pro ovarium**

V ováriu se sporadicky vyskytují nádory měkkých tkání, např. angiomy, leiomyomy, neurofibromy a lipomy. U mezoteliomu je vždy nutno vyloučit sekundární postižení ovária. Sarkomy a maligní lymfomy jsou v ováriu vzácné (32).

### **1.2.6. Klasifikace nádorů sekundárních**

Jedná se o nádory, které nevznikají z tkáně ovaria. Ale jsou do tohoto orgánu zaneseny druhotně, a to jako vzdálené metastázy, nebo prorůstáním nádorové masy z okolí. Do ovaria nejčastěji metastazují nádory žaludku, prsu, tlustého střeva či hematologické malignity. Zvláštní formou je tzv. Krukenbergův nádor, což je oboustranné „bramborovité“ zvětšení obou ovárií. Mikroskopicky se jedná o metastázy málo diferencovaného hlenotvorného adenokarcinomu s výraznou fibroprodukcí, nejčastěji z gastrointestinálního traktu (32).

## **1.3. Grading a staging karcinomu ovaria**

### **1.3.1. Grading nádoru**

Řada studií udává stupeň diferenciacie nádoru – tzv. grading za prognostický důležitý faktor (12, 27, 49). U ovariálního karcinomu však neexistuje jednotný obecně uznávaný systém, což činí výsledky obtížně reprodukovatelné. Nejužívanější hodnotící systémy gradingu karcinomů vaječníků jsou tři: systém doporučený FIGO (the International Federation of Gynecology and obstetrics), dále WHO (Světová zdravotnická organizace) a doporučení GOG (Gynecologic Oncology Group) (3, 45). Hodnocení je obecně založeno na architektonické stavbě a buněčných charakteristikách. FIGO systém diferenciacie nádoru je založen na stanovení poměru

žlázové a papilární složky k solidním partiím. WHO klasifikace gradingu je založena na architektonických a cytologických rysech. Grading dle GOG je různý pro jednotlivé histologické typy ovariálního karcinomu (43).

Někteří autoři se pokusili vytvořit jednotný systém gradingu karcinomu ovária (2, 6). Žádná z těchto klasifikací však nebyla obecně akceptována. Silverberg se při definování nového systému gradingu ovariálních karcinomů inspiroval Nottinghamskou klasifikací gradingu karcinomu prsu. Snažil se vytvořit systém univerzální (použitelný pro všechny histologické typy ovariálního karcinomu), jednoduchý a klinicky validní. Hodnotil tři parametry: 1. architektura nádoru, 2. charakter jader a 3. mitotický index:

1. *architektura nádoru* - v ovariálním karcinomu převažují tři formy růstu: glandulární (žlázové), papilární, solidní. Prognosticky je nejpříznivější glandulární růst. Naopak solidní růst je spojen s agresivním chováním. Jednotlivé typy růstu byli obodovány. Glandulární růst - skóre 1, papilárně rostoucí – skóre 2, solidní tumory – skóre 3.

2. *charakter jader* - taktéž ohodnoceny body. Jádra pravidelná, s nízkým nukleocytoplasmatickým poměrem a s jemným chromatinem – skóre 1; jádra vykazující určité odchylky ve velikosti, rozložení chromatinu – skóre 2; jádra bizardní, s velkým rozdílem ve velikosti, zhrubělým chromatinem a velkými eozinofilními jadérky – skóre 3.

3. *mitotická aktivita* se hodnotila na 30 zorných polí za použití velkého zvětšení, tzn. objektiv 40x, celkové zvětšení 400x (tzv. HPF - high power field). Byl zaznamenán největší počet mitos na 10 HPF. Opět bylo použito skóre. Nejméně bodů získaly nádory s 9 a méně mitozami, skóre 2 měli nádory s 10-24 mitózami, skóre 3 měli tumory s více než 25 mitózami.

Vzhledem k tomu, že všechny tyto parametry byly skórovány body 1 až 3, konečné skóre se pohybuje v rozmezí mezi 3 až 9 body - viz tabulka 2.

**Tabulka 2. Grading karcinomu ovaria dle Silverberga**

Počet bodů	Grade
3-5	1- dobře diferencovaný
6-7	2- středně diferencovaný
8-9	3- málo diferencovaný

Tento definitivní grade nádoru signifikantně koreloval s přežitím jak v časných, tak v pokročilých stádiích u všech typů ovariálního karcinomu; s výjimku tvořil nádor ze světlých buněk, kde významná korelace nebyla zjištěna. Silverberg dále zjistil, že grade ovariálního karcinomu predikuje přežití lépe než histologický typ. Histologie nádoru je však mnohem přínosnější pro předpověď odpovědi nádoru na chemoterapii a může napomoci při volbě vhodné terapie (43).

Výpovědní hodnota diferenciacie nádoru je však také závislá na pokročilosti onemocnění. U časných stádiích diferenciacie nádoru významně koreluje s pětiletým přežitím (41, 55). Zato u pokročilých stádiích však spíše koreluje s odpovědí na podanou chemoterapii (45).

### **1.3.2. Staging nádoru**

Staging je stanovení stádia pokročilosti nádoru. Staging je stejně jako u jiných nádorů založen na TNM klasifikaci. Ta zahrnuje rozsah primárního nádoru (T), přítomnosti regionálních uzlinových metastáz (N) a na přítomnosti vzdálených metastáz – viz tabulka 3A-C.

**Tabulka 3A: Staging ovariálního karcinomu dle primárního nádoru (T)**

TX		primární nádor nelze hodnotit
T0		bez známek primárního nádoru
T1		nádor ohraničen na vaječníky
	T1a	nádor ohraničen na jeden vaječník, pouzdro intaktní, žádný nádor na povrchu vaječníku, v ascitu nebo peritoneálním výplachu nejsou maligní buňky
	T1b	nádor ohraničen na oba vaječníky, pouzdro intaktní, žádné známky nádoru na povrchu vaječníků, v ascitu nebo peritoneálním výplachu nejsou maligní buňky
	T1c	nádor ohraničen na jeden nebo oba vaječníky buď s rupturou pouzdra, nebo nádorem na povrchu ovária nebo maligní buňky v ascitu či peritoneálním výplachu
T2		nádor postihuje jeden či oba vaječníky, šíří se v pánvi
	T2a	šíří se na dělohu a/nebo vejcovod(y) nebo implantáty na děloze nebo vejcovodu (vejcovodech), v ascitu nebo peritoneálním výplachu nejsou maligní buňky
	T2b	šíří se na jiné pánevní tkáně, v ascitu nebo peritoneálním výplachu nejsou maligní buňky
	T2c	šíří se v pánvi (2a nebo 2b), s maligními buňkami v ascitu nebo peritoneálním výplachu
T3		nádor postihuje jeden či oba vaječníky, s mikroskopicky prokázanými peritoneálními metastázami mimo pánev
	T3a	mikroskopické peritoneální metastázy mimo pánev
	T3b	makroskopické peritoneální metastázy mimo pánev velikosti 2 cm a méně
	T3c	peritoneální metastázy mimo pánev větší než 2 cm v největším rozměru



**Tabulka 3B: Staging ovariálního karcinomu dle lymfatických uzlin (N)**

NX	regionální mízní uzliny nelze hodnotit
N0	v regionálních mízních uzlinách nejsou metastázy
N1	metastázy v regionálních mízních uzlinách

**Tabulka 3C: Staging ovariálního karcinomu dle vzdálených metastáz (M)**

MX	vzdálené metastázy nelze hodnotit
M0	nejsou vzdálené metastázy
M1	vzdálené metastázy (mimo peritoneální metastázy)

V případě ovariálního karcinomu se však častěji používá klasifikace vytvořená International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) – viz tabulka 4 (5).

**Tabulka 4: Staging karcinomu ovaria dle FIGO klasifikace**

<i>Stadium I</i>	<i>T1</i>	<i>N0</i>	<i>M0</i>
<i>Stadium II</i>	<i>T2</i>	<i>N0</i>	<i>M0</i>
<i>Stadium III</i>	<i>T3</i>	<i>N0</i>	<i>M0</i>
<i>Stadium IV</i>	<i>Jakékoliv T</i>	<i>N1</i>	<i>M1</i>

## **1.4. Prognostické markery stanovitelné imunohistochemicky**

V poslední době je publikována celá řada studií snažících se identifikovat nějaké prognostické či prediktivní faktory u karcinomu ovária. Jejich význam je však doposud nejasný a výsledky v řadě případů rozporuplné. Často využívanou metodou k identifikaci prognostických markerů je imunohistochemie. Nejčastější studované prognostické faktory lze rozdělit do těchto skupin:

1. steroidní (estrogenové a progesteronové) receptory exprimované nádorovými buňkami,
2. zhodnocení kinetiky buněčného růstu v ovariálních karcinomech prostřednictvím stanovení proliferační aktivity nádorových buněk (zejména za využití proliferačních antigenů jako je Ki-67 nebo topoisomerasa II $\alpha$ ),
3. overexprese onkoproteinu HER-2/neu nádorovými buňkami ,
4. exprese onkoproteinů majících vztah k apoptóze (p53, p21, bcl-2, bax a jiné proteiny) nádorovými buňkami,
5. stanovení angiogenního potenciálu ovariálního karcinomu imunohistochemickým průkazem angiogenních faktorů (např. vaskulárního endoteliálního růstového faktoru - VEGF) či kvantifikací kapilár v místech největší angiogenní aktivity
6. průkaz tumor infiltrujících lymfocytů v nádorové tkáni (52).

### **1.4.1. Průkaz exprese hormonálních receptorů**

Progesteron a estrogeny jsou hormony produkované ováriem, které působí přes specifické receptory. Interakce mezi steroidními hormony a jejich receptory (estrogenové receptory, ER a progesteronové receptory, PR) hraje velmi důležitou roli v procesu karcinogeneze nejen gynekologických malignit, ale i jiných solidních nádorů (zejména u karcinomu prsu a prostaty) (24).

Receptory pro steroidní hormony regulují buněčnou proliferaci a diferenciaci, a v nádorech mohou zásadním způsobem ovlivňovat jejich růst a progresi (28). Takovéto nádory jsou označovány za hormonálně závislé (dependentní). V nádorové progresi hraje významnou úlohu vznik buněčné populace, která je na hormonální regulaci nezávislá a brzy po svém vzniku se stane dominantní částí nádoru. Nádory tohoto typu jsou pak nazývány hormonálně nezávislé (independentní) (24). Expres ER a/nebo PR či jejich kombinace (ER+/PR+, ER+/PR-, ER-/PR+, ER-/PR-) byla identifikována jako prediktivní faktor pro hormonální terapii (28).

Na rozdíl od karcinomu prsu se studie o prognostickém významu exprese hormonálních receptorů u karcinomu ovária různí. Existují studie, které neprokazují žádný prognostický význam exprese hormonálních receptorů buňkami ovariálního karcinomu (15, 51). Na druhou stranu však byly publikovány studie, které usuzují na možnost vztahu mezi počtem ER a/nebo PR u ovariálního karcinomu a jeho prognózou. Některé studie popisují delší přežití u pacientek s nádorem exprimujícím PR. Byla též prokázána lepší odpověď na podanou chemoterapii u tumorů s přítomností ER a PR než u tumorů bez exprese receptorů (18, 28).

#### **1.4.2. Průkaz proliferační aktivity nádoru**

Studium buněčné kinetiky, zejména hodnocení proliferační aktivity nádoru zaujímá dnes v nádorové patologii významné místo. Proliferace buněk je jedním ze základních biologických procesů zajišťujících růst a udržení tkáňové homeostázy. Buňka se dělí zdvojnásobením svého obsahu a následným rozdělením ve dvě buňky dceřiné. Tento proces se nazývá buněčný cyklus. Střídá se v něm fáze mitosy a interfáze. Ve fázi mitózy dochází k vlastnímu rozdělení buňky na dvě buňky dceřiné. Interfáze se dělí do několika fází: G1 - dochází k nárůstu buněčné hmoty a k syntéze organel; fáze S – syntéza, kdy dochází ke replikaci DNA; fáze G2 – dochází k opravě DNA a k přípravě na vlastní dělení. Dělení poté probíhá ve čtyřech fázích: profáze, metafáze, anafáze, telofáze (24).

Klíčovou úlohu pro vstup buňky do buněčného cyklu je fáze G1, kdy je buňka citlivá k mitogenním signálům. Regulace buněčného cyklu v mnohobuněčném organismu podléhá přísné kontrole. V reakci na okolní i vnitřní stav je buňka schopna aktivovat signální dráhy vedoucí k zástavě buněčného cyklu (24).

Metod kvantifikace buněk, které se nacházejí v buněčném cyklu je celá řada. Nejednodušší metodou je kvantifikace mitotických figur v tkáňovém řezu barveném standardním histologickým barvením, t.j. hematoxylinem-eozinem (HE). Určuje se počet mitos na přesně definovaný počet zorných polí určitého zvětšení (33). Poměrně jednoduchou a levnou metodou k určení proliferační aktivity nádorových buněk je imunohistochemie. Nejčastěji prokazovanými antigeny jsou jaderné nonhistonové proteiny jako PCNA (proliferating cell nuclear-antigen), Ki-67 či topoisomeráza II $\alpha$ . Většinou se jedná o enzymy a kofaktory účastnící se syntézy DNA v průběhu S fáze buněčného cyklu (50).

O karcinomu ovaria pojednává mnoho autorů, kteří se snaží stanovit prognostický význam proliferační aktivity nádorových buněk imunohistochemickým průkazem antigenu Ki-67 či topoizomerázy II $\alpha$ . Většina prací používajících tyto imunohistochemické metody prokázala prognostický význam proliferační aktivity nádorových buněk (15, 16, 37), existují však i práce která tyto výsledky nepotvrdily (8, 52).

### **1.4.3. Průkaz onkoproteinu HER-2/neu**

Overexprese transmembránového onkoproteinu HER-2/neu je pozorována u 20-30% nádorů různého spektra, zejména u karcinomu prsu, slinných žláz, plic apod. Tato overexprese koreluje se špatnou prognózou nádoru. V klinické praxi má význam existence monoklonální anti-HER-2/neu protilátky transtuzumab (Herceptin), která jako první začala být používána v molekulárně cílené léčbě u pacientek s nádorem prsu s HER-2/neu overexpresí (nejprve s metastatickým nádorovým onemocněním, nověji i v adjuvantní terapii) (52).

S frekvencí 10-44% byla exprese HER-2/neu popsána i u ovariálního karcinomu (tato variabilita může souviset s použitím různých technik pro jeho

stanovení) (52). Existují však studie, které potvrzují signifikantně horší prognózu HER-2/neu pozitivních nádorů ve srovnání s HER-2/neu negativními nádory. Amplifikace HER-2/neu je také častější u ovariálních tumorů rezistentních na platinové preparáty (8, 38).

#### **1.4.4. Průkaz onkoproteinů majících vztah k apoptóze**

Velká pozornost je poslední dobou věnována apoptóze nádorových buněk. Charakteristickým rysem nádorových buněk je jejich neschopnost uskutečnit proces apoptózy, což je spojeno s agresivnějším chováním tumoru a zpravidla i selháním chemoterapie a radioterapie. Účinek této terapie totiž spočívá právě v aktivaci apoptózy. Nejvíce je v tomto ohledu prostudován účinek onkogenu bcl-2 (antiapoptotický gen), jehož produktem je protein bcl-2. Jeho nadbytek inhibuje zánik buňky apoptózou a podporuje buněčnou proliferaci. Overexprese proteinu bcl-2 tak může vést k mnohočetné rezistenci nádorových buněk vůči cytostatikům. Jeho velmi důležitou funkcí je též tvorba neaktivních heterodimerů s proapoptoticky působícími molekulami, proto je vzájemný poměr mezi pro- a protiapoptotickými proteiny podstatnější než samotná hladina bcl-2 proteinu. Protein bax je naopak proapoptotický činitel, stejně tak jako protein p53. Jejich inaktivace má za následek „nesmrtelnost“ buňky a rozvoj nádorového bujení (50).

Mutace genu pro p53 a akumulace nefunkčního proteinu p53 je dosud nejčastěji popsanou genetickou alterací u ovariálních karcinomů. V literatuře je shoda v tom, že mnohem častěji je zvýšená exprese p53 nacházena u pokročilých stádií ovariálního karcinomu než u časných stádií. Některé studie naznačují, že zvýšená exprese p53 u stadia III-IV je sdružena se snížením pětiletého přežití a potvrdily i overexpresi onkoproteinu p53 jako nezávislý prognostický marker (4, 42, 50).

Expresi proteinu p21 v ovariálních karcinomech byla studována jen velmi omezeně. Jedná se o inhibitor cyklin-dependentních kináz, jehož sekrece je aktivována vzestupem hladiny proteinu p53 při poškození DNA. Studie Geislera a kol. prokázala, že kombinace exprese p21 a negativního proteinu p53 je nezávislým prognosticky příznivým faktorem (14).

### **1.4.5. Angiogeneze**

Růst a vývoj nádoru malých rozměrů (do 1-2 mm v průměru) je zajišťován prostřednictvím difúze z okolí. U nádorů větších rozměrů však prostá difúze není dostatečná a odpovídající zásobením včetně odvádění odpadních produktů musí být zajištěno prostřednictvím krve. Nezbytnou podmínkou dalšího růstu nádoru je tedy nastartování novotvorby cév z preexistujícího cévního řečiště - angiogeneze. Po vzniku angiogenního fenotypu v nádoru dochází k jeho prudkému až exponenciálnímu růstu (39, 50).

Hypotézu o pozitivním vztahu mezi vaskularizací tumoru a jeho biologickým chováním poprvé jednoznačně potvrdili ve své studii Srivastava a kol. v roce 1988 na souboru maligních melanomů, kde zjistili korelaci mezi relativní plochou cév ve spodině tumoru a jeho recidivami či metastazováním (44). V roce 1991 následovala studie Weidnera, která se zabývala vztahem mezi počtem novotvořených kapilár v nádoru a prognózou karcinomu prsu. V této práci byl počet kapilár kvantifikovaný v místech s největší angiogenní aktivitou (tzv. „hot spots“). Studie prokázala signifikantní korelaci mezi maximálním počtem kapilár a metastatickou potencií nádoru (53).

Studiem angiogeneze v ovariálních karcinomech se zabývala celá řada prací. Většina vychází z modifikace původní Weidnerovy metody kvantifikace kapilár liší se však volbou detekovaného antigenu, zvětšením a velikostí zorného pole. Některé z nich se zabývá vlivem angiogeneze na další vývoj nádorového onemocnění a některé z nich prokázaly pozitivní korelaci mezi angiogenní aktivitou nádoru a prognózou (13, 30, 35, 46).

Identifikována byla celá řada proangiogenních faktorů, mezi nejznámější patří: basic fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), epidermal growth factor (EGF) a řada dalších. Jedním z nejdůležitějších angiogenních faktorů je VEGF, který způsobí během několika minut extrémní zvýšení permeability cév. Při delším působení funguje jako vysoce specifický mitogen pro endoteliální buňky, indukuje jejich proliferaci a následnou novotvorbu kapilár. VEGF indukuje rovněž expresi proteolytických enzymů nezbytných při remodelaci novotvořených kapilár (50).

Existuje celá řada prací zabývajících se expresí VEGF v karcinomech ovária. Některé tento cytokin prokazují v nádorové tkáni imunohistochemicky, jiné stanovují jeho hladinu v ascitu nebo v séru pacientek s ovariálním karcinomem metodou ELISA. Výsledky jsou však značně rozporuplné (10, 30, 29, 54).

#### **1.4.4. Tumor infiltrující lymfocyty (TIL)**

V posledních letech je snaha porozumět roli imunitního systému v progresi nádorů (57). V nádorech se vyskytují tumor infiltrující mononukleární buňky složené z T lymfocytů (helper a suppressor/cytotoxic), NK (natural killer) buněk, B lymfocytů a makrofágů. Tento zánětlivý infiltrát je zpravidla oligoklonální a je indikátorem aktivní imunitní odpovědi organismu proti nádorovým antigenům. Většina infiltrujících T lymfocytů jsou CD8 pozitivní lymfocyty, které zprostředkovávají specifickou cytotoxickou reakci proti nádorovým buňkám. Na druhou stranu většinu z tumor infiltrujících mononukleárních buněk tvoří CD68 pozitivní makrofágy. Jejich rolí je aktivace lymfocytů, neboť tyto buňky jsou antigen prezentující. Makrofágy však tvoří funkčně heterogenní skupinu, často s antagonistickými funkcemi a mohou jak inhibovat, tak stimulovat proliferaci nádorových buněk (17).

Řada studií prokazuje prognostický význam tumor infiltrujících lymfocytů u nádorů jako např. karcinom prsu, prostaty, tlustého střeva, jícnu či u maligního melanomu. V případě ovariálního karcinomu však existuje velmi málo prací na toto téma a jejich výsledky jsou rozporuplné (26, 35, 40, 56).

## 2. Cíle studie

Cílem předkládané práce bylo přispět k hledání signifikantních prognostických markerů u invazivního karcinomu ovária, které je možno stanovit imunohistochemicky a v budoucnu je užívat k rutinní předpovědi možného vývoje nádoru. Výsledky by mohli pomoci při volbě vhodné protinádorové terapie (zejména vytipováním vysoce rizikových pacientek, u kterých by bylo možno volit agresivnější terapii).

V této práci jsme se zaměřili na zjištění případného prognostického významu imunohistochemické detekce CD3 pozitivních tumor infiltrujících lymfocytů v nádorové tkáni.

Tato práce byla podpořena grantem IGA MZ NR8363-3/2005.



### **3. Experimentální část**

#### **3.1. Charakteristika souboru**

Soubor tvořily invazivní karcinomy ovária diagnostikované v období 1.1. 1996 až 31.12. 2003 na Fingerlandově ústavu patologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové, které splňovaly následující požadavky:

- 1) bylo možno zajistit dostatek materiálu pro imunohistochemické vyšetření,
  - 2) bylo možno dohledat klinické údaje: stádium tumoru dle FIGO klasifikace, velikost reziduálního tumoru po operaci a délka přežívání od primární operace.
- Tato kritéria splnilo celkem 116 případů a ty byly předmětem studia potenciálních prognostických parametrů.

#### **3.2. Histologické vyšetření**

Materiál byl rutinně fixovaný v 10% formalínu. Byl makroskopicky prohlédnut, popsán a byli proveden standardizovaný odběr tkáně na histologické vyšetření. Byly odebrány vždy nejméně tři vzorky z nádoru se zaměřením na pouzdro, případně na periferii tumoru. Za optimální byl považován odběr 1 bločku na každý 1 cm velikosti primárního nádoru. K histologickému vyšetření byla odebrána všechna ložiska z omenta podezřelá z metastatického postižení.

Vzorky byly zpracovány standardní histologickou technikou: odvodnění ve vzestupných koncentracích etanolu od 70% - 96%, prosycení látkou mísící se s parafinem – tj. xylenem a prosycení parafinem. Poté byly tkáňové bloky zality do parafinu a nakrájeny na sáňkových mikrotomech na řezy o síle 2  $\mu\text{m}$  žiletkovými noži.

Tyto řezy byli využity k rutinnímu barvení v histologické technice - hematoxylin eosin a také k imunohistochemickému průkazu antigenu CD3.

U každého nádoru byl stanoven histologický typ nádoru a současně byl stanoven grading hodnocením dle Silverberga (43).

### **3.3. Imunohistochemické vyšetření**

Základem metody je detekce specifických antigenních determinant (molekul či jejich částí) s využitím imunologické vazby, tj. na principu antigen (Ag) - protilátka (Ab).

V našem případě byla použita nepřímá dvoustupňová metoda na průkaz CD3 antigenu. V první fázi reaguje primární specifické antisérum s prokazovaným antigenem - s intracytoplasmatickými peptidy umístěnými na  $\epsilon$  řetězci. V druhé fázi je aplikována sekundární protilátka s navázanou křenovou peroxidázou. Tento enzym využívá jako svého substrátu diaminobenzidin (DAB). V případě positivity – navázané protilátce označenou peroxidázou vzniká nerozpustné hnědé zbarvení. Jako pozitivní byly hodnoceny buňky s hnědou pozitivitou jader. K expresi antigenu CD3 dochází nejprve v perinukleární oblasti. CD3 představuje jeden z nejranějších příznaků příslušnosti k buněčné linii T- buněk.

#### **3.3.1. Pomůcky a přístroje**

Při imunohistochemickém vyšetření byly potřeba tyto pomůcky: laboratorní sklo, kyvety na preparáty, váženka, lžička, kapátka, filtrační papír, krycí skla, pinzeta, olejová tužka na označení lokalizace řezů na skle (super pap pen IM 3580), vlhká komůrka (MIST- magnetic immuno staining tray), automatická pipeta (Finnpipete); tyto přístroje: pH metr (Inolab), pH elektroda (sen tix 21), mikroskop (Nikon E 200), váhy (AND EK 3000i), vodní lázeň (Dako).

#### **3.3.2. Roztoky**

Při práci jsme potřebovali tyto roztoky: etanol 96% (lékárna Fakultní nemocnice Hradec Králové), destilovaná voda, xylene (čistý, směs isomerů, Penta, č.š. 071206), aceton (čistý, Penta, č.š. 020207), pufr S 3308 (DAKO, č.š. 24504,

pH=9,9), 0,8% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (lékárna Fakultní nemocnice Hradec Králové), pufr PBS (lékárna Fakultní nemocnice Hradec Králové), primární protilátka anti human CD3 (polyklonální, DAKO, č.š.25517), DAB substrát (DAKO, č.š. 5464), Koďouskův hematoxilin, kanadský balzám (Serve, č.š.50124), Antibody diluent (DAKO, č.š. 28130), Envision Dual link systém peroxidase (DAKO, č.š.30972).

### **3.3.3. Pracovní postup**

Při imunohistochemickém vyšetření se musí nejdříve řezy natažené na podložních sklech zbavit parafinu – to se děje ve třech lázních xylenu, poté ze zavodní přes sestupnou řadu etaholu ( 96% - 70%) v destilované vodě. Před vlastní aplikací primární protilátky se musí ve tkáni demaskovat antigeny. Také se inaktivuje endogenní peroxidáza, která by nám poskytovala falešně pozitivní reakci. Po aplikaci naředěné primární protilátky s Antibody diluent (1:100) a jejím oplachu se reakce znázorňuje pomocí sekundární protilátky s navázanou peroxidázou – Envision Dual link systém peroxidase. Po přidání chromogenu – DAB substrát, se dobarví jádra Koďouskovým hematoxylinem. Poté se řezy zbaví vody a prosyť xylenem, který nám řezy projasní. Skla se zamontují pomocí krycího skla s kapkou Kanadského balzámu. Při práci jsme postupovali dle tabulky 5.

**Tabulka 5.: postup imunohistochemického vyšetření**

1.	Deparafinace řezů - 3x 10 min xylen, 2x 5 min 96% etanol, 5 min 70% etanol
2.	Oplach – destilovaná voda 1 min
3.	Odhalení antigenů – vodní lázeň při 96°C v pufru S 3308 40 min
4.	Necháme vychladnout, oplach v destilované vodě
5.	Tlumení endogenní peroxidázové aktivity – 0,9% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10 min

6.	Oplach destilovanou vodou 1min
7.	Oplach v PBS pufru při pH = 7,2 1 min
8.	Aplikace primární protilátky anti CD 3 30 min (ředění 1 :100)
9.	Oplach v PBS pufru při pH = 7,2 1min
10.	Envision Dual link systém peroxidase 30 min
11.	Oplach v PBS pufru při pH = 7,2 1min
12.	DAB substrát 5min
13.	Oplach destilovanou vodou 1min
14.	Kořouskův hematoxylin 1min
15.	Pramenná voda 3 min, 3x 96% etanol 3min, aceton 3min, 3x xylene 3min

### **3.3.4. Hodnocení imunohistochemické reakce**

Tkáňové řezy byly prohlíženy při zvětšení objektivem 40x (tj. 0.196 mm<sup>2</sup>) za použití mikroskopu Nikon E 200. Bylo prohlédnuto šest různých oblastí, kde bylo přítomno největší množství CD3 pozitivních T lymfocytů (jako pozitivní byly hodnoceny buňky s hnědou pozitivitou jader), z toho tři oblasti s lymfocyty v nádorovém epitelu (tzv. intraepiteliální lymfocyty) a tři oblasti s lymfocyty v nádorovém stromtu (tzv. stromální lymfocyty). Počet tumor infiltrujících lymfocytů byl zhodnocen manuálně a následně jejich počet převeden na 1 mm<sup>2</sup>. Imunohistochemické řezy byly hodnoceny bez předchozí znalosti klinických dat.

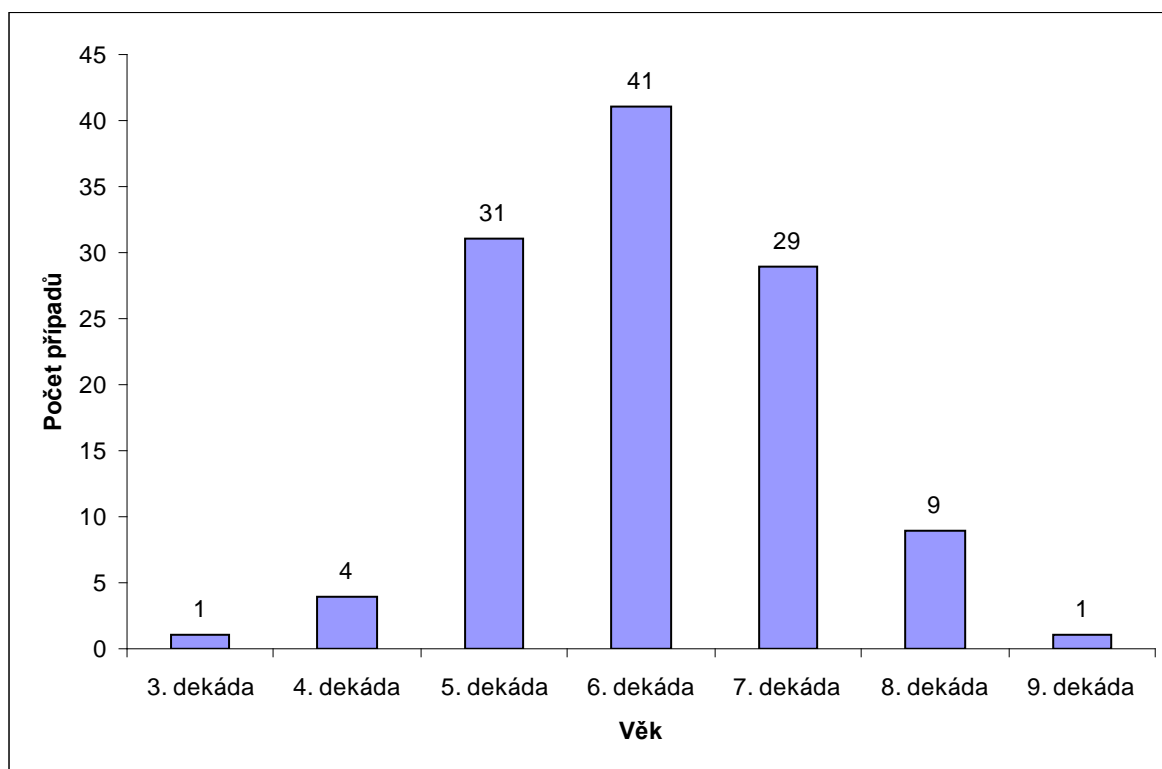
### **3.4. Statistická analýza dat**

Při statistické analýze získaných dat byl použit tento program: Number Cruncher Statistical System software (NCSS, Kaysville, Utah). Doba celkového přežití byla sledována Kaplan-Meierovou metodou. Srovnání dle jednotlivých sledovaných faktorů (univariální analýza) byla provedena pomocí log-rank testu, multivariální analýza Coxovou metodou. Za statisticky významnou bylo považována hodnota  $p < 0,05$ .

## 4. Výsledky

Soubor tvořilo 116 pacientek. Jejich věk se pohyboval v rozmezí 27 až 82 let (průměr 55; medián 53 let). Rozdělení souboru dle četnosti v jednotlivých dekádách věku znázorňuje graf 1. Z grafu je patrné, že toto nádorové onemocnění postihuje nejčastěji ženy v 5. až 7. dekádě (101 pacientek, tj. 87,1 %).

**Graf 1: Rozdělení pacientek dle dekád věku**



V tabulce 6 je patrné rozdělení souboru dle pokročilosti nádorového onemocnění (staging). Z této tabulky je zřejmé, že u 87 % pacientek bylo nádorové onemocnění pokročilé (stádium III a IV). Zejména to platí pro serózní a endometroidní karcinom, který byl velmi často byl diagnostikován až v pozdních stádiích (v 81,8 %, resp. v 80,6 %). Naopak mucinózní karcinom byl zjištěn ve stádiu I ve více než ve dvou třetinách případů.

**Tabulka 6: Rozdělení případů dle pokročilosti nádoru**

Stage	Počet n (%)	Serózní n (%)	Endometr. n (%)	Mucinoz. n (%)	Světlobb. n (%)	Dedifer. n (%)
I	24 (20,7)	7 (12,7)	6 (16,6)	10 (71,4)	1 (16,7)	0 (0)
II	5 (4,3)	3 (5,5)	1 (2,8)	0 (0)	1 (16,7)	0 (0)
III	68 (58,6)	44 (80,0)	20 (55,6)	0 (0)	1 (16,7)	3 (60)
IV	19 (16,4)	1 (1,8)	9 (25,0)	4 (28,6)	3 (50,0)	2 (40)

V tabulce 7 jsou patrné údaje o velikosti reziduálního tumoru po operaci (tyto údaje se podařilo dohledat pouze u 112 pacientek, u zbylých 4 žen informace o velikosti reziduálního tumoru v klinické dokumentaci nebyla uvedena).

**Tabulka 7: Rozdělení případů dle velikosti reziduálního tumoru**

Velikost rezid. tumoru	Počet	%
Žádný	62	55,3
Do 2 cm	21	18,8
Více jak 2 cm	29	25,9

V tabulce 8 je přehled nádorů dle histologického typu. V souboru převládají karcinomy serózní a endometroidní. Tabulka 9 znázorňuje rozdělení nádorů dle jejich diferenciacce (gradingu) celkově a dle jednotlivých histologických typů. Je zde patrné, že v souboru převládaly nádory středně a málo diferencované (44,8 %, resp. 41,4 %). Stranou stojí opět karcinom mucinózní, kde bylo poměrně vysoké zastoupení nádorů dobře diferencovaných (42,9 %) a nevyskytl se žádný nízce diferencovaný mucinózní karcinom.

**Tabulka 8: Přehled zastoupení jednotlivých histologických typů**

Histologický typ	Počet	%
Serózní	55	47,4
Endometroidní	36	31,0
Mucinózní	14	12,1
Světlobuněčný	6	5,2
Nediferencovaný	5	4,3

**Tabulka 9: Grading dle jednotlivých histologických typů**

Histologie	Počet (%)		
	Grade 1	Grade 2	Grade 3
Serózní	9 (16,4)	23 (41,8)	23 (41,8)
Endometroidní	1 (2,8)	17 (47,2)	18 (50,0)
Mucinózní	6 (42,9)	8 (57,1)	0 (0)
Světlobuněčný	0 (0)	4 (66,7)	2 (33,3)
Dediferencovaný	0 (0)	0 (0)	5 (100)
<b>Celkem</b>	<b>16 (13,8)</b>	<b>52 (44,8)</b>	<b>48 (41,4)</b>

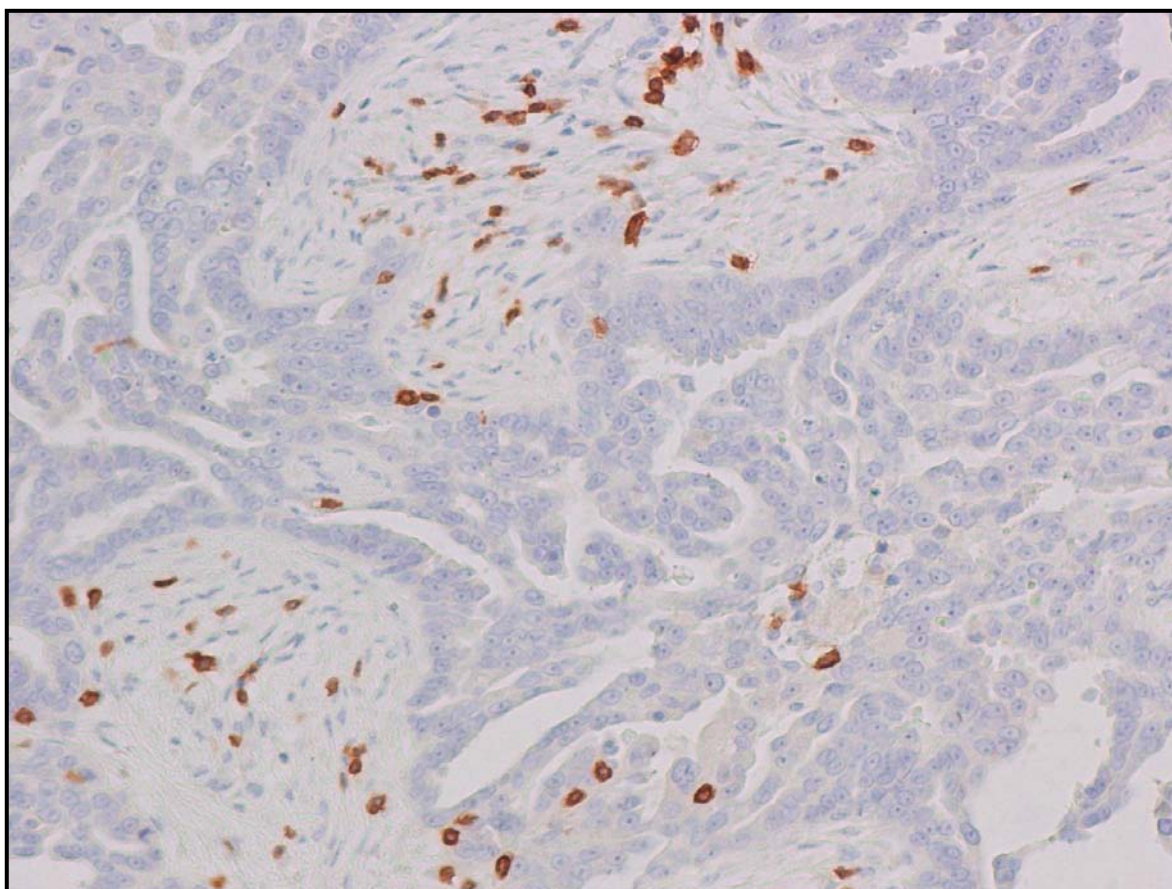
Z celkového počtu 116 vyšetřených pacientek za období pozorování zemřelo 62 žen (tj. 53 %). Doba pozorování (follow-up) se pohybovala mezi 1 až 120 měsíci, medián doby pozorování pro celou skupinu byl 39 měsíců. Medián doby přežití byl 48 měsíců a 5leté přežití 43 %.

CD3 pozitivní tumor infiltrující lymfocyty (TIL) byly pozorovány ve všech nádorech, jednak v nádorovém stromatu (tzv. stromální lymfocyty), jednak infiltrující nádorový epitel (tzv. intraepiteliální lymfocyty). Medián počtu **stromálních TIL** byl



338 lymfocytů/mm<sup>2</sup> (rozmezí 81-2094 lymfocytů/mm<sup>2</sup>). Medián počtu intraepiteliálních TIL byl 125 lymfocytů /mm<sup>2</sup> (rozmezí 7-1563 lymfocytů /mm<sup>2</sup>).

**Obr 6: CD3 pozitivní T lymfocyty v nádorovém stromatu (stromální), imunohistochemie CD3, zvětšeno 200x**



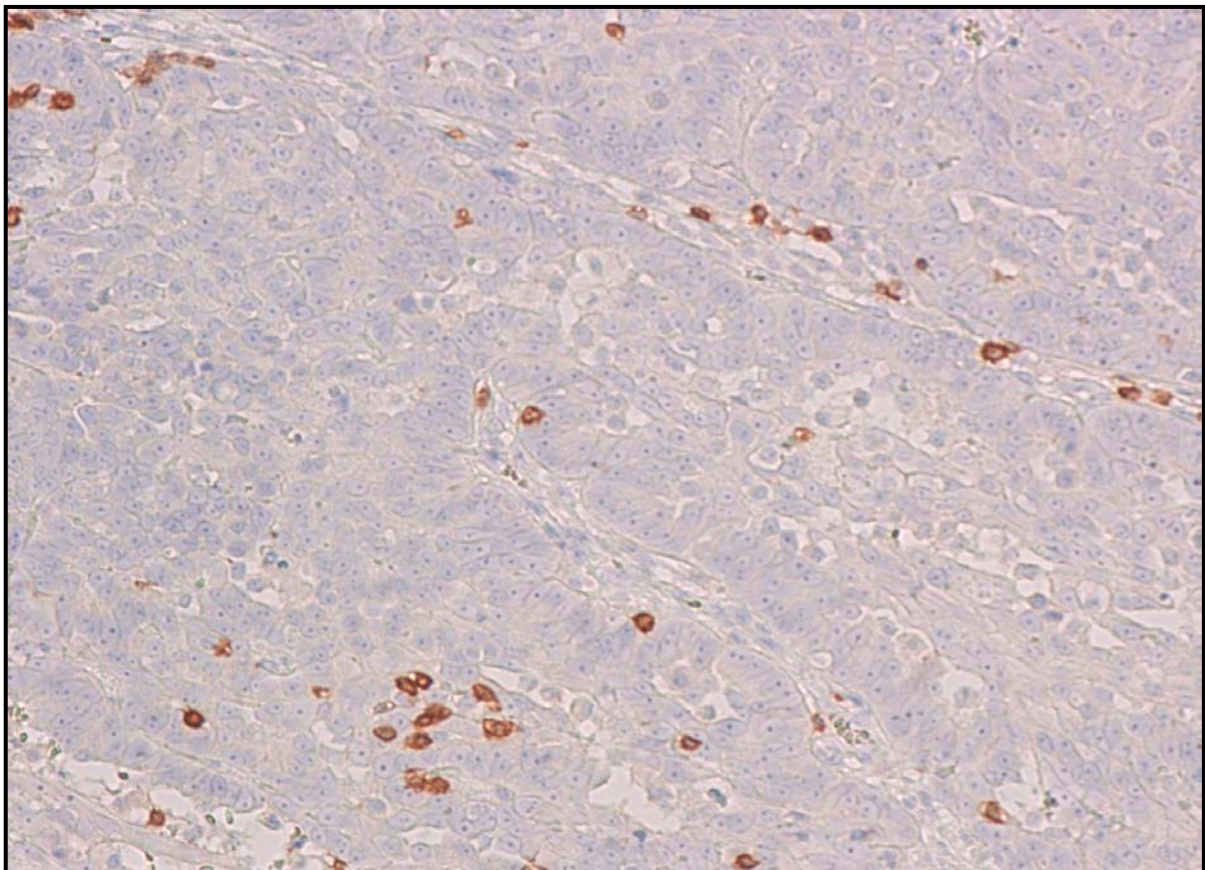
Při statistickém zpracování v univariantsní analýze (log-rang test) byly jako statisticky významné faktory mající vliv na délku přežití zjištěny tyto parametry: věk ( $p = 0,02$ ), stage ( $p = 0,000005$ ), reziduální tumor ( $p = 0,00001$ ), grade ( $p = 0,02$ ) a počet intraepiteliálních CD3 pozitivních TIL ( $p = 0,000002$ ) – viz tabulka 10.

V multivariantsní analýze (Coxova regresní analýza) jsme jako nezávislé prognostické faktory na délku přežití našli tyto parametry: věk ( $p = 0,01$ ),

přítomnost reziduálního tumoru ( $p = 0,004$ ), stage ( $p = 0,004$ ) a počet intraepiteliálních CD3 pozitivních TIL ( $p = 0,00001$ ) - viz tabulka 11.

Histologie a počet stromálních CD3 pozitivních TIL nekoreloval s dobou přežití pacientek s ovariálním karcinomem v univariantní ani multivariantní analýze.

**Obr 7: CD3 pozitivní T lymfocyty v nádorovém epitelu (intraepiteliální), imunohistochemie CD3, zvětšeno 200x**



**Tabulka 10: Výsledky univariantní analýzy**

<b>Nezávislý parametr</b>	<b>Medián přežití (měsíce)</b>	<b>p</b>
Věk (nižší než median vs. vyšší)	> 60 vs. 40	0,02
Stage (I/II vs. III/IV)	> 60 vs. 37	0,000005
Grade (dobře/středně vs. málo diferencov.)	> 60 vs. 39	0,02
Histologie (serózní vs. ostatní)	48 vs. 48	0,77
Reziduální tumor (nepřítomen vs. přítomen)	> 60 vs. 28	0,00001
Stromální TIL (nižší než median vs. vyšší)	56 vs. 48	0,80
Intraepiteliální TIL (nižší než median vs. vyšší)	29 vs. > 60	0,000002

**Tabulka 11: Výsledky multivariantní analýzy**

<b>Nezávislý parametr</b>	<b>Relativní riziko</b>	<b>95 % C.I.</b>	<b>p</b>
Věk	0,50	0,29 – 0,85	0,01
Stage	0,23	0,09 – 0,64	0,004
Reziduální tumor	0,43	0,24 – 0,74	0,004
Intraepiteliální TIL	3,91	2,22 -6,91	0,00001

## 5. Diskuze

Karcinom ovária je šestým nejčastějším maligním onemocněním u žen na světě. Tento nádor je nejčastější příčinou smrti ze všech gynekologických maligních nádorů. Vysoká mortalita je zapříčiněna zejména tím, že je tento nádor často diagnostikován až v pokročilých stádiích (stádium III, event. IV), neboť časná stádia jsou obvykle asymptomatická a neexistují efektivní screeningové metody. Průměrné 5-leté přežití je 40%, v pokročilých stádiích je to však pouhých 10-20%. Z hlediska prognózy mají zásadní význam stádium nádoru dle FIGO, velikost reziduálního tumoru, věk a celkový stav pacientky v době diagnózy, histologie tumoru a v případě časných stádií též stupeň diference nádoru (grade) (25, 47).

V současné době je problém ovariálního karcinomu ve světové literatuře velmi diskutovaným tématem. Existuje velké množství studií, které přinášejí často rozporuplné údaje. Rozsáhle studovanou oblastí je zejména určení možných prognostických markerů, které by mohly predikovat další vývoj onemocnění a pomoci tak onkologům při volbě vhodné protinádorové terapie (agresivnější terapie u nádorů s prognosticky nepříznivými faktory).

Prezentovaná data této práce potvrdily výsledky řady předchozích studií, že u ovariálního karcinomu mají zásadní prognostický význam zejména klinické parametry. Mezi nejdůležitější z nich patří věk pacientky v době diagnózy a velikost nádorového rezidua po primární operaci (7, 9, 11, 27, 31, 36, 48).

Na našem souboru ovariálního karcinomu byly tyto dva faktory potvrzeny jako statisticky významné, jak v univariátní analýze (věk  $p = 0,02$ , reziduální tumor  $p = 0,00001$ ), tak zejména v analýze multivariátní ( věk  $p = 0,01$ , reziduální tumor  $p = 0,004$ ). Srovnávali jsme přežití pacientek mladších než je medián a starších, přičemž medián doby přežití byl u mladších žen 60 měsíců, u starších jen 40 měsíců. Relativní riziko úmrtí je u žen mladších jen 0,5 oproti starším pacientkám. Rozdíly u skupiny s přítomným reziduálním tumorem a skupiny bez něj jsou ještě nápadnější: medián doby přežití 28 měsíců oproti 60 měsícům. Relativní riziko úmrtí u pacientek

bez nádorového rezidua po primární chirurgické operaci je jen 0,43 oproti pacientkám s reziduálním nádorem.

Pokročilost nádorového onemocnění (stage) je dalším významným prognostickým faktorem. V naší studii jsme porovnávali skupinu pacientek s časným nádorovým onemocněním (tj. stádium I a II dle FIGO) a skupinu s pokročilým onemocněním (tj. stádium III a IV dle FIGO). Univariální i multivariální analýza našla stage jako statisticky významný prognostický faktor ( $p = 0,000005$ , resp.  $p = 0,004$ ). Medián doby přežití u pacientky s časným onemocněním byl 60 měsíců, zatímco u žen s pokročilým nádorovým onemocněním jen 37 měsíců. Relativní riziko úmrtí u žen s nádorem v časných stádiích je pouze 0,23 oproti pacientkám s pokročilým nádorovým onemocněním.

K obdobným výsledkům jako jsou naše dospěly i jiné studie (7, 12, 49). Oproti tomu studie autorů Chi a kol. na souboru 282 pacientek s ovariálním karcinomem našla prognostický význam pokročilosti nádorového onemocnění jen v analýze univariální, v multivariální však již ne (11).

Některé práce za prognosticky významný faktor považují i histologický typ ovariálního karcinomu. Brun a kol. ve své studii prokázali horší prognózu u serózního karcinomu ve srovnání s ostatními histologickými typy. Ve své studii popisovali 1,7x vyšší riziko úmrtí na tento histologický typ karcinomu (7). Obdobné výsledky jako Brun publikovali na velmi rozsáhlém souboru (1189 pacientek) též Clark a kol. (12). Další práce, která našla prognostický význam histologického typu ovariálního karcinomu, byla studie autorů Makar a kol. Tito autoři na souboru 455 pacientek s ovariálním karcinomem ve stádiu III prokázali histologický typ jako významný prognostický faktor ( $p < 0,001$ ). Dle jejich studie má nejlepší prognózu endometroidní karcinom, prognosticky nejhorší je karcinom světlobuněčný, jehož riziko úmrtí je 7x vyšší než u karcinomu endometroidního (27). Omura a kol. na souboru 726 pacientek s ovariálním karcinomem ve stádiu III a IV našli horší prognózu u mucinózního a světlobuněčného karcinomu, neboť se jedná o nádory málo citlivé na chemoterapii (31).

V naší studii jsme srovnávali přežití skupiny pacientek se serózním karcinomem ovária se skupinou pacientek s ostatními histologickými typy.

V univariantsní ani multivariantsní analýze jsme nenalezli žádný prognostický význam histologického typu. Medián doby přežití byl u obou skupin pacientek 48 měsíců.

Mezi další histologické prognostické faktory je řazen stupeň diferenciacce (grade) ovariálního karcinomu. Makar a kol. v multivariantsní analýze zjistili, že riziko úmrtí pacientek se středně a málo diferencovaným ovariálním karcinomem je oproti dobře diferencovanému 2,5x vyšší ( $p < 0,001$ ) (27). Taktéž Clark a kol. ve své studii na rozsáhlém souboru 1189 ovariálních karcinomů potvrdili stupeň diferenciacce za nezávislý prognostický faktor (12). Některé studie však našly grade jako prognosticky významný faktor pouze v univariantsní analýze, multivariantsní analýza však tento výsledek nepotvrdila (7, 49). Jiné práce naopak prognostický význam stupně diferenciacce neprokázaly vůbec (1). Tyto rozdílné výsledky jsou zřejmě částečně způsobeny inter- a intrapersonální variabilitou v hodnocení gradingu a též nejednotností v systému určování stupně diferenciacce. K eliminaci této chyby jsme v naší práci použili hodnocení gradingu dle Silverberga (43). Grade je však považován za významný prognostický faktor u časných stádií ovariálního karcinomu (stage I a II) (45, 55).

V naší studii jsme v univariantsní analýze prognostický význam diferenciacce ovariálního karcinomu našli ( $p = 0,02$ ). Medián doby přežití byl ve skupině karcinomů dobře diferencovaných 60 měsíců, zatímco ve skupině karcinomů středně a málo diferencovaných byl jen 39 měsíců. Multivariantsní analýza však grade za nezávislý prognostický faktor nepotvrdila.

Reakce mezi imunitním systémem organismu a nádorem hraje velmi důležitou roli v progresi nádorového růstu. Recentní studie ukazují, že tato interakce může být ovlivněna tvorbou solubilních substancí nádorovými buňkami a tumor infiltrujícími lymfocyty (17). Přítomnost tumor infiltrujících lymfocytů v nádoru je považována za indikátor odpovědi imunitního systému organismu na nádorové antigeny a řada studií výraznou lymfocytární infiltraci nádoru považuje za pozitivní prognostický parametr na celkové přežití (40).

Již v roce 1991 ve své práci autoři Ma a kol. vyšetřili soubor 94 pacientek s karcinomem ovaria za využití  $\alpha$ -naftyl acetázy k detekci tumor infiltrujících lymfocytů. Využili tedy histochemické, nikoliv imunohistochemické detekce těchto lymfocytů.

Autoři ve své práci našli korelaci mezi přítomností TIL v nádorové tkáni a celkovým přežitím pacientek s ovariálním karcinomem, ale též se stádiem maligního onemocnění, histologickým typem a diferenciací karcinomu (26).

V roce 2003 publikovali výsledky své studie Zhang L. a kol. Imunohistochemicky vyšetřili celkem 186 karcinomů ovaria ve stádiu III a IV dle FIGO za použití antigenu CD3 k detekci T lymfocytů v nádorové tkáni a našli korelaci mezi přítomností či absencí TIL a klinickým průběhem pokročilého karcinomu ovaria. Přítomnost TIL v nádorové tkáni byla spojena s mediánem doby přežití 2.8x delším než u nádorů bez TIL. V multivariantní analýze potvrdili TIL za nezávislý prognostický faktor ( $p < 0.001$ ) (56).

Další prací zabývající se prognostickým významem TIL u ovariálního karcinomu je studie autorů Raspollini a kol. z roku 2005. Imunohistochemicky vyšetřili celkem 95 serózních karcinomů ovaria ve stádiu III dle FIGO. Taktéž tato práce potvrdila prognosticky významný TIL na celkové přežití pacientek s touto malignitou ( $p = 0.0001$ ). Navíc našli asociaci mezi počtem CD3 pozitivních TIL a odpovědí na první linii chemoterapie (35).

V roce 2005 byla publikována další práce zaměřující se na význam TIL u ovariálního karcinomu. V této studii Sato a kol. jako první rozlišují stromální (v nádorovém stromatu) a intraepiteliální (v nádorovém epitelu) lymfocyty. Autoři vyšetřili celkem 117 karcinomů ovaria ve všech stádiích a zastoupeny byly všechny histologické typy. Kromě antigenu CD3 stanovovali imunohistochemicky i další markery T lymfocytů (např. CD4 a CD8). V případě CD3 pozitivních T lymfocytů nenalezli žádnou korelaci mezi jejich počtem v nádorovém stromatu ani intraepiteliálně a prognózou onemocnění. Jako jediný subtyp lymfocytů, který měl v této studii prognostický význam na celkovou dobu přežití, byl počet intraepiteliálních CD8 pozitivních TIL ( $p = 0,002$ ) (40).

Obdobně jako Sato a kol. (40) jsme i my v naší studii zhodnotili zvlášť prognostický význam CD3 pozitivních T lymfocytů v nádorovém stromatu a zvlášť T lymfocytů infiltrujících nádorový epitel, tzv. intraepiteliálních lymfocytů. V případě stromálních lymfocytů jsme nenalezli žádný prognostický význam v univariantní ani multivariantní analýze. U pacientek s počtem stromálních T lymfocytů vyšších než medián byl medián doby přežití 48 měsíců, u pacientek s počtem stromálních T

lymfocytů nižším než medián jen 56 měsíců, což se však ukázalo statisticky nevýznamné ( $p = 0,80$ ). Mnohem zajímavější statistické výsledky (jak v univariátní, tak multivariátní analýze) byly v případě tzv. intraepiteliálních CD3+ T lymfocytů. Medián doby přežití byl u žen s počtem intraepiteliálních T lymfocytů vyšším jak medián více jak 60 měsíců, zatímco u pacientek s počtem těchto lymfocytů nižším jak medián pouhých 29 měsíců. Tento parametr je velmi silným prognostickým faktorem (v univariátní analýze  $p = 0,000002$ , v multivariátní analýze  $p = 0,00001$ ). Relativní riziko úmrtí pacientek s ovariálním karcinomem, kde je přítomnost intraepiteliálních lymfocytů nižší než medián, je 3,91x vyšší než u žen s počtem těchto lymfocytů vyšším než medián.

Naše výsledky tedy potvrzují nálezy předchozích studií, že přítomnost intraepiteliálních tumor infiltrujících lymfocytů má prognostický význam na přežití žen s malignitou, s tak špatnou prognózou jako je karcinom ovária. Ačkoliv většina pacientek s pokročilým ovariálním karcinomem v iniciální fázi reaguje na chemoterapii, dlouhodobé výsledky chemoterapie nejsou již tak příznivé. Manipulace s imunitním systémem vedoucí k navození imunitní odpovědi organismu proti nádoru nabízí možnost zefektivnění protinádorové léčby s eradikací reziduálních nádorových buněk (35).



## 6. Závěr

Naše práce na souboru 116 pacientek vyšetřených na Fingerlandově ústavu patologie Fakultní nemocnice Hradec Králové zjistila, že přítomnost imunohistochemicky detekovaných CD3 pozitivních intraepiteliálních tumor infiltrujících T lymfocytů je prognosticky významný faktor.

Při statistickém zpracování v univariální analýze byly jako významné faktory mající vliv na délku přežití tyto faktory: věk ( $p = 0,02$ ), pokročilost nádorového onemocnění - stage ( $p = 0,000005$ ), přítomnost či absence reziduálního tumoru po primární operaci ( $p = 0,00001$ ), diferenciaci (grading) ovariálního karcinomu ( $p = 0,02$ ) a počet intraepiteliálních CD3 pozitivních TIL ( $p = 0,000002$ ).

V multivariální analýze jsme jako nezávislé prognostické faktory našli tyto parametry: věk ( $p = 0,01$ ), přítomnost či absence reziduálního tumoru ( $p = 0,004$ ), staging nádoru ( $p = 0,004$ ) a počet intraepiteliálních CD3 pozitivních TIL ( $p = 0,00001$ ).

## 7. Souhrn

Karcinom ovaria je jedním z nejčastějších nádorových onemocnění u žen.

Dle klasifikace WHO se dělí na nádory z povrchového epitelu, nádory gonadostromální, nádory germinální, nádory smíšené germinální a gonadostromální, nádory nespecifické pro ovarium, nádory sekundární, nádory neklasifikovatelné,

Prognóza onemocnění závisí na věku a celkovém stavu pacientky v době diagnózy, klinickém stadiu (stage), diferenciaci (grading) nádoru, histologickém typu a velikosti reziduálního tumoru. V současné době se studuje celá řada prognostických faktorů, které se dají stanovit imunohistochemicky, např. estrogenové a progesteronové receptory, onkoprotein HER-2/neu, onkoproteiny, které se vztahují k apoptóze jako jsou p53, p21, bcl-2, zhodnocením kinetiky buněčného růstu např. pomocí antigenu Ki-67 či stanovení angiogeneze v nádoru.

Naše práce se zaměřila na zjištění prognostického významu tumor infiltrujících lymfocytů. Na souboru 116 pacientek jsme imunohistochemicky stanovovali CD3 pozitivní T - lymfocyty uložené intraepiteliálně či stromálně.

Při statistickém zpracování v univariální analýze byly jako významné faktory mající vliv na délku přežití tyto faktory: věk ( $p = 0,02$ ), staging nádoru ( $p = 0,000005$ ), reziduální tumor ( $p = 0,00001$ ), grading nádoru ( $p = 0,02$ ) a počet intraepiteliálních CD3 pozitivních TIL ( $p = 0,000002$ ).

V multivariální analýze jsme jako nezávislé prognostické faktory našly tyto parametry: věk ( $p = 0,01$ ), přítomnost reziduálního tumoru ( $p = 0,004$ ), staging nádoru ( $p = 0,004$ ) a počet intraepiteliálních CD3 pozitivních TIL ( $p = 0,00001$ ).

## 8. Summary

Ovarian cancer is one of the most frequent woman malignites.

According to the classification WHO is divided into the tumors from epithelium, germinal tumors, gonadostromal tumor, mixed germinal and gonadostrominal tumor, unspecified ovarian tumor , secondary tumor and unclassified tumor.

The prognosis of disease depends on the age and general condition of the woman patiens in the time of the diagnoses, their tumor stage, grade, histological subtype and the size of the residual tumor. At the present time there are many prognosis factors that can be detected immunohistochemically : steroids receptors, onkoprotein HER-2/neu, onkoproteins which apply to the apoptosis – p53, p21, bcl-2, markers of the cell tumor growth – Ki-67, and by setting the angiogenesis in tumor.

The aim of the present study was to investigate the prognostic significance of tumor-infiltrating T lymphocytes on overall survival of ovarian cancer patients. We evaluated retrospectively by immunohistochemistry the distribution of CD3 positive TIL (both in cancer stroma and within cancer epithelium) in tumor specimens of 116 patients.

In univariate analysis, age ( $P = 0.02$ ), stage ( $P = 0.000005$ ), grade ( $P = 0.02$ ), presence of residual tumor ( $P = 0.00001$ ), and intraepithelial CD3 positiv TIL count ( $P = 0.000002$ ), were associated with overall survival.

In multivariate analysis, age ( $P = 0.01$ ), presence of residual tumor ( $P = 0.004$ ), stage ( $P = 0.004$ ), and intraepithelial CD3 positiv TIL count ( $P = 0.00001$ ) were found to be significant independent predictors of overall survival.

## 9. Literatura

1. Akahira JI, Yoshikawa H, Shimizu Y, Tsunematsu R, Hirakawa T, Kuramoto H, Shiromizu K, Kuzuya K, Kamura T, Kikuchi Y, Kodama S, Yamamoto K, Sato S. Prognostic factors of stage IV epithelial ovarian cancer: a multicenter retrospective study. *Gynecol Oncol.* 2001; 81: 398-403.
2. Baak JP, Langley FA, Talerman A, Delemarre JF. Interpathologist and intrapathologist disagreement in ovarian tumor grading and typing. *Anal Quant Cytol Histol.* 1986; 8: 354-357.
3. Benda JA, Zaino R. *Pathology Manual.* Buffalo, NY: Gynecologic Oncology Group, 1994.
4. Baekelandt M, Holm R, Nesland JM, Trope CG, Kristensen GB. Expression of apoptosis-related proteins is an independent determinant of patient prognosis in advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 2000; 18:3775-3781.
5. Benedet JL, Bender H, Jones H 3rd, Ngan HY, Pecorelli S. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gynaecol Obstet.* 2000; 70: 209-262.
6. Bichel P, Jakobsen A. A new histologic grading index in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* 1989; 8: 147-155.
7. Brun JL, Feyler A, Chene G, Saurel J, Brun G, Hocke C. Long-term results and prognostic factors in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2000; 78: 21-27.
8. Camilleri-Broet S, Hardy-Bessard AC, Le Tourneau A, Paraiso D, Levrel O, Leduc B, Bain S, Orfeuvre H, Audouin J, Pujade-Lauraine E. HER-2 overexpression is an independent marker of poor prognosis of advanced primary ovarian carcinoma: a multicenter study of the GINECO group. *Ann Oncol.* 2004; 15:104-112.
9. Chan JK, Loizzi V, Lin YG, Osann K, Brewster WR, DiSaia PJ. Stages III and IV invasive epithelial ovarian carcinoma in younger versus older women: what prognostic factors are important? *Obstet Gynecol.* 2003; 102: 156-161.

10. Chen CA, Cheng WF, Lee CN, Chen TM, Kung CC, Hsieh FJ, Hsieh CY. Serum vascular endothelial growth factor in epithelial ovarian neoplasms: correlation with patient survival. *Gynecol Oncol* 1999; 74: 235-240.
11. Chi DS, Liao JB, Leon LF, Venkatraman ES, Hensley ML, Bhaskaran D, Hoskins WJ. Identification of prognostic factors in advanced epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2001; 82 :532-537.
12. Clark TG, Stewart ME, Altman DG, Gabra H, Smyth JF. A prognostic model for ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2001; 85: 944-952.
13. Emoto M, Iwasaki H, Mimura K, Kawarabayashi T, Kikuchi M. Differences in the angiogenesis of benign and malignant ovarian tumors, demonstrated by analyses of color Doppler ultrasound, immunohistochemistry, and microvessel density. *Cancer* 1997; 80: 899-907.
14. Geisler HE, Geisler JP, Miller GA, Geisler MJ, Wiemann MC, Zhou Z, Crabtree W. p21 and p53 in ovarian carcinoma: their combined staining is more valuable than either alone. *Cancer*. 2001; 92: 781-786.
15. Goff BA, Muntz HG, Greer BE, Tamimi HK, Gown AM. Oncogene expression: long-term compared with short-term survival in patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1998; 92: 88-93.
16. Gotlieb WH, Goldberg I, Weisz B, Davidson B, Novikov I, Kopolovic J, Ben-Baruch G. Topoisomerase II immunostaining as a prognostic marker for survival in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2001; 82: 99-104.
17. Helal TE, Khalf Alla AE, Laban MA, Fahmy RM. Immunophenotyping of tumor-infiltrating mononuclear cells in ovarian carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2004; 10: 80-84.
18. Hempling RE, Piver MS, Eltabbakh GH, Recio FO. Progesterone receptor status is a significant prognostic variable of progression-free survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Am J Clin Oncol*. 1998; 21: 447-451.
19. Hengstler JG, Lange J, Kett A, Dornhofer N, Meinert R, Arand M, Knapstein PG, Becker R, Oesch F, Tanner B. Contribution of c-erbB-2 and topoisomerase IIalpha to chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res*. 1999; 59: 3206-3214.
20. Hogdall EV, Christensen L, Kjaer SK, Blaakaer J, Bock JE, Glud E, Norgaard-Pedersen B, Hogdall CK. Distribution of HER-2 overexpression in ovarian

- carcinoma tissue and its prognostic value in patients with ovarian carcinoma: from the Danish MALOVA Ovarian Cancer Study. *Cancer*. 2003; 98: 66-73.
21. Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol*. 2000;19: 3-10.
  22. Jungueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Základy histologie*. Prentice-Hall International Inc., 1995: 419-426.
  23. Kaku T, Ogawa S, Kawano Y, Ohishi Y, Kobayashi H, Hirakawa T, Nakano H. Histological classification of ovarian cancer. *Med Electron Microsc*. 2003; 36: 9-17.
  24. Kolář Z a kol. *Molekulární patologie nádorů*. 2003, 1. vydání, Epava Olomouc.
  25. Kurman RJ. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. Fifth Edition. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, 2002: 791-904.
  26. Ma D, Gu MJ. Immune effect of tumor-infiltrating lymphocytes and its relation to the survival rate of patients with ovarian malignancies. *J Tongji Med Univ* 1991; 11: 235-9.
  27. Makar AP, Baekelandt M, Trope CG, Kristensen GB. The prognostic significance of residual disease, FIGO substage, tumor histology, and grade in patients with FIGO stage III ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 1995; 56: 175-180.
  28. Münstedt K, Steen J, Knauf AG, Buch T, von Georgi R, Franke FE. Steroid hormone receptors and long term survival in invasive ovarian cancer. *Cancer*. 2000; 89: 1783-1791.
  29. Nishida N, Yano H, Komai K, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 2 are related closely to the prognosis of patients with ovarian carcinoma. *Cancer* 2004; 101: 1364-1374.
  30. Ogawa S, Kaku T, Kobayashi H, Hirakawa T, Ohishi Y, Kinukawa N, Nakano H. Prognostic significance of microvessel density, vascular cuffing and vascular endothelial growth factor expression in ovarian carcinoma: a special review for clear cell adenocarcinoma. *Cancer Lett* 2002; 176: 111-118.
  31. Omura GA, Brady MF, Homesley HD, Yordan E, Major FJ, Buchsbaum HJ, Park RC. Long-term follow-up and prognostic factor analysis in advanced ovarian

- carcinoma: the Gynecologic Oncology Group experience. *J Clin Oncol.* 1991; 9: 1138-1150.
32. Povýšil C a kol. *Speciální patologie, II. díl.* Karolinum, 1997: 126-137.
33. Quinn CM, Wright NA. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J Pathol.* 1990; 160: 93-102.
34. Raspollini MR, Amunni G, Villanucci A, Baroni G, Boddi V, Taddei GL. Prognostic significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in advanced ovarian serous carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2004;14: 815-823.
35. Raspollini MR, Castiglione F, Rossi Degl'innocenti D, Amunni G, Villanucci A, Garbini F, Baroni G, Taddei GL. Tumour-infiltrating gamma/delta T-lymfocytes are correlated with a brief disease-free interval in advanced ovarian serous cancer. *Annals of Oncology* 2005; 16: 590-596.
36. Rosman M, Hayden CL, Thiel RP, Chambers JT, Kohorn EI, Chambers SK, Schwartz PE. Prognostic indicators for poor risk epithelial ovarian carcinoma. *Cancer.* 1994; 74: 1323-1328.
37. Röhlke P, Milde-Langosch K, Weyland C, Pichlmeier U, Jonat W, Loning T. p53 is a persistent and predictive marker in advanced ovarian carcinomas: multivariate analysis including comparison with Ki67 immunoreactivity. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997; 123: 496-501.
38. Rubin SC, Finstad CL, Wong GY, Almadrones L, Plante M, Lloyd KO. Prognostic significance of HER-2/neu expression in advanced epithelial ovarian cancer: a multivariate analysis. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168: 162-169.
39. Ryška A, Hovorková E, Ludvíková M. Angiogeneze v nádorech. Část II. Metody a význam kvantifikace; angiogeneze jako prognostický ukazatel a cíl možných léčebných postupů. *Česk Patol* 2000; 36: 71-80.
40. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, Frosina D, Gnjjatic S, Ambrosone C, Kepner J, Odunsi T, Ritter G, Lele S, Chen Y, Ohtani H, Old L, Odunsi K. Intraepithelial CD8<sup>+</sup>/tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8<sup>+</sup>/regulatory cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 18538-18543.

41. Schueler JA. Early ovarian carcinoma surgical staging and prognostic factors. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1999; 85: 127-129.
42. Schuyer M, van der Burg ME, Henzen-Logmans SC, Fieret JH, Klijn JG, Look MP, Foekens JA, Stoter G, Berns EM. Reduced expression of BAX is associated with poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer: a multifactorial analysis of TP53, p21, BAX and BCL-2. *Br J Cancer.* 2001; 85:1359-1367.
43. Silverberg SG. Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. *Int J Gynecol Pathol.* 2000; 19: 7-15.
44. Srivastava A, Laidler P, Davies RP, Horgan K, Hughes LE. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma. A quantitative histologic study. *Am J Pathol.* 1988; 133: 419-23.
45. Špaček J, Jílek P, Petera J, Tesařík Z. Histopatologické prognostické faktory, sérové markery a vybrané molekulárně biologické faktory u ovariálního karcinomu. *Cs Gynecol.* 2002; 67: 343-349.
46. Taskiran C, Erdem O, Onan A, Arisoy O, Acar A, Vural C, erdem M, Ataoglu O, Guner H. The prognostic value of endoglin (CD105) expression in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 1789-1793.
47. Tavasolli A, Devilee P. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. In: World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press, 2003, Lyon, 117-145.
48. Thigpen T, Brady MF, Omura GA, Creasman WT, McGuire WP, Hoskins WJ, Williams S. Age as a prognostic factor in ovarian carcinoma. The Gynecologic Oncology Group experience. *Cancer.* 1993; 71: 606-614.
49. Tingulstad S, Skjeldestad FE, Halvorsen TB, Hagen B. Survival and prognostic factors in patients with ovarian cancer. *Obstet Gynecol.* 2003; 101: 885-891.
50. Tomšová M. Imunohistochemické vyšetření prognostických markerů u ovariálního karcinomu. Dizertační práce, 2004.
51. Tomšová M, Melichar B, Sedláková I, Nová M. Prognostické faktory u ovariálního karcinomu – retrospektivní práce. *Česk Patol* 2005; 41: 51-59.
52. Tomšová M, Melichar B. Contribution of immunohistochemistry in prognostic assessment of epithelial ovarian carcinoma - review of the literature I. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2006; 49: 161-165.



53. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 1991; 324: 1-8.
54. Yabushita H, Noguchi M, Obayashi Y, Kishida T, Noguchi Y, Sawaguchi K, Noguchi M. Angiostatin expression in ovarian cancer. *Oncol Rep* 2003; 10: 1225-1230.
55. Zanetta G, Rota S, Chiari S, Bonazzi C, Bratina G, Torri V, Mangioni C. The accuracy of staging: an important prognostic determinant in stage I ovarian carcinoma. A multivariate analysis. *Ann Oncol*. 1998; 9: 1097-1101.
56. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimolly PA, Massabrio M, Regnani G, Makrigiannalas A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, Coukos G. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 203-213.
57. Zusman I, Gurevich P, Gurevich E, Ben-Hur H. The immune system, apoptosis and apoptosis-related proteins in human ovarian tumors (a review). *Int J Oncol* 2001; 18: 965-972.
58. [www.uzis.cz/download.php?ctq=20&region=1000&mnv\\_id=S130&mnv\\_action=select](http://www.uzis.cz/download.php?ctq=20&region=1000&mnv_id=S130&mnv_action=select))

## **10. Seznam tabulek, grafů a obrázků**

### ***Tabulky***

- Tabulka 1: Klasifikace nádorů ovaria dle WHO – str. 6
- Tabulka 2: Grading karcinomu ovaria dle Silberberga – str. 15
- Tabulka 3A: Staging ovariálního karcinomu dle primárního nádoru (T) – str. 16
- Tabulka 3B: Staging ovariálního karcinomu dle lymfatických uzlin (N) – str. 17
- Tabulka 3C: Staging ovariálního karcinomu dle vzdálených metastáz (M) – str. 17
- Tabulka 4: Staging karcinomu ovaria dle FIGO klasifikace – str. 17
- Tabulka 5: Postup imunohistochemického vyšetření – str. 27
- Tabulka 6: Rozdělení případů dle pokročilosti nádoru – str. 31
- Tabulka 7: Rozdělení případů dle velikosti reziduálního tumoru – str. 31
- Tabulka 8: Přehled zastoupení jednotlivých histologických typů - str. 32
- Tabulka 9: Grading dle jednotlivých histologických typů – str. 32
- Tabulka 10: Výsledky univariantní analýzy – str. 35
- Tabulka 11: Výsledky multivariantní analýzy – str. 35

### ***Grafy***

- Graf 1: Rozdělení pacientek dle dekád věku – str. 30

### ***Obrázky***

- Obr. 1: Serózní karcinom ovária, HE, zvětšeno 200x – str. 7
- Obr. 2: Mucinózní karcinom ovária, HE, zvětšeno 200x – str. 8
- Obr. 3: Endometroidní karcinom ovária, HE, zvětšeno 400x – str. 9
- Obr. 4: Světlobuněčný karcinom ovária, HE, zvětšeno 400x – str. 10
- Obr. 5: Dlaždicobuněčný karcinom ovária, HE, zvětšeno 200x – str. 11
- Obr. 6: CD3 pozitivní T lymfocyty v nádorovém stromatu (stromální) imunohistochemie CD3, zvětšeno 200x - str. 33
- Obr. 7: CD3 pozitivní T lymfocyty v nádorovém epitelu (intraepiteliální) imunohistochemie CD3, zvětšeno 200x str. 34

## 11. Seznam zkratek

Ab - protilátka

Ag - antigen

C.I. - confidence interval

DAB - diaminobenzidin

DNA - deoxyribonukleová kyselina

EGF - epidermal growth factor

ELISA - enzym linked immunosorbent assay

ER - estrogenový receptor

FIGO - the International Federation of Gynecology and Obstetrics

FGF - basic fibroblast growth factor

GOG - Gynecologic oncology group

HE - hematoxilin – eosin

HPF - high power field

NK - natural killer

PCNA - proliferating cell nuclear antigen

PR - progesteronový receptor

TIL - tumor infiltrující lymfocyty

VEGF - vaskulární endoteliální růstový faktor

WHO - světová zdravotnická organizace

