

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Maciej Pawłowski

***Immunohistochemiczna
ocena ekspresji Egfl7 w tkance
surowiczego raka jajnika***

GDAŃSK 2015

Wydano za zgodą
Dziekana Wydziału Lekarskiego

Oddział Ginekologii Onkologicznej
Gdyńskie Centrum Onkologii

Promotor
dr hab. n. med. Jacek Sznurkowski

Medical University of Gdańsk 2015
ISBN 978-83-65098-09-2

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	6
1. WSTĘP	10
1.1 Epidemiologia raka jajnika	10
1.1.1 Dane ogólne: Świat/Europa/Polska	10
1.1.2 Czynniki ryzyka	11
1.1.3 Zabiegi profilaktyczne	13
1.2 Klasyfikacja stopnia zaawansowania raka jajnika według FIGO	13
1.3 Typy histopatologiczne raka jajnika	16
1.4 Surowiczy rak jajnika	17
1.4.1 LGSOC (<i>Low Grade Serous Ovarian Cacinoma</i>)	18
1.4.2 HGSOC (<i>High Grade Serous Ovarian Carcinoma</i>)	19
1.5 Typy molekularne raka jajnika	20
1.6 Diagnostyka raka jajnika	22
1.6.1 Badania przesiewowe	22
1.6.2 Badania obrazowe w raku jajnika	23
1.6.3 Rola markerów – diagnostyka laboratoryjna	25
1.6.4 Metoda diagnostyczna skojarzona – wskaźnik RMI (<i>Risk Of Malignancy Index</i>)	27
1.7 Leczenie raka jajnika	28
1.7.1 Leczenie chirurgiczne raka jajnika	28
1.7.2 Chemioterapia w raku jajnika	35
1.7.3 Terapia antyangiogenna	40
1.7.4 Zasady nowoczesnego leczenia skojarzonego raka jajnika (EBM)	42
1.7.5 Radioterapia w raku jajnika	42
1.7.6 Wyniki leczenia raka jajnika	43
1.8 Teoria immunoedycji w nowotworach: nadzór, równowaga i ucieczka	43
1.9 Egfl7	45
1.9.1 Egfl7 i angiogeneza	45
1.9.2 Egfl7 i nowotwory	47
1.10 TILs: komórki immunokompetentne w tkance raka	47
1.10.1 Znaczenie prognostyczne TILs w raku jajnika	48

2.	CEL PRACY	49
3.	MATERIAŁ I METODA	50
3.1	Pacjenci	50
3.2	Materiał tkankowy.....	51
3.3	Oznaczenia immunohistochemiczne	51
3.3.1	Przygotowanie preparatów.....	51
3.3.2	Przeciwciała	52
3.3.3	Barwienie immunohistochemiczne	52
3.3.4	Ocena odczynów immunohistochemicznych Egfl 7 – metoda półilościowa	53
3.3.5	TILs: CD8+ i CD4+ – metoda ilościowa	54
3.4	Analiza cech kliniczno-patologicznych w grupie chorych z HGSOc.....	54
3.5	Ocena ekspresji egfl7	55
3.6	Analiza statystyczna	55
4.	WYNIKI	57
4.1	Badana populacja – opis grupy pod względem kliniczno- patologicznym	57
4.1.1	Wiek.....	57
4.1.2	Status menopauzalny kobiet w chwili rozpoznania choroby .	59
4.1.3	Waga ciała.....	60
4.1.4	Zmiana wagi między operacją pierwotną a pierwszym cyklem chemioterapii	61
4.1.5	Wskaźnik masy ciała BMI (<i>Body Mass Index</i>)	63
4.1.6	Optymalna cytoredukcja	64
4.1.7	Ocena związku między utratą wagi ciała pomiędzy operacją pierwotną a pierwszym cyklem chemioterapii z opornością na platynę.....	65
4.1.8	Poziom antygenu CA 125 przed leczeniem	66
4.1.9	Stopień zaawansowania klinicznego choroby według FIGO.	69
4.1.10	Wodobrzusze.....	71
4.1.11	Liczba neutrocytów i limfocytów w surowicy krwi oraz wskaźnik neutrocytarno-limfocytny przed operacją pierwotną.....	73
4.1.12	Czas oczekiwania od zabiegu do pierwszego cyklu chemioterapii.....	77

4.2	Komórki immunokompetentne w mikrośrodowisku HGSOE	82
4.2.1	Komórki efektorowe CD4+ i CD8+.....	82
4.3	Egfl7 w HGSOE.....	83
4.3.1	Ekspresja Egfl 7 w tkance HGSOE	84
4.3.2	Związek Egfl7 z cechami kliniczno-patologicznymi	85
4.3.3	Znaczenie cytoplazmatycznej ekspresji Egfl7+ i jej wartość prognostyczna	86
4.3.4	Znaczenie ekspresji jądrowej Egfl7 w HGSOE	89
4.4	Analiza jedno- i wieloczynnikowa	98
5.	DYSKUSJA.....	101
6.	WNIOSKI.....	116
7.	PIŚMIENNICTWO	117
8.	STRESZCZENIE	140
9.	SUMMARY	143

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

SOC – *serous ovarian cancer* – surowiczy rak jajnika

HGSOC – *high grade serous ovarian cancer* – niskozróżnicowany surowiczy rak jajnika

LGSOC – *low grade serous ovarian cancer* – wysokozróżnicowany surowiczy rak jajnika

NPJ – nabłonek pokrywający jajnik

Egfl7 – *epidermal growth factor like 7* – czynnik podobny do czynnika wzrostu naskórka z domeną 7

FIGO – *International Federation of Gynecology and Obstetrics* – Międzynarodowa Federacja Położników i Ginekologów

UICC – *Union for International Cancer Control* – Międzynarodowa Unia do Walki z Rakiem

TAAAs – *tumor associated antigens* – antygeny towarzyszące guzom

MHC – *major histocompatibility complex* – główny układ zgodności tkankowej

CD4 – *cluster of differentiation 4*

CD8 – *cluster of differentiation 8*

CD25 – *cluster of differentiation 25*

FOXP3 – *forkhead box P3*

NK – *natural killer* – komórki NK

APC – *antigen presenting cell* – komórka prezentująca antygen

CTL – *cytotoxic lymphocytes* – limfocyty cytotoksyczne

STIC – *serous tubal intraepithelial carcinoma* – wewnątrz nabłonkowy surowiczy rak jajowodu

TILs – *tumor infiltrating lymphocytes* – limfocyty naciekające guzy nowotworowe

T_{regs} – *regulatory T cells* – regulatorowe limfocyty T

GOG – *Gynecologic Oncology Group*

HBOC – *hereditary breast ovarian cancer* – dziedziczny rak jajnika i piersi

HOC – *hereditary ovarian cancer* – dziedziczny rak jajnika

HPF – *high power field* – pole widzenia w obserwacji mikroskopowej, przy użyciu maksymalnego powiększenia (zwykle 400×)

PDS – *primary debulking surgery* – pierwotny zabieg cytoredukcyjny

IDS – *interval debulking surgery* – odroczonego zabieg cytoredukcyjny

ESGO – *European Society of Gynaecological Oncology* – Europejskie Towarzystwo Ginekologii Onkologicznej

TNBC – *triple negative breast cancer* – potrójnie ujemny rak piersi

ACOG – *American Congress of Obstetricians and Gynecologists* – Amerykańskie Kolegium Ginekologów i Położników

MVD – *microvessel density* – gęstość naczyń krwionośnych w guzie nowotworowym

ICAM 1 – *intercellular adhesion molecule 1 (CD 54- Cluster of Differentiation 54)*

VCAM 1 – *vascular cell adhesion molecule 1 (CD 106- Cluster of Differentiation 106)*

PC – paklitaksel i karboplatyna

NLR – *neutrophil- lymphocyte ratio* – wskaźnik neutrocytarno-limfocytny

SBT – *serous borderline tumor* – surowiczy guz o granicznej złośliwości

WHO – *World Health Organization* – Światowa Organizacja Zdrowia

HTZ – hormonalna terapia zastępcza

RR – *relative risk* – ryzyko względne

PFS – *progression free survival* – czas wolny od progresji choroby

OS – *overall survival* – przeżycie całkowite

CA 125 – *cancer antigen 125* – antygen nowotworowy 125

PI – *pulsatility index* – indeks pulsacji

RI – *resistance index* – indeks oporu

FDA – *Food and Drug Administration* – Agencja Żywności i Leków

ROMA – *risk of malignancy algorithm*

HE 4 – *human epididymis protein 4* – podfrakcja 4 ludzkiego białka komórek nabłonkowych najądrza

RMI – *risk of malignancy index*

VEGF – *vascular endothelial growth factor* – czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego

MVD – *microvessel density* – gęstość naczyń krwionośnych w guzie nowotworowym

EMA – *European Medicines Agency* – Europejska Agencja Leków

ASCO – *American Society of Clinical Oncology* – Amerykańskie Stowarzyszenie Onkologów Klinicznych

CHTH – chemioterapia

HCC – *hepatocellular carcinoma* – rak wątrobowokomórkowy

LVSI – *lymphovascular space involvement* – zajęcie przestrzeni wokół naczyń chłonnych

WSP. – współpracownicy

EGFL7+ – chore ze stwierdzoną ekspresją Egfl7 w tkance HGSOc

lowEGFL7+ – chore z niską ekspresją Egfl7 w tkance HGSOc

highEGFL7+ – chore z wysoką ekspresją Egfl7 w tkance HGSOC

UMW – test U- Manna- Whitneya

Fischer – test Fischera

FCOX – test F- Coxa

1. WSTĘP

1.1 Epidemiologia raka jajnika

Ryzyko zachorowania na raka jajnika w trakcie całego życia kobiety szacuje się na 1,5%, ryzyko zgonu z powodu tej choroby wynosi około 1% [205].

1.1.1 Dane ogólne: Świat/Europa/Polska

W 2012 r. rozpoznano na świecie 238 719 przypadków pierwotnego raka jajnika (standaryzowany współczynnik zachorowalności - 6,1) i obserwuje się stały wzrost zachorowalności na ten nowotwór. Zajmuje on 7. miejsce pod względem częstości występowania nowotworów złośliwych u kobiet, po raku piersi, jelita grubego, szyjki macicy, płuca, endometrium i żołądka. Zachorowalność jest zróżnicowana: najwyższa na obszarze Fidżi (współczynnik standaryzowany 14,9) i w Europie (Łotwa- współczynnik standaryzowany 14,2), najniższa w Afryce (Komory i Mozambik- odpowiednio 0,8 i 0,9) [79].

W Europie w 2012 r. na raka jajnika zachorowało 65 584 kobiet. Standaryzowany współczynnik zachorowalności był inny dla Europy Zachodniej (7,5) i Środkowo-Wschodniej (11,4). Średni dla Europy – 9,9 [79].

Dane dla Polski z tego samego okresu (2012 rok) pokazują, że rak jajnika był piątym co do częstości występowania nowotworem złośliwym u kobiet, po raku piersi, jelita grubego, płuca, trzonu macicy. Zachorowało na niego 4456 kobiet, standaryzowany współczynnik zachorowalności wyniósł 13,6 [79]. W porównaniu z rokiem 2010 wykazał umiarkowany wzrost. Wśród nowych zachorowań najwięcej wystąpiło w grupie kobiet po 75. roku życia.

Rak jajnika stanowi czwartą przyczynę zgonów z powodu nowotworów złośliwych, 5% wszystkich nowotworów rozpoznawanych u kobiet, oraz 31% nowotworów żeńskiego układu rodneg.

Cechuje się najwyższą umieralnością spośród nowotworów ginekologicznych [79].

W 2012 r. umieralność na świecie wyniosła 3,7 na 100 tys. kobiet (współczynnik standaryzowany); współczynnik umieralności w Europie wyniósł 5,3; a w Polsce 7,3 [79].

1.1.2 Czynniki ryzyka

1.1.2.1 Wiek

Na świecie najczęściej chorują kobiety po 65. roku życia (współczynnik standaryzowany wynosi w tej grupie wiekowej około 25,8) [205].

W Europie 80% raków jajnika rozwija się powyżej 50. roku życia, najczęściej w przedziale 60- 64 lat oraz po 75. roku życia [79].

Osiemdziesiąt do 90% raków jajnika, włączając guzy o granicznej złośliwości, występuje u kobiet po 40. roku życia [210].

W Polsce ponad połowa zachorowań występuje między 50. – 69. rokiem życia. Zachorowania między 40.– 44. rokiem życia stanowią 4,8% [241].

1.1.2.2 Wiek menarche i menopauzy. Czynniki reprodukcyjne.

Menarche <12 i >15 roku życia nie ma wpływu na zachorowanie na raka jajnika. Ryzyko zachorowania wzrasta tym bardziej, im później wystąpiła menopauza [71].

1.1.2.3 Rodność i laktacja

Wśród nieródek i kobiet o niskiej rodności, rak jajnika występuje częściej. Przebycie czterech i więcej porodów oraz przedłużona laktacja redukuje ryzyko rozwoju raka jajnika o 40% [165]. Poronienia obniżają ryzyko zachorowania [154]. Czynniki te wiążą się ze zmniejszoną liczbą owulacji w ciągu życia.

1.1.2.4 Niepłodność

Niepłodność zwiększa ryzyko wystąpienia raka jajnika. U kobiet, u których stymulowano owulację, względne ryzyko (Relative Risk– RR) wynosiło 1,45, natomiast u kobiet po nieudanym zapłodnieniu pozaustrojowym (*in vitro*) RR = 19,0 [229].

1.1.2.5 Antykoncepcja

Doustna antykoncepcja hormonalna obniża ryzyko zachorowania na raka jajnika [154]. Po 5 latach stosowania jest ono mniejsze o 50%. Kobiety, które odbyły 2 porody i stosowały doustną antykoncepcję hormonalną przez 5 lat lub dłużej, mają zredukowane ryzyko wystąpienia raka jajnika o 70% [72]. Doustna antykoncepcja hormonalna to jedyna udokumentowana metoda chemoprewencji raka jajnika. Kobiety, które zażywają doustną antykoncepcję przez okres krótszy

niż 2 lata, wykazują większe ryzyko wystąpienia raka jajnika niż kobiety, które nigdy jej nie stosowały [51].

1.1.2.6 Hormonalna terapia zastępcza (HTZ)

Badanie *Million Women Study* wykazało, że kobiety, które stosowały HTZ w przeszłości, nie miały zwiększonego ryzyka rozwoju raka jajnika (RR= 0,98). U kobiet, które w trakcie rekrutacji do badania stosowały HTZ od ponad 5 lat, ryzyko było większe (RR= 1,23). Ryzyko było wyższe w przypadku stosowania estrogennej (RR 1,53) niż estrogenno-progestagennej terapii zastępczej (RR= 1,17). Częściej rozwijał się rak surowiczy niż śluzowy, endometrialny lub jasno-komórkowy [15].

Stosowanie HTZ u kobiet leczonych z powodu raka jajnika nie jest przeciwwskazane. Wykazano korzystny wpływ na przeżycie i czas wolny od progresji choroby [93].

1.1.2.7 Endometrioza

Stany zapalne miednicy mniejszej (PID), zwłaszcza nawracające, mają związek z rozwojem raka jajnika [187].

Udowodniono, że rak jajnika może rozwinąć się na podłożu endometriozy [237], występowanie endometriozy zwiększa ryzyko jego wystąpienia [20, 155, 156]. Badania molekularne łączą endometriozę z rakiem jajnika poprzez wspólne szlaki, związane ze stresem oksydacyjnym, zapaleniem i hiperestrogenizmem [141]. Najczęściej na podłożu endometriozy rozwija się rak endometrialny i jasnokomórkowy [156].

Ostatnie, ukierunkowane badania genomu, zidentyfikowały częste mutacje genów ARID1A i PIK3CA, oraz umiarkowanie często występujące mutacje PPP2R1A i KRAS w komórkach jasnokomórkowego raka jajnika [106, 237], mutacje PTEN, CTNNB1 i KRAS w raku typu endometrialnego [117, 164].

1.1.2.8 Styl życia i nawyki żywieniowe

Kobiety otyłe (BMI> 30 kg/m²) wykazują większe ryzyko wystąpienia raka jajnika (RR= 1,79) [186]. Zachorowania częściej występują u kobiet palących, mało aktywnych fizycznie. Niskie spożycie zielonych warzyw oraz wysokie spożycie tłuszczu zwiększa ryzyko zachorowania [166].

Wykazano, że komórki raka wykazują ekspresję cyklooksygenazy 2 (COX-2) i że może ona mieć związek z karcinogenezą lub progresją choroby. W kilku

badaniach wykazano, że hamowanie ekspresji COX- 2 przez niesteroidowe leki przeciwzapalne hamuje wzrost nowotworu [4]. Wieloletnie przyjmowanie aspiryny z powodu m.in. reumatoidalnego zapalenia stawów wpływa na zmniejszenie ryzyka wystąpienia raka jajnika [86].

1.1.3 Zabiegi profilaktyczne

Według przeprowadzonej w 2011 r. metaanalizy [38], obejmującej 25521 pacjentek, podwiązanie jajowodów redukuje ryzyko wystąpienia raka jajnika o 34%, a protekcyjny efekt zabiegu jest znaczący nawet 10 – 14 lat po jego wykonaniu. Dotyczy raka endometrialnego i surowiczego, ale nie śluzowego. Ochronne znaczenie tego zabiegu potwierdziło się również wśród nosicierek mutacji w genie BRCA 1 [38].

Wycięcie przydatków u kobiet, mających populacyjne ryzyko rozwoju raka jajnika, wpływa na zmniejszenie zachorowalności, ale ma negatywny wpływ na odległe przeżycia, zwłaszcza w grupie poddanych zabiegowi przed 60 rokiem życia. Wcześniejsze profilaktyczne wycięcie jajników powoduje podwyższenie ryzyka zgonu z powodu chorób sercowo – naczyniowych, wystąpienia chorób otępiennych, choroby Parkinsona, depresji [168]. Zabiegi profilaktyczne mają uzasadnienie wyłącznie u kobiet z udokumentowanym laboratoryjnie podłożem dziedzicznym.

1.2 Klasyfikacja stopnia zaawansowania raka jajnika według FIGO

Do oceny stopnia zaawansowania klinicznego stosuje się klasyfikację Międzynarodowej Federacji Położników i Ginekologów- FIGO. Szczegółową definicję dla poszczególnych stopni zaawansowania według obowiązującej klasyfikacji z 2009 r. przedstawia tabela 1.

Tabela 1. System klasyfikacji klinicznej raka jajnika według FIGO z 2009 r.

Table 1. FIGO 2009 clinical classification of ovarian cancer

STOPIEŃ	OPIS
I	nowotwór ograniczony do jajników
IA	zajęcie jednego jajnika, bez zajęcia torebki i bez wysięku otrzewnowego
IB	zajęcie obu jajników, bez zajęcia torebki i bez wysięku otrzewnowego
IC	zajęcie torebki, pęknięcie torebki, wodobrzusze lub obecność komórek nowotworowych w popłuczynach otrzewnowych
II	nowotwór jednego lub obu jajników, z zajęciem narządów miednicy mniejszej
IIA	zajęcie miednicy lub jajowodów
IIB	zajęcie innych narządów miednicy mniejszej (pęcherz moczowy, odbytnica lub pochwa)
IIC	IIA lub IIB + IC
III	nowotwór jednego lub obu jajników, wychodzący poza miednicę mniejszą lub z przerzutami do węzłów chłonnych zaotrzewnowych
IIIA	mikroskopowe ogniska nowotworu poza miednicą mniejszą
IIIB	ogniska o średnicy ≤ 2 cm
IIIC	ogniska o średnicy > 2 cm lub przerzuty do węzłów chłonnych
IV	nowotwór jednego lub obu jajników z przerzutami odległymi (w tym do wątroby lub opłucnej)

W 2014 r. FIGO zaproponowało nowy system klasyfikacji, zastępując poprzedni.

- Wprowadzono w nim dywersyfikację stopnia IC na grupę C1 (rozlanie zawartości guza podczas operacji), C2 (pęknięta torebka jajnika przed interwencją chirurgiczną, lub guz na powierzchni jajnika), C3 (komórki nowotworu złośliwego w płynie z jamy brzusznej lub w wymazach z otrzewnej).
- Zrezygnowano ze stopnia IIC.
 - Stopień IIIA (przerzuty w węzłach chłonnych zaotrzewnowych i/lub mikroskopowe przerzuty poza miednicą), podzielono na grupę A1- (przerzuty tylko w węzłach chłonnych zaotrzewnowych: A1 (i) ≤ 10 mm; A1 (ii) > 10 mm) A2 – mikroskopowe wszczepy poza miednicą mniejszą +/- przerzuty w węzłach chłonnych zaotrzewnowych.
 - Stopień IIIB obejmuje makroskopowe przerzuty o średnicy ≤ 2 cm poza miednicą mniejszą +/- przerzuty w węzłach chłonnych. Obejmuje także zajęcie torebki wątroby lub śledziony.

- Stopień IIIC obejmuje makroskopowe przerzuty o średnicy > 2 cm poza miednicą mniejszą +/- przerzuty w węzłach chłonnych, a także zajęcie torebki wątroby lub śledziony. Stopień IV podzielono na grupę A (płyn z komórkami nowotworowymi w jamie opłucnej) i B (przerzuty w miększu wątroby i/lub śledziony, przerzuty do narządów poza jamą brzuszną- węzły chłonne pachwinowe oraz węzły chłonne poza jamą brzuszną).

Porównanie klasyfikacji FIGO z 2009 r. i 2014 r. zamieszczono w tabeli 2.

W niniejszej pracy posługujemy się klasyfikacją z 2009 roku, która obowiązywała w trakcie leczenia i obserwacji badanej grupy chorych.

Tabela 2. Porównanie klasyfikacji raka jajnika z 2009 i 2014 roku

Table 2. Comparison of FIGO 2009 and FIGO 2014 classification of ovarian cancer

Stopień I: guz ograniczony do jajników				
Klasyfikacja 2009			Klasyfikacja 2014	
IA	Guz ograniczony do 1 jajnika, torebka zachowana, bez nowotworu na powierzchni, ujemne wymazy cytologiczne/ bez wodobrzusza		IA	Guz ograniczony do 1 jajnika, zachowana torebka, bez nowotworu na powierzchni jajnika, ujemne wymazy cytologiczne
IB	Guzy obu jajników. Pozostałe jak IA		IB	Guz obu jajników. Pozostałe jak IA
IC	Guz obejmuje 1 lub 2 jajniki oraz (którekolwiek z): pęknięta torebka jajnika, guz na powierzchni jajnika, dodatnie wymazy cytologiczne/ wodobrzusze		IC	Guz ograniczony do 1 lub 2 jajników
			IC1	Wyciek treści guza w trakcie operacji
			IC2	Torebka jajnika pęknięta przed interwencją chirurgiczną
		IC3	Komórki raka w płynie wodobrzusza lub wymazach z otrzewnej	
StopieńII: guz 1 lub 2 jajników z ekspansją do miednicy (poniżej granicy miednicy) lub pierwotny rak otrzewnej				
Klasyfikacja 2009			Klasyfikacja 2014	
IIA	Naciek i/lub wszczep w macicy i/lub jajowodzie		IIA	Naciek i/lub wszczepw macicy i/lub jajowodzie
IIB	Naciek na inne wewnątrztrzewnowe tkanki miednicy		IIB	Naciek na inne wewnątrztrzewnowe tkanki miednicy
IIC	IIA lub IIB z dodatnim wynikiem wymazu/ wodobrzusze			
Stopień III: guz 1 lub 2 jajników oraz cytologicznie lub histopatologicznie potwierdzona ekspansja do otrzewnej poza miednicą i/lub przerzuty do zaotrzewnowych węzłów chłonnych				

Klasyfikacja 2009		Klasyfikacja 2014	
IIIA	Przerzuty mikroskopowe poza miednicą	IIIA1	Dodatknie tylko węzły chłonne zaotrzewnowe
		IIIA1 (i)	Przerzuty $\leq 10\text{mm}$
		IIIA1(ii)	Przerzuty $> 10\text{mm}$
IIIB	Makroskopowe przerzuty $\leq 2\text{ cm}$ poza miednicą, wewnątrzotrzewnowe	IIIA2	Mikroskopowe przerzuty wewnątrzotrzewnowe poza miednicą +/- dodatnie węzły chłonne zaotrzewnowe
		IIIB	Makroskopowe przerzuty $\leq 2\text{ cm}$ poza miednicą, wewnątrzotrzewnowo +/- dodatnie węzły chłonne zaotrzewnowe. Dotyczy też zajęcia torebki wątroby/ śledziony
IIIC	Makroskopowe przerzuty $> 2\text{ cm}$ poza miednicą, wewnątrzotrzewnowe i/ lub przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych	IIIC	Makroskopowe przerzuty $> 2\text{ cm}$ poza miednicą, wewnątrzotrzewnowo +/- dodatnie węzły chłonne zaotrzewnowe. Dotyczy też zajęcia torebki wątroby/ śledziony

Stopień IV: Przerzuty odległe poza przerzutami w otrzewnej			
Klasyfikacja 2009		Klasyfikacja 2014	
IV	Odległe przerzuty poza przerzutami w otrzewnej. Obejmują przerzuty w miększu wątroby	IVA	Wysięk opłucnowy z dodatnim wynikiem cytologii
		IVB	Przerzuty do miększu wątroby i/ lub śledziony; przerzuty do narządów poza jamą brzuszną (węzły chłonne pachwinowe, węzły chłonne poza jamą brzuszną)

1.3 Typy histopatologiczne raka jajnika

Według klasyfikacji WHO, pierwotne nowotwory jajnika dzieli się na 3 grupy:

1. Nowotwory z nabłonka pokrywającego jajnik – raki (*surface epithelial-stromal tumors*).
2. Nowotwory ze sznurów płciowych i zrębu jajnika (*sex cord-stromal tumors*).
3. Nowotwory z komórek rozrodczych (*germ cell tumors*).

Szczegółowy podział przedstawia tabela 3.

Tabela 3. Klasyfikacja nowotworów jajnika według WHO
 Table 3. Classification of ovarian tumors according to WHO

Guzy nabłonka powierzchniowego i podścieliska
surowicze: złośliwe, graniczne, łagodne
śluzowe: złośliwe, graniczne, łagodne, torbielowato-śluzowe z guzkami ściennymi, torbielowato-śluzowe ze zmianami o charakterze <i>pseudomyxoma peritonei</i>
endometrioidalne: złośliwe, graniczne, łagodne
jasnokomórkowe: złośliwe, graniczne, łagodne
z komórek nabłonka przejściowego: złośliwe (rak przejściowokomórkowy, złośliwy guz Brennera), graniczne (graniczny guz Brennera), łagodne (łagodny guz Brennera)
z komórek nabłonka płaskiego: złośliwe (rak płaskonabłonkowy), łagodne (torbiel epidermoidalna)
mieszane guzy nabłonkowe: złośliwe, graniczne, łagodne
niezróżnicowane i niesklasyfikowane: rak niezróżnicowany, gruczolakorak o niedokładnie określonym umiejscowieniu (BNO)
Guzy ze sznurów płciowych i podścieliska
ziarniszczaaki i guzy podścieliskowe
guzy z komórek Sertoliego i podścieliska
guzy ze sznurów płciowychmieszane lub niesklasyfikowane
guzy z komórek steroidowych
Guzy zarodkowe
prymitywne guzy zarodkowe: dysgerminoma, yolk sac tumor, rak embrionalny, polyembrioma, choriocarcinoma, mieszany guz zarodkowy
dwufazowe i trójfazowe potworniaki: potworniak dojrzały, potworniak niedojrzały
potworniak jednolistkowy i guzy niezarodkowe związane z torbielą dermoidalną
Guzy zarodkowe ze sznurów płciowych i podścieliska
Guzy sieci jajnika
Guzy różne
Zmiany nowotworopodobne
Guzy pochodzenia limfoidalnego i hematopoetyczne
Guzy wtórne (przerzuty)

1.4 Surowiczy rak jajnika

Typ surowiczy jest najczęstszy w heterogennej grupie raków jajnika. Wyróżnia się dwa podtypy: wysokozróżnicowany (*Low Grade Serous Carcinoma- LGSOC*) i niskozróżnicowany (*High Grade Serous Carcinoma- HGSOC*). Uważa się, że LGSOC i HGSOC to różne nowotwory, o odmiennej biologii [134]. LGSOC zazwyczaj przechodzi przez stadium guza surowiczego granicznego (*Serous Borderline Tumor- SBT*), wykazuje mutacje K- RAS i B- RAF. Natomiast mutacje TP 53 i BRCA [211,212], której nie stwierdza się w LGSOC, typowo występują w HGSOC.

Dotychczasowe badania sugerują, że oba typy surowiczego raka mogą wywodzić się z komórek wewnątrznałonkowych jajowodu jak i jajnika [123].

1.4.1 LGSOC (*Low Grade Serous Ovarian Cacinoma*)

Wysokozróżnicowany rak surowiczy jest rzadkim nowotworem, stanowi mniej niż 5% raków jajnika [76]. W obrazie histopatologicznym przypomina surowiczego guza granicznego, wykazując torbielowaty i brodawkowaty typ wzrostu, bez lub z nieznacznie nasiloną martwicą. Utkanie LGSOC często występuje jako komponenta nieinwazyjnego surowiczego guza granicznego, co może świadczyć o progresji od SBT, przez mikroinwazję, do inwazyjnego LGSOC. Choroba zazwyczaj rozwija się w stosunkowo wolnym tempie [149].

Cechy mikroskopowe

W obrazie mikroskopowym LGSOC stwierdza się drobne brodawki komórek nowotworowych, z niewielkimi, jednolitymi jądrami (*grade 1*). Komórkom raka z reguły towarzyszy zręb z cechami zwyrodnienia szklanego, który często zawiera ciała piaszczakowate. Figury podziału są nieliczne. Jednorodność jąder jest naczelną cechą różnicującą LGSOC i HGSOC. Jeżeli w tkance raka stwierdza się komórki z jądrami o pośredniej wielkości, z wykładnikami mutacji genu *TP 53*, to wówczas należy rozpoznać HGSOC. LGSOC rzadko ulegają progresji do HGSOC [8].

Kryteria rozpoznania *psammocarcinoma* obejmują:

1. naciekanie zrębu jajnika, lub w przypadku wzrostu egzofitycznego – naciekanie jakiegokolwiek tkanki wewnątrztrzewnowej;
2. atypia jądrowa – od łagodnej do umiarkowanej;
3. gniazda nałonkowe zawierające < 15 komórek w największym wymiarze;
4. obecność ciałek piaszczakowatych w co najmniej 75% brodawek lub gniazd [149]

Rak piaszczakowaty (*psammocarcinoma*) jest szczególnie rzadką postacią LGSOC, której występowanie wiąże się z korzystniejszym rokowaniem [149]. Nowotwór ten ma przebieg kliniczny zbliżony do guzów granicznych i różni się od nich wyłącznie naciekaniami zrębu jajnika.

Immunohistochemia

Profil ekspresji biomarkerów, typowych dla LGSOC jest podobny jak w HGSOC. Cechą różnicującą jest ekspresja p53 (zwykle brak w przypadku LGSOC) oraz podwyższony indeks z Ki67, który jest istotnie niższy w przypadku LGSOC (mediana 2,5%) niż w HGSOC (mediana 22,4%) [116]. W 38% przypadków spotykana jest mutacja B-RAF, w 19%- K-RAS. [211]. LGSOC nie wykazuje chromosomalnej niestabilności i nie obserwuje się zespołów zaburzeń genetycznych, spotykanych w przypadku HGSOC. LGSOC nie jest też powiązany z mutacjami BRCA [149].

1.4.2 HGSOC (*High Grade Serous Ovarian Carcinoma*)

Niskoźróźnicowany surowiczy rak jest najczęstszym nowotworem złośliwym jajnika, stanowiąc 70% wszystkich przypadków [78]. Około 80% rozpoznań stawianych jest w stopniu znacznego zaawansowania choroby. W stadium, gdy nowotwór pozostaje ograniczony do jajnika, rozpoznaje się mniej niż 5% przypadków. Najważniejszym czynnikiem ryzyka jest rodzinne występowanie raka jajnika lub raka piersi, które stwierdza się u około 10-15% chorych [177].

Nowotwór może rozprzestrzeniać się lokalnie, przez naciekanie struktur wewnątrz otrzewnej, lub dawać przerzuty do układu limfatycznego: węzłów chłonnych miednicznych, okołoaortalnych, kręzkowych. Wodobrzusze może pojawić się w każdym stadium zaawansowania, zwykle jednak spotykane jest w stopniu III FIGO. Nowotwór przerzuca również do sieci większej. Poza-brzuszną lokalizację choroby dotyczy najczęściej jamy opłucnej. Do rozsiewu krwipochodnego dochodzi rzadko. Przerzuty występują wówczas w wątrobie, śledzionie, płucach [149].

Cechy mikroskopowe

HGSOC charakteryzuje się rozrostem komponentów brodawkowatych i li-tych, występowaniem gruczołów o szczelinowatym świetle oraz znaczną atypią jąder komórkowych. Brodawki są rozgałęzione nieregularnie, wykazują dużą gęstość komórkową. Zawartość zrębu jest skąpa. Komórki nowotworowe zazwyczaj są pośredniej wielkości. Stwierdza się też występowanie rozproszonych, jednojądrzastych, olbrzymich komórek, z promieniście ułożonymi jąderkami.

Cechą różnicującą HGSOE od LGSOC jest wykazywanie ponad 3- krotnej zmienności wielkości jąder. Cechy jądrowe są głównym kryterium różnicowania pomiędzy tymi nowotworami. W przypadkach o niejednoznacznym stopniu pleomorfizmu jądrowego można stosować kryterium aktywności mitotycznej – większa niż 12/ 10 HPF (*High Power Fields*) przemawia za rozpoznaniem HGSOE [134]. Wyraźnie widoczne są ogniska martwicy i krwawienie. Ciała piaszczakowate występują często, w zmiennej liczbie.

Formy LGSOC i HGSOE, rzadko, mogą współistnieć w obrębie jednego guza.

Immunohistochemia

HGSOE wykazuje cytoplazmatyczną ekspresję CK7, ale nie CK20. Często występuje pozytywne barwienie CD99. W większości HGSOE stwierdza się ekspresję p53, BRCA1, WT1 oraz p16. HGSOE cechuje się wysokim indeksem proliferacji (Ki67) [120]. Jądrowa reakcja WT1 występuje w około 80% guzów HGSOE i LGSOC, podczas gdy w rakach innego typu nie przekracza 5% przypadków [3]. Nowotwory wykazujące pozytywny odczyn WT1, częściej cechuje wysoki stopień zaawansowania, niskie zróżnicowanie, wysoki indeks proliferacji w porównaniu z guzami WT1 negatywnymi.

Podatność genetyczna

Kobiety z mutacją BRCA1 lub BRCA2 wykazują 30 – 70% ryzyko zachorowania na raka jajnika, głównie surowiczego, przed 70. rokiem życia [188]. Mutacje typu TP53 oraz inaktywacja BRCA wydają się być spójnym zaburzeniem genetycznym, typowym dla HGSOE. Poza mutacjami germinalnymi, inaktywacja szlaku BRCA może być wynikiem mutacji somatycznych w BRCA1 i BRCA2, oraz hipermetylacji promotora w genie BRCA1 [61].

1.5 Typy molekularne raka jajnika

Przyjęte w przeszłości teorie karcinogenezy zakładały, że rak jajnika powstaje z pojedynczej warstwy nabłonka pokrywającego jajnik (NPJ) i pod wpływem czynników mikrośrodowiska ulega dalszemu różnicowaniu w poszczególne typy histologiczne [159]. Mimo licznych wysiłków, nie udało się wskazać jednoznacznie na przyczynę, inicjującą karcinogenezę w NPJ. Z czasem zaobserwowano dużą różnorodność histologiczną i kliniczną choroby.

W 1999 r. Dubeau zasugerował, że rak jajnika nie wywodzi się z komórek NPJ, ale z komórek pochodzenia muellerowskiego. W życiu płodowym z przewodów Muellera wykształca się macica, szyjka macicy, jajowody i gonady, a NPJ wywodzi się z mezotelium [55].

W 2001 r. Narod zaobserwował, że pacjentki będące nosicielkami mutacji w genie BRCA1, u których dokonano podwiązania jajowodów, rzadziej chorowały na raka jajnika. Wkrótce pojawiły się sugestie, że pierwotnym ogniskiem surowiczego raka jajnika niskozróżnicowanego (HGSOC) może być jajowód [173]. Potwierdzenie tej teorii przyniosły retrospektywne badania morfologiczne usuniętych profilaktycznie jajowodów, w których stwierdzano obecność występującego wewnątrznałonkowo surowiczego raka jajowodu (*serous tubal intra-epithelial carcinoma*- STIC), przy jednoczesnej nieobecności zmian rakowych w obrębie NPJ. Współistnienie raka *in situ* jajowodu i raka jajnika lub otrzewnej potwierdzono u 71% chorych [65]. Jako źródło karcinogenezy dla pozostałych przypadków wskazano komórki strzępków jajowodów, które odłączają się od podścieliska i osadzają w bliskim sąsiedztwie – na powierzchni NPJ lub narządów jamy brzusznej.

W 2007 r. opublikowano wyniki badań, potwierdzających identyczny model karcinogenezy także dla raków sporadycznych, nie związanych z mutacją w genie BRCA [112].

W 2004 r., Kurman zaproponował nowy, molekularny podział raków jajnika. Wyodrębniono typ I i typ II [209].

Typ I: o łagodniejszym przebiegu, stanowi 25% zachorowań, rozwija się na bazie mutacji w genach KRAS, PTEN, BRAS, PAX8. Podobne mutacje wykrywane są w endometriozie i w guzach granicznych. Wskazuje to na ich wspólne pochodzenie. Rozwijają się wolniej, są wcześniej rozpoznawane i rzadziej dają przerzuty do jamy brzusznej [209]. Punktem wyjścia raka typu I są zazwyczaj tkanki inne niż jajnik. Dla raka surowiczego wysokozróżnicowanego zakłada się, że prawidłowe komórki strzępków jajowodu zostały zamknięte w uszkodzeniach nabłonka pokrywającego jajnik, powstających podczas jajeczkowania, i tam dochodzi do inicjacji karcinogenezy.

Typ II: rozwija się szybko, bez zmiany prekursorowej, wcześniej daje przerzuty, przebiega agresywnie, w chwili rozpoznania najczęściej rozsiany w jamie otrzewnej. Wykazano, że punktem wyjścia dla nisko-

zróżnicowanego raka surowiczego jest dystalna część jajowodu (strzępki) i/ lub nabłonek jajnika. Wspólną cechą molekularną raków typu II jest mutacja genu TP53 [209] (tabela 4).

Tabela 4. Porównanie cech kliniczno-patologiczno-molekularnych typów raka jajnika według Kurmana

Table 4. Comparison of the molecular types of ovarian cancer by Kurman

Typ I (25 % zachorowań)	Typ II (75% zachorowań)
Rak surowiczy low grade (LGSOC)	Rak surowiczy high grade (HGSOC)
Rak endometrialny G1 i G2	Rak endometrialny G3
Rak śluzowy	Rak niezróżnicowany
Rak jasnokomórkowy	Carcinosarcoma
Rak Brennera	
Mutacje KRAS, PTEN, BRAS, PAX 8	Mutacje TP53
Duża stabilność genetyczna	Genetyczna niestabilność
Rozpoznane w I i II st. FIGO	Rozpoznanie w III i IV st. FIGO
Wolny wzrost	Szybki wzrost
Mała wrażliwość na chemioterapię	Duża wrażliwość na chemioterapię
Rzadsze nawroty	Szybkie nawroty
Rokowanie dobre (80% przeżyć 5- letnich)	Rokowanie złe (10% przeżyć 5- letnich)

1.6 Diagnostyka raka jajnika

1.6.1 Badania przesiewowe

Nie ma udowodnionej, skutecznej metody skriningu raka jajnika. Chociaż przezpochwowe USG wykazuje się dużą czułością w wykrywaniu guzów jajników, jego pozytywna wartość predykcyjna (PPV) w rozpoznawaniu wczesnego raka jajnika jest niska [226, 227]. Rutynowe, wykonywane co 12 miesięcy USG przezpochwowe i oznaczanie CA 125, nie powodują zmniejszenia umieralności z powodu raka jajnika, dają znaczny odsetek wyników fałszywie dodatnich, zwłaszcza u kobiet przed menopauzą. Narażają na nieuzasadnione procedury chirurgiczne, nie są efektywne ekonomicznie [26].

Coroczne, rutynowe, dwuręczne badanie ginekologiczne jest nieskuteczne w wykrywaniu wczesnych postaci raka jajnika [191].

Używanie funkcji kolorowego Dopplera w trakcie badania USG TV, celem oceny unaczynienia podejrzanych zmian jajnikowych, jest użytecznym uzupełnieniem badania, ale nie okazało się przydatne w badaniach przesiewowych [222].

Nie udowodniono również, aby wykonywanie badań przesiewowych, opartych na corocznym oznaczaniu CA 125 i wykonywaniu USG przezpochwowego zmniejszało śmiertelność z powodu raka jajnika w grupie nosicielek mutacji BRCA1, BRCA2, MLH1, MLH2 [126].

1.6.2 Badania obrazowe w raku jajnika

W diagnostyce guzów jajnika główną rolę odgrywa badanie ultrasonograficzne. Służy ocenie charakteru zmian w przydatkach, pozwala oszacować prawdopodobieństwo wystąpienia nowotworu złośliwego.

Ocenie zaawansowania choroby, monitorowaniu skutków leczenia, wykrywaniu wznowy służą: tomografia komputerowa (TK), obrazowanie rezonansem magnetycznym (MRI), pozytonowa tomografia emisyjna (PET).

Najwyższą czułością w wykrywaniu zmian przerzutowych cechuje się badanie PET – CT. Przy prawidłowym stężeniu CA 125 jest w stanie wykryć wznowę raka jajnika dokładniej niż TK [195].

MRI stosuje się rzadko, w sytuacjach niejednoznacznych, głównie celem precyzyjnej oceny zaawansowania choroby w miednicy mniejszej.

1.6.2.1 Ultrasonografia przezpochwowa

Posiada wysoką czułość, jednak jej pozytywna wartość predykcyjna (PPV) jest stosunkowo niska [226]. Proponowane są różne kryteria oceny, sugerujące złośliwy charakter analizowanych zmian. Najprostszą metodą jest ocena objętości jajnika. Przed menopauzą objętość przekraczającą 20 cm³, a po menopauzie powyżej 10 cm³ uważa się za nieprawidłową [171].

W 1989 r. Granberg udowodnił, że rozpoznanie zmiany złośliwej jest mało prawdopodobne w przypadku występowania w obrazie USG TV jednokomorowej torbieli o gładkich ścianach, natomiast stwierdzenie litych struktur w jej świetle znacznie zwiększa ryzyko złośliwości zmiany [84].

Współcześnie funkcjonuje szereg systemów oceny morfologii zmian, stwierdzanych w USG. Opierają się one na unifikacji interpretacji objawów ultrasonograficznych, co ma pozwolić na skuteczniejsze szacowanie prawdopodobieństwa rozpoznania nowotworu złośliwego na podstawie obrazu. Systemy oceniające morfologię guzów jajników ciągle poddawane są korektom, by zmniejszyć częstość występowania wyników fałszywie dodatnich.

Badacze grupy *International Ovarian Tumor Analysis* (IOTA) opublikowali wyniki badania, które objęło największą jak do tej pory grupę kobiet, w ramach

którego dokonali analizy obrazów ultrasonograficznych guzów jajników, w diagnostyce różnicowej zmian łagodnych i złośliwych. Opracowali proste reguły oceny obrazów USG, umożliwiające zaklasyfikowanie guzów jako niezłośliwe (*B-rules, benign*) lub złośliwe (*M-rules, malignant*). Czulości swoistość metody opartej na tych regułach wynoszą odpowiednio 95% i 91% [218,219].

Kryteria rozpoznania zmian łagodnych (*Benign, B-rules*):

1. jednokomorowa zmiana cystyczna,
2. nieobecność litych komponentów, lub występowanie takich, gdzie największy wymiar nie przekracza 7 mm,
3. cień akustyczny,
4. równa powierzchnia wnętrza zmiany w przypadku zmian wielokomorowych mniejszych niż 100 mm,
5. nieobecność unaczynienia w badaniu dopplerowskim.

Za zmianą złośliwą przemawiają cechy „M” (*Malignant, M-rules*)

1. nieregularna zmiana lita,
2. obecność wodobrzusza,
3. minimum 4 struktury wewnątrz światła torbieli,
4. nieregularna torbiel wielokomorowa o wymiarze ≥ 100 mm,
5. silne unaczynienie potwierdzone badaniem dopplerowskim.

Zastosowanie kolorowego Dopplera w różnicowaniu zmian łagodnych od złośliwych zapoczątkowano w 1989 r., gdy stwierdzono zależność między niskopoporowym przepływem w naczyniach guza a rozpoznaniem zmiany złośliwej [18]. Jako nieprawidłowe dla naczyń stwierdzanych w guzach jajników, przyjmuje się wartości indeksu pulsacji $PI < 1,0$, indeksu oporu $RI < 0,5$. Włączenie parametrów przepływu krwi do oceny morfologii guzów jajników nie przyczyniło się do zwiększenia czułości w wykrywaniu złośliwości [221, 222].

1.6.3 Rola markerów – diagnostyka laboratoryjna

1.6.3.1 Antygen CA 125

Antygen CA 125 jest glikoproteiną. Ekspresja występuje w komórkach nabłonka, m.in. komórkach Mullera jajowodów, trzonu macicy, błony śluzowej kanału szyjki macicy, mezotelialnych komórkach opłucnej i otrzewnej [202].

CA 125 nie występuje w komórkach nabłonka prawidłowych jajników. Górna granica normy dla oznaczeń laboratoryjnych wynosi 35 IU/ml.

Jest najczęściej stosowanym biomarkerem, służącym rozpoznaniu i monitorowaniu raka jajnika. Podwyższenie stężenia powyżej 35 IU/ml obserwuje się u 50-90% chorych, w zależności od stopnia zaawansowania choroby [138].

Czułość, swoistość oraz pozytywna wartość predykcyjna są niewielkie, zwłaszcza w odniesieniu do wczesnych stopni zaawansowania choroby. Przed leczeniem operacyjnym stężenie CA 125 jest prawidłowe u 50% chorych w I stadium zaawansowania klinicznego. Pozwala na wykrycie około 60% przypadków raka jajnika w II stadium zaawansowania [225].

Na podwyższenie stężenia CA 125 wpływa wiele przyczyn; ginekologiczne: endometrioza, stany zapalne miednicy mniejszej, mięśniaki macicy, ciąża, ciąża pozamaciczna; nowotwory złośliwe innych narządów (piersi, płuc, przewodu pokarmowego), oraz wiele chorób ogólnych, takich jak zapalenie wątroby, zapalenie trzustki, marskość wątroby, niewydolność serca [49].

Dokładny związek między stężeniem CA 125 a przeżyciem całkowitym (OS) pozostaje niejasny [184]. Badania oceniające bezwzględne wartości CA 125 wskazują, że stężenia glikoproteiny po leczeniu chirurgicznym, po 2, 3, lub 6 cyklu chemioterapii, stanowią ważny czynnik predykcyjny całkowitego przeżycia [50], ale przedoperacyjne stężenia CA 125 mogą nie korelować z OS [135].

Badanie Chiang, opublikowane w 2014 r. wykazało, że stężenia CA 125, mierzone od momentu rozpoznania, do zakończenia chemioterapii I linii, mogą być wykorzystane w celu wiarygodnego przewidywania całkowitego przeżycia, po uwzględnieniu zaawansowania choroby wg FIGO i wielkości choroby resztkowej po pierwotnej operacji cytoredukcyjnej [33].

Czułość CA 125 w rozpoznawaniu raka jajnika określa się na 78-85,5%, a swoistość na 78,3-93% [13].

Zwiększone stężenie CA 125 obserwuje się w 80% raków surowiczych i około 30% raków jajnika endometrialnych, jasnokomórkowych, niskozróżnicowanych, śluzowych [199].

Oznaczanie CA 125 stosuje się w monitorowaniu skuteczności zastosowanej chemioterapii. O dobrej odpowiedzi na leczenie świadczy zmniejszenie stężenia po drugim cyklu chemioterapii pierwszego rzutu [170]. Utrzymywanie się podwyższonego poziomu CA 125 przed trzecim kursem przepowiada progresję raka [179]. Odpowiedź na leczenie sugeruje spadek stężenia CA 125 o co najmniej 50% w porównaniu ze stanem przed rozpoczęciem leczenia, które utrzymuje się przez co najmniej 28 dni [213].

Wzrost stężenia CA 125 w okresie remisji może o 3 – 7 miesięcy wyprzedzać wznowę kliniczną, lub widoczną w badaniach obrazowych, niezależnie od typu histologicznego, stopnia zaawansowania klinicznego, wielkości guza pierwotnego [98].

Zastosowanie chemioterapii II rzutu, jedynie na podstawie podwyższonego stężenia CA 125 u chorych po uzyskaniu całkowitej remisji jest niecelowe, ponieważ nie wydłuża OS [195, 196]. Kontrolne oznaczanie CA 125 w trakcie obserwacji po leczeniu powinno wykonywać się co 3 miesiące, przez 24 miesiące od zakończenia leczenia [194].

1.6.3.2 HE 4 – podfrakcja 4 ludzkiego białka komórek nabłonkowych najądrza

Ekspresja genu kodującego białko HE4 występuje w nabłonku najądrza, tchawicy, śliniankach, płuc, nerek, prostaty, jajowodów, śluzówki jamy ustnej, w endometrium, endocervix. Prawidłowe stężenie u zdrowych osób zależy od wieku, dla dorosłych wynosi ≤ 150 pM/l.

Stężenie HE 4 pozostaje prawidłowe w wielu chorobach, które powodują wzrost stężenia CA 125. Brak specyficzności CA 125, zwłaszcza u kobiet przed menopauzą, jest głównym ograniczeniem jego stosowania. Ponieważ HE4 nie ma tak silnej tendencji do wyników fałszywie dodatnich, jego oznaczenie jest pożytecznym uzupełnieniem stężenia CA 125.

W 2008 r. FDA zarejestrowała HE4 do monitorowania kobiet z rakiem jajnika w wywiadzie.

Marker służy wykrywaniu wczesnych stadiów choroby, monitorowaniu wznowy i progresji, głównie surowiczego raka jajnika [114].

Czułość HE4 we wczesnym zaawansowaniu nowotworu jest wyższa niż CA 125 (82,7% vs 45,9%), co wpływa na polepszenie wykrywalności wczesnych, a więc lepiej rokujących postaci raka jajnika i jajowodu [143].

Poziom HE4 może być podwyższony w przypadku raka endometrium, szyjki macicy oraz w łagodnych guzach jajnika [143].

1.6.3.3 Indeks ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm)

Metoda do oceny ryzyka występowania raka jajnika na podstawie skojarzonej oceny poziomu CA 125 oraz HE4, z uwzględnieniem wieku (statusu menopauzalnego) chorej.

W przypadku co najmniej 20% raków jajnika, które wykazują śladową lub zerową ekspresję CA 125, zastosowanie pojedynczego markera nie jest wystarczające. Ponadto wykazano, że HE4 jest podwyższone w ponad 50% nowotworów, które nie mają ekspresji CA 125. Kombinacja wyników CA 125 i HE4 pozwala na wykrycie wczesnych nowotworów, które mogą zostać pominięte przez algorytmy, oparte jedynie na oznaczaniu CA 125 [144].

Czułość metody wynosi 92% a swoistość 75% i 76% odpowiednio dla kobiet przed i po menopauzie [145].

1.6.4 Metoda diagnostyczna skojarzona – wskaźnik RMI (Risk Of Malignancy Index)

Po raz pierwszy RMI został przedstawiony przez Jacobsa w 1990 roku [101]. Od tamtej pory podlegał modyfikacjom, w których wyniku określono RMI II, RMI III i RMI IV. W przypadku podejrzenia raka jajnika, najskuteczniejszą metodą diagnostyczną był system RMI I [74, 75]. Wartość RMI należy oznaczać w procesie diagnostyki i podejmowania decyzji dotyczących wszystkich pacjentek, u których podejrzewa się złośliwy nowotwór jajnika [152]. O RMI decydują 3 parametry: stężenie CA125 w surowicy (j./ml), status menopauzalny pacjentki (M) i wskaźnik ultrasonograficzny (U). Wartość RMI stanowi wynik z równania, który je uwzględnia:

$$RMI = U \times M \times CA125.$$

Wskaźnik ultrasonograficzny „U” – oblicza się, sumując punkty za cechy (1 punkt za każdą): torbiel wielokomorowa, pola lite w obrębie zmiany, obecność przerzutów, wodobrzusze, obecność zmian w obu jajnikach.

Parametr U może przyjmować wartości: U=0 (liczba punktów – 0), U=1 (liczba punktów – 1) lub U=3 (liczba punktów – 2-5).

Status menopauzalny „M” – ocenia się: 1 punkt – kobieta przed menopauzą, 3 punkty – kobieta po menopauzie. Za pacjentki po menopauzie uznaje się te, które nie miały miesiączki od ponad roku, oraz kobiety po 50. roku życia, poddane histerektomii.

Stężenie CA 125 – wyrażane w jednostkach na mililitr, a jego wartość może wahać się od 0 do setek, a często tysięcy j.m.

Opublikowany w 2009 r. przegląd systematyczny wykazał, że RMI I i RMI II są najlepszymi predyktorami w przedoperacyjnej ocenie guzów jajników. Dla wartości $RMI \geq 200$ (punkt odcięcia), czułość i swoistość metody w diagnostyce nowotworów jajnika wynoszą odpowiednio 78% i 87% [74, 75].

Jest to obecnie metoda rekomendowana przez Polskie Towarzystwo Ginekologii Onkologicznej.

1.7 Leczenie raka jajnika

1.7.1 Leczenie chirurgiczne raka jajnika

1.7.1.1 Leczenie chirurgiczne a staging chirurgiczny

Najważniejszym czynnikiem wpływającym na całkowity czas przeżycia pacjentów jest skuteczność leczenia operacyjnego, którą mierzy się wielkością pozostawionej choroby resztkowej.

Naczelną zasadą leczenia chirurgicznego jest cytoredukcja, czyli usunięcie wszystkich widzialnych zmian nowotworowych. Jeżeli nowotwór makroskopowo nie przekracza narządu rodneho, całkowite usunięcie macicy wraz z przydatkami należy rozszerzyć o staging chirurgiczny, czyli pobranie materiału do oceny histopatologicznej z obszarów, uznanych za potencjalne miejsca przerzutowania raka jajnika. Prawidłowo przeprowadzony staging wpływa na interpretację wyników leczenia chorych na ten nowotwór [10].

Niedokładnie przeprowadzony staging chirurgiczny (w przypadkach zmian makroskopowo ograniczonych wyłącznie do jajników) bardzo często przyczyniał się do zakwalifikowania chorej do stadium I choroby, podczas gdy faktycznie powinna znaleźć się ona w wyższym stopniu jej zaawansowania. W efekcie prawdopodobieństwo przeżycia 5 lat w tej grupie było mocno zaniżone i wynosiło tylko 60%.

Wykonywanie stagingu chirurgicznego u wszystkich chorych z zaawansowaniem choroby, ograniczonym do narządu rodneho, eliminuje niedoszacowane przypadki, zniekształcające wyniki leczenia raka jajnika. W rzeczywistości 5-letnie przeżycie chorych prawidłowo zakwalifikowanych do stadium IA lub IB wynosi 90 – 100% chorych [245].

1.7.1.2 Zasady stagingu chirurgicznego

Prawidłowy staging chirurgiczny służy do oceny stopnia zaawansowania choroby według FIGO. Należy podkreślić, że występowanie makroskopowych zmian nowotworowych, przekraczających 2 cm w jamie brzusznej i nadbrzuszu, od razu kwalifikuje chorobę do stopnia IIIC (lub wyższego) i pobieranie w takich przypadkach wycinków z otrzewnej czy badanie płynu jest bezzasadne.

Zatem reguły stagingu dotyczą przypadków z rakiem jajnika, makroskopowo ograniczonym wyłącznie do narządu rodniego [153] i obejmują one:

1. Pobranie wolnego płynu z jamy brzusznej lub miednicy do badania cytologicznego, oraz pobranie popłuczyn po użyciu co najmniej 50-100 ml soli fizjologicznej,
2. Systematyczną ocenę makroskopową i palpacyjną wszystkich powierzchni wewnątrzbrzusznych, trzewi, narządów przestrzeni zaotrzewnowej,
3. Wszystkie podejrzane obszary i zrosty w obrębie otrzewnej powinny zostać poddane biopsji. Jeżeli nie obserwuje się takich, wycinki należy pobrać z losowo wybranych miejsc otrzewnej prawej i lewej strony ściany miednicy mniejszej, zatoki Douglasa, pęcherza moczowego, oraz spływów przyokrężniczych.
4. Należy pobrać wycinki z otrzewnej kopuły przepony, a jeśli to niemożliwe, można pobrać wymaz cytologiczny.
5. Sieć większa może być wycięta podpoprzecznico, choć obecnie zaleca się resekcję radykalną, obejmującą więzadła żołądkowo-poprzecznice i żołądkowo-śledzionowe.
6. Należy uzyskać dostęp do przestrzeni zaotrzewnowej i usunąć wszystkie węzły chłonne miedniczne i okołoaortalne do wysokości lewych naczyń nerkowych. Węzły chłonne okołoaortalne, szczególnie powyżej tętnicy kręzkowej dolnej, są zajęte częściej niż węzły chłonne miedniczne [89].
7. W przypadku śluzowego raka jajnika *staging* należy rozszerzyć o usunięcie wyrostka robaczkowego [7].

1.7.1.3 Primary Debulking Surgery (PDS). Pierwotny zabieg chirurgiczny u pacjentek z zaawansowanym rakiem jajnika

Zaawansowanym rakiem jajnika określamy każdy przypadek choroby, w którym nacieki nowotworowe przekraczają narząd rodny.

Jeśli chora pozostaje w stabilnym stanie ogólnym, powinna przejść procedurę, obejmującą wycięcie możliwie największej masy nowotworowej. Wycięcie guza pierwotnego i zmian przerzutowych nazywa się operacją cytoredukcyjną [231]. Zabieg, poza całkowitym wycięciem macicy z przydatkami, powinien obejmować usunięcie sieci większej i wszystkich zmian przerzutowych, zlokalizowanych zarówno w miednicy, jak i w jamie brzusznej.

Chore w III i IV stopniu zaawansowania, po cytoredukcji do $R \leq 1$ *microscopic*, żyją od 60 do 100 miesięcy, chore u których pozostawiono zmiany widzialne poniżej 1 cm ($R \leq 1$ cm *macroscopic*) żyją 30 – 40 miesięcy podczas gdy czas przeżycia kobiety z $R > 1$ cm nie przekracza 30 miesięcy [2, 32, 118, 197].

Podstawowe zasady leczenia operacyjnego zostały usystematyzowane przez Bristowa i wsp. w 2002 r., na podstawie metaanalizy 6885 chorych z rakiem jajnika w III i IV stopniu zaawansowania FIGO, i upowszechniły się w kluczowych ośrodkach amerykańskich oraz europejskich. Przedstawia je tabela 5 [22].

Tabela 5. Rekomendacje Changa i Bristowa dla szerokiej resekcji w pierwotnej operacji cytoredukcyjnej w raku jajnika

(celem leczenia jest osiągnięcie choroby resztkowej $R \leq 1$ cm)

Table 5. Recommendations by Chang and Bristow for the extent of resection for primary cytoreductive surgery (the aim is to go from bulky disease to disease ≤ 1 cm)

Wielkość zmian przed cytoredukcji	Typ chirurgii	Możliwa do osiągnięcia wielkość choroba resztkowej
≤ 1 cm	Radykalna	Mikroskopowa
	Prosta	
	Radykalna (nie)	$R \leq 1$ cm
	Prosta (?)	
>1 cm	Radykalna (tak)	Mikroskopowa
	Prosta (tak)	
	Radykalna (?)	$R \leq 1$ cm
	Prosta (tak)	
	Radykalna (nie)	$R > 1$ cm
	Prosta (nie)	

Według Bristowa i wsp. „chirurgia prosta” obejmuje: usunięcie macicy z przydatkami, wycięcie sieci większej, selektywne usunięcie węzłów chłonnych miednicy mniejszej i okołoaortalnych, wycięcie otrzewnej, pojedyncze resekcje odcinkowe jelit.

Pojęcie „chirurgii radykalnej” obejmuje: radykalną ooforektomię; resekcje esiczo-odbytnicze z odtworzeniem ciągłości jelita grubego; mnogie, odcinkowe resekcje jelitowe; wycięcie otrzewnej kopuły przepony; resekcję wątroby; chirurgię wnęki wątroby; splenektomię; dystalną pankreatektomię; resekcje żołądka; rozległą limfadenktomię zaotrzewnową; chirurgię wewnątrz klatki piersiowej.

W wielu badaniach wykazano, że radykalne procedury cytoredukcyjne są wysoce efektywne w osiąganiu optymalnej cytoredukcji, istotnie wpływają na wydłużanie czasu przeżycia. Ilość powikłań i ryzyko śmierci okołoperacyjnej są akceptowalne w porównaniu z zyskiem, jakim jest osiągnięcie cytoredukcji optymalnej [30].

Zaawansowane klinicznie nowotwory jajnika często naciekają otrzewną miednicy mniejszej oraz odbytnicę i esicę, doprowadzając do niedrożności. Wielu badaczy uznaje, że przeprowadzenie radykalnej resekcji w obrębie miednicy-radykalna ooforektomia, blokowa kolektomia rektosigmoidalna lub zmodyfikowana egzenteracja tylna miednicy – umożliwia całkowite usunięcie choroby z miednicy, przy stosunkowo niewielkich powikłaniach [220].

1.7.1.4 Cele cytoredukcji

Podstawowym celem operacji cytoredukcyjnej jest usunięcie w całości pierwotnego nowotworu i wszystkich ognisk przerzutowych. Jeżeli wycięcie przerzutów nie jest możliwe, celem pozostaje zmniejszenie masy nowotworu, poprzez usunięcie jego pojedynczych ognisk, aż do osiągnięcia stanu „optymalnego”.

The Gynecologic Oncology Group (GOG) jako „optymalny” definiuje zabieg, efektem którego jest pozostawienie pierwotnej masy guza w postaci guzków, każdy o maksymalnej średnicy ≤ 1 cm [240].

Cytoredukcja do zmiany < 1 mm lub makroskopowo niewidocznej (R=0 *microscopic*) wiąże się z większą liczbą odpowiedzi na chemioterapię, mniejszą opornością na platynę i wydłużeniem czasu przeżycia chorych. Pozytywna korelacja, statystycznie istotna ($p < 0,001$) pomiędzy wykonaniem optymalnej cytoredukcji a czasem przeżycia została potwierdzona w badaniach [140].

W latach 90. XX w. przedstawiono zależność, za kryterium operacji „optymalnej” uznając pozostawienie choroby resztkowej ≤ 5 mm. Mediana przeżyć dla tych chorych wynosiła 40 miesięcy, w porównaniu do 18 miesięcy dla kobiet z R 5-15 mm i 6 miesięcy dla chorych z ogniskami > 15 mm. Chore, które prze-

były „optymalną” resekcję pierwotnego nowotworu, mają najlepsze rokowanie i prawie 60% z nich będzie wolne od choroby po upływie 5 lat [94].

Szacuje się, że redukcja masy guza o każde 10% koreluje z wydłużeniem mediany przeżyć całkowitych o 5,5% [22].

Możliwość przeprowadzenia operacji całkowitego usunięcia zmian przerzutowych jest uzależniona od doświadczenia zespołu operującego. W przypadku znacznego rozsiewu choroby na powierzchni otrzewnej kopuły przepony, przerzutów w obrębie miększu lub we wnęce wątroby, wzdłuż korzenia krezki jelita cienkiego, w sieci mniejszej, przeprowadzenie cytoredukcji optymalnej jest znacznie utrudnione [44].

1.7.1.5 Pierwotny zabieg chirurgiczny we wczesnym stadium raka jajnika a możliwość zachowania płodności

W przypadku wysokozróżnicowanego raka jajnika we wczesnym stadium zaawansowania, u pacjentek pragnących zachować płodność, dopuszczalne jest wycięcie przydatków z guzem oraz kontrola histopatologiczna jajnika po drugiej stronie [77].

Wymagana jest pełna ocena stopnia zaawansowania choroby (płukanie otrzewnej, biopsje otrzewnej, wyłyżeczkowanie macicy, wycięcie sieci większej, selektywne wycięcie węzłów chłonnych).

W przypadku raka G1 w stadium zaawansowania IA, biopsja drugiego jajnika nie jest wymagana [41].

W badaniu Parka, 59 kobiet przeszło leczenie oszczędzające płodność w stadium zaawansowania IA – IC. U kobiet z nowotworem o dojrzałości G1 lub G2 nie stwierdzono wznów. W przypadku G3 lub bardziej zaawansowanej klinicznie choroby, wznowy występowały częściej, odnotowano też krótsze czasy przeżycia chorych [167].

Kobiety po leczeniu oszczędzającym należy regularnie monitorować przez oznaczanie poziomu CA 125 i wykonywanie przezpochwowego USG. Po zakończeniu rozrodu powinny być poddane uzupełniającemu zabiegowi chirurgicznemu.

Stopień zróżnicowania histologicznego (G) jest niezależnym czynnikiem predykcyjnym występowania ukrytych przerzutów. W przypadku G1 ryzyko wynosi 16%, 34% dla G2 i 44% dla G3 [245].

Operację oszczędzającą płodność można rozważać w przypadku kobiet przed 40. rokiem życia, w stadium zaawansowania choroby IA G1 (i ewentualnie G2), u chorych z typem surowiczym, śluzowym lub endometrialnym [146].

Warunki, jakie muszą zostać spełnione, aby chorą poddać operacji oszczędzającą płodność, zostały określone przez Europejskie Towarzystwo Ginekologii Onkologicznej (ESGO) w 2011 r. i obejmują [146]:

1. stadium zaawansowania klinicznego FIGO I,
2. wiek < 40 roku życia,
3. pouczenie chorej o możliwych skutkach onkologicznych operacji oszczędzającej,
4. deklaracja chorej o pozostaniu w kontroli po leczeniu
5. typ histologiczny raka: surowiczy, śluzowy, endometrialny, o dojrzałości G1 lub G2.

1.7.1.6 Interval debulking surgery /IDS/. Cytoredukcja odroczone

Jest to operacja cytoredukcyjna, którą przeprowadza się zwykle po 3 cyklach chemioterapii systemowej (chemioterapia neoadjuwantowa poprawia resekcyjność zabiegu.). Kwalifikuje się do niej chorych, u których uznano, że zaawansowanie choroby uniemożliwi przeprowadzenie optymalnej cytoredukcji pierwotnej. Porównanie wyników leczenia pacjentek z PDS i IDS (5 – letnie przeżycie) nie wykazało istotnych różnic statystycznych [16].

1.7.1.7 Leczenie chirurgiczne nawrotowego raka jajnika

U większości pacjentek po PDS i IDS, dochodzi do wznowy choroby. Operacyjne leczenie nawrotu raka jajnika ma z założenia charakter paliatywny, którego celem jest przedłużenie i poprawa jakości życia chorej.

Tym większą korzyść z ponownej cytoredukcji odnoszą chore, im dłuższy czas upłynął od zakończenia chemioterapii do wznowy, oraz jeżeli wznowa występuje lokalnie [198].

Do czynników pozwalających na zakwalifikowanie chorych do zabiegu wtórnej cytoredukcji po leczeniu pierwotnym należą:

1. czas bez progresji choroby co najmniej 6 miesięcy od zakończenia chemioterapii,
2. miejscowy charakter wznowy (potwierdzony w badaniach obrazowych),
3. nie występuje *peritonitis carcinomatosa* i/lub znacznego stopnia wodobrzusze,
4. dobry stan ogólny.

1.7.1.8 Chirurgia profilaktyczna w raku jajnika

Mutacje w genach supresorowych BRCA1 i BRCA2 zwiększają ryzyko zachorowania na raka piersi, jajnika, jajowodu i otrzewnej u ich nosicielek, odpowiadając za 20-30% przypadków występowania rodzinnych zespołów raka piersi i raka jajnika (HBOC- *hereditary breast ovarian cancer*) oraz raka jajnika (HOC – *hereditary ovarian cancer*). W populacji polskiej mutacje w obrębie BRCA1 występują częściej. Mutacje BRCA 2 – rzadko [81].

Około 5 – 15% przypadków raka jajnika oraz 6 – 7% raka piersi zależy od nosicielstwa mutacji BRCA1/ BRCA2. Nosicielki mutacji BRCA1 są obarczone wyższym ryzykiem wystąpienia raka jajnika (około 40%), niż w przypadku BRCA2 (18%). Ryzyko rozwoju raka piersi dla nosicielek BRCA1 wynosi 57%, a w przypadku BRCA 2 – 49% [31].

U nosicielek mutacji BRCA1/ BRCA2 w 97% występują niskozróżnicowane typy histologiczne nowotworów: HGSOV i atypowy, rdzeniasty, najczęściej potrójnie ujemny rak piersi /*Triple Negative Breast Cancer* – TNBC. Raki jajnika w tej grupie chorych rozpoznawane są najczęściej w III/ IV stadium zaawansowania FIGO, zwykle po 40. roku życia [92].

Czas przeżycia u chorych na raka jajnika wśród nosicielek mutacji BRCA1/ BRCA2, niezależnie od wieku chorej oraz stopnia zaawansowania klinicznego, jest dłuższy niż w przypadku zachorowania sporadycznego (53,4 miesiąca vs 37,8 miesiąca) [14].

Według zaleceń Amerykańskiego Kolegium Położników i Ginekologów (ACOG), skrining genetyczny u osób z mutacjami rodzinnymi należy zacząć wykonywać przed ukończeniem 25. roku życia [5]. W Polsce badania genetyczne wykonuje się u osób powyżej 18. roku życia [82].

Istnieje wiele metod postępowania prewencyjnego, wśród których najskuteczniejszą jest profilaktyczne postępowanie chirurgiczne [181].

Profilaktyczne wycięcie jajowodów i jajników redukuje ryzyko rozwoju raka jajnika i jajowodu o 71-96%, oraz raka piersi o 45-56% u nosicieli BRCA1 i o 46 – 72% u nosicieli mutacji BRCA2 [115]. Redukcja ryzyka zachorowania na nowotwór złośliwy nie jest całkowita z uwagi na możliwość rozwinięcia się pierwotnego raka otrzewnej.

Profilaktyczną adnektomię u nosicielek mutacji BRCA1/ BRCA2 zaleca się wykonać w wieku 35 lat – u kobiet, które nie planują zajścia w ciążę, lub w wieku 40 lat.

U nosicielek mutacji BRCA2 bez występowania raka jajnika w rodzinie, wykonanie zabiegu zaleca się w wieku 50 lat.

Zastosowanie hormonalnej terapii zastępczej (HTZ) u kobiet po profilaktycznym wycięciu przydatków nie zwiększa ryzyka rozwoju raka piersi i nie jest przeciwwskazane [180]. Nie zaleca się natomiast stosowania HTZ u nosicielek mutacji BRCA1 z rakiem piersi w wywiadzie [189].

1.7.2 Chemioterapia w raku jajnika

Chemioterapia nowotworów złośliwych przeprowadzana jest z użyciem cytostatyków, które można stosować jako:

1. leczenie adiuwantowe – uzupełniające po leczeniu operacyjnym, które ma wydłużyć życie lub czas przeżycia wolny od nowotworu,
2. leczenie neoadiuwantowe – wdrożenie chemioterapii przed leczeniem operacyjnym, w celu zmniejszenia guza pierwotnego,
3. leczenie paliatywne – ograniczanie negatywnych skutków obecności choroby nowotworowej, wpływających na jakość życia chorego.

Leki cytostatyczne podaje się systemowo – dożylnie, lub regionalnie – do naczyń, zaopatrujących guz nowotworowy, dokanałowo, do jam ciała.

Chemioterapia, obok chirurgii, odgrywa podstawową rolę w leczeniu raka jajnika (razem tworząc tzw. *Frontline Treatment*). Aktualnie schemat leczenia opiera się na stosowaniu platyny i paklitakselu, co pozwala na uzyskanie odpowiedzi na leczenie I rzutu w około 70% przypadków.

W 2011 r. do leczenia I rzutu (w skojarzeniu z taksanami i pochodnymi platyny) i jako leczenie podtrzymujące, zarejestrowano bewacyzumab (patrz Rozdział 1.7.3 – Terapie antyangiogenne).

1.7.2.1 Chemioterapia dożylna /IV/

W 2004 r. ustalono złoty standard chemioterapii I-rzutu dla pacjentek z rakiem jajnika. Jest nim 6 cykli paklitakselu w dawce 175 mg/ m² powierzchni ciała w 3 – godzinny wlewie podawanego równolegle z karboplatiną w dawce ustalonej według wzoru Calverta [216].

1.7.2.2 Chemioterapia dootrzewnowa /IP/

W badaniu GOG 172, opublikowanym w 2006 r., udokumentowano wydłużenie czasu wolnego do progresji oraz całkowitego przeżycia u chorych na raka jajnika, poddanych chemioterapii dootrzewnowej, w porównaniu z chorymi, które leczono dożylnie. Badanie objęło chore w III stadium zaawansowania FIGO, z wielkością resztek po leczeniu operacyjnym ≤ 1 cm.

W ramieniu kontrolnym pacjentki otrzymywały dożylnie: paklitaksel ($135 \text{ mg/ m}^2 \text{ p.c.}$) we wlewie przez 24 godziny, oraz cisplatynę w dawce $75 \text{ mg/ m}^2 \text{ p.c.}$ w 2. dobie. Schemat powtarzano co 21 dni. W ramieniu eksperymentalnym chore otrzymywały paklitaksel w tej samej dawce i czasie co w ramieniu kontrolnym w 1. dobie, oraz cisplatynę dootrzewnowo w dawce $100 \text{ mg/ m}^2 \text{ p.c.}$ w 2. dobie. W dobie 8. podano pacjentkom paklitaksel dootrzewnowo w dawce $60 \text{ mg/ m}^2 \text{ p.c.}$ (nie więcej niż 100 mg). Planowo chore miały otrzymać po 6 kursów chemioterapii, co 21 dni [6]. Wyniki leczenia wskazały na znaczne korzyści ze stosowanej chemioterapii dootrzewnowej.

W grupie poddanej tej metodzie leczenia uzyskano istotnie lepsze wyniki leczenia: czas wolny od progresji (23,8 miesiąca vs 18,3 miesiąca dla grupy leczonej drogą dożylną) i czas całkowitego przeżycia o 15,9 miesiąca (odpowiednio 65,6 miesiąca vs 49,7 miesiąca) [6].

Od tamtej pory opublikowano szereg badań, wykazujących wyższą skuteczność chemioterapii dootrzewnowej nad dożylną [127], która pomimo tych doniesień jest nadal rzadziej stosowana [230], być może ze względu na fakt, że chemioterapia dootrzewnowa cechuje się powikłaniami, które utrudniają zrealizowanie wszystkich cykli leczenia, oraz pogorszeniem jakości życia chorych w stosunku do leczonych dożylnie. Częściej występują w tej grupie bóle brzucha, objawy ze strony układu krwiotwórczego, przewodu pokarmowego, objawy neurologiczne [6].

Według wielu badaczy, toksyczność metody jest głównym problemem, nie dającym podstaw do uznania chemioterapii dootrzewnowej za leczenie z wyboru [230]. Prowadzone są badania, oceniające stosowanie dootrzewnowe karboplatyny (GOG 252), oraz dootrzewnowe podanie karboplatyny lub cisplatyny z paklitakselem, po zastosowaniu chemioterapii neoadiuwantowej i cytoredukcji odroczonej (PETROC/ OV21).

1.7.2.3 Chemioterapia neoadiuwantowa

Według niektórych badaczy, część pacjentek z zaawansowaną chorobą nowotworową, powinna być leczona chemioterapią przed wykonaniem operacji cytoredukcyjnej. Według Schwarza, chore leczone chemioterapią neoadiuwantową uzyskiwały przeżycia porównywalne do grupy, leczonej pierwotnie cytoredukcją [204], co potwierdzono także w późniejszych badaniach.

Zastosowanie chemioterapii neoadiuwantowej może być odpowiednim postępowaniem w przypadku chorych z zaawansowanym rakiem jajnika, obarczonych wysokim ryzykiem zgonu lub powikłań okołoperacyjnych (u chorych z obciążeniami kardiologicznymi, pulmonologicznymi). Standardem pozostaje jednak wykonanie pierwotnej cytoredukcji [208].

Chemioterapia neoadiuwantowa stanowi alternatywną metodę dla ograniczonej grupy pacjentek, u których optymalna cytoredukcja jest niemożliwa do uzyskania przez doświadczony zespół ginekologów onkologicznych [21]. Podanie chorych w stadium III/ IV raka jajnika chemioterapii neoadiuwantowej wiąże się z uzyskaniem mniejszej śmiertelności okołoperacyjnej [232].

1.7.2.4 Chemioterapia o dużej gęstości dawki

Chemioterapia o dużej gęstości dawki to schemat, obejmujący cotygodniowe podawanie paklitakselu w dawce 80 mg/ m² powierzchni ciała w 1, 8, 15 dniu cyklu oraz podanie karboplatyny w dawce 6,0 AUC w 1. dniu cyklu. Leczenie obejmuje 6 cykli. W badaniu, dotyczącym chorych w II – IV stadium zaawansowania choroby, niezależnie od efektu pierwotnego zabiegu cytoredukcyjnego, uzyskano wydłużenie czasu do wystąpienia progresji w porównaniu do standardowego schematu chemioterapii, osiągając zysk 10,8 miesięcy (28 vs 17,2 miesiąca). 28 miesięcy to najdłuższy PFS, uzyskany do tej pory w badaniach klinicznych [108].

Było to badanie japońskie, którego wyniki nie znalazły potwierdzenia w badaniu dotyczącym rasy białej (MITO – 7) [174], co sugeruje pewną etniczną podatność na paklitaksel, podawany cotygodniowo [119, 160]. Obecnie trwające badanie ICON 8 ma wyjaśnić powyższe zależności.

1.7.2.5 Chemioterapia w nawrotowym raku jajnika

U 55 – 75% chorych, po leczeniu operacyjnym i chemioterapii z powodu raka jajnika, dochodzi do wznowy choroby w ciągu 2 lat od zakończenia leczenia. Częstość jej wystąpienia uzależniona jest m. in. od pierwotnego zaawanso-

wania choroby i w stopniu FIGO I wynosi 10%, FIGO II około 30%, natomiast w III i IV stopniu występuje u 85% chorych [139]. Bez progresji choroby w ciągu 10 lat udaje się przeżyć 18% pacjentek [54]. Za sprawą postępującego poziomu chirurgii i chemioterapii, rak jajnika staje się chorobą przewlekłą, z powtarzającymi się nawrotami i okresami wolnymi od objawów, które po kolejnych cyklach leczenia stają się coraz krótsze, aż do momentu nieuzyskania odpowiedzi na cytostatyki. Wznowa jest chorobą nieuleczalną.

Wykazano istnienie zależności między czasem od zakończenia leczenia I rzutu do momentu stwierdzenia wznowy, a odpowiedzią na leczenie II rzutu. Stanowi to podstawę podziału chorych na grupy, przedstawione w tabeli 6 [137].

Tabela 6. Podział chorych ze względu na czas wystąpienia progresji od zakończenia chemioterapii I rzutu

Table 6. Patients distribution based on the time of disease progression after the end of I- line chemotherapy

Czas wystąpienia progresji	%	Nazwa grupy
W czasie chemioterapii	5,3	Niewrażliwe na platynę
6 mies.	17,2	Oporne na platynę
6 – 12 mies.	22,7	Częściowo wrażliwe
12 – 60 mies.	33,5	Wrażliwe na platynę
60 – 120 mies.	3,7	Wrażliwe na platynę
Bez wznowy po 120 mies.	17,7	Wyleczone?

W przypadku wznowy raka jajnika, należy rozważyć możliwość przeprowadzenia wtórnej operacji cytoredukcyjnej, szczególnie u chorych, pozostających w dobrym stanie ogólnym, wrażliwych na pochodne platyny, ze wznową po długim czasie od zakończonego leczenia, z izolowaną zmianą, wstępnie ocenianą jako resekcyjna.

Stopień odpowiedzi na chemioterapię w drugim i kolejnych rzutach choroby zależy od: typu histologicznego raka, dojrzałości histologicznej (G), stopnia zaawansowania klinicznego, czasu, jaki upłynął od zakończenia leczenia pochodnymi platyny do wznowy choroby [136].

Po zakończonym leczeniu I rzutu, chore poddaje się monitoringowi, polegającemu na okresowym oznaczaniu poziomu CA 125, badaniu fizykalnym, ginekologicznym, RTG klatki piersiowej oraz TK lub MRI jamy brzusznej [182].

Wznowa raka jajnika to pojawienie się objawów klinicznych choroby po okresie remisji, obecność zmian w wynikach badań obrazowych. Izolowane

podwyższenie poziomu CA 125 w surowicy może wyprzedzać kliniczne objawy choroby średnio o 4,8 miesiąca.

Włączenie leczenia cytostatykami na podstawie izolowanego podwyższenia poziomu CA125 nie wpływa na wydłużenie czasu przeżycia, dlatego decyzja o zastosowaniu chemioterapii powinna być podejmowana po pojawieniu się klinicznych objawów wznowy [193].

1.7.2.6 Problem oporności na platynę

Pacjentki niewrażliwe i odporne na platynę stanowią 22,5% populacji leczonej schematem PC w I rzucie. Są to chore, wobec których rokowanie jest złe [137].

W grupie tej stosuje się leki o innym niż paklitaksel i pochodne platyny mechanizmie działania, zależnie od profilu toksyczności, tolerancji leczenia i ogólnego stanu chorej. Postępowaniem z wyboru jest monoterapia.

Do leków stosowanych zalicza się: pegylowana liposomalna doksorubicyna, topotekan, gemcytabina.

Doksorubicyna liposomalna stosowana jest w dawce 50 mg/ m² p.c. w 1 – godzinnym wlewie co 28 dni. Nie odnotowano istotnych różnic w czasie wolnym od progresji oraz przeżyciach 5 – letnich w porównaniu z innymi cytostatykami stosowanymi w monoterapii tj. topotekaniem i gemcytabiną. Doksorubicyna cechuje się jednak większą wygodą stosowania oraz korzystniejszym profilem działań niepożądanych. Gemcytabina, zazwyczaj tolerowana lepiej niż topotekan, jest alternatywą dla doksorubicyny [80, 148].

1.7.2.7 Chore częściowo wrażliwe i wrażliwe na pochodne platyny

Obecny stan wiedzy nakazuje, by u chorych, u których dochodzi do wznowy raka jajnika w okresie 6 – 12 miesięcy oraz powyżej 12 miesięcy po zakończeniu leczenia pierwszego rzutu, ponownie stosować typową terapię dla nowotworów wrażliwych na pochodne platyny [182].

Wykazano większą skuteczność stosowania pochodnych platyny w skojarzeniu z paklitakselem, w porównaniu z leczeniem pochodnymi platyny w monoterapii u chorych ze wznową po 6 i po 12 miesiącach od zakończenia leczenia. Stwierdzono istotnie dłuższy czas wolny od progresji oraz istotnie dłuższy czas przeżycia [169].

Schemat oparty na karboplatynie i doksorubicynie liposomalnej, zastosowany u chorych platynowrażliwych i częściowowrażliwych, pozwala uzyskać dłuż-

szy PFS w porównaniu do karboplatyny z paklitakselem. Wykazano też korzystniejszy profil toksyczności leczenia [178].

Obiecujące wyniki zaobserwowano w badaniu III fazy, oceniającym stosowanie bewacyzumabu w połączeniu z karboplatyną i gemcytabiną (wydłużenie PFS) w tej grupie chorych [1]. Ocena wpływu na przeżycia całkowite wymaga dalszej obserwacji.

1.7.3 Terapia antyangienna

1.7.3.1 Angiogeneza w raku jajnika

Patologiczne unaczynienie guza nowotworowego stanowią naczynia o nieprawidłowej budowie. Siatce naczyń brakuje hierarchizacji, typowej dla prawidłowego unaczynienia tkanek [102].

Komórki nowotworowe mają zdolność produkowania substancji aktywnych, stymulujących angiogenezę i wzrost nowotworu. [87]

W 1983 r. wyselekcjonowano białko VEGF (czynn timer wzrostu śródbłnki naczyniowego), odpowiedzialne za zwiększenie przepuszczalności naczyń krwionośnych [42]. Jednym z najsilniejszych aktywatorów ekspresji genu VEGF jest niedotlenienie tkanki. W guzach nowotworowych aktywność VEGF jest szczególnie wyrażona na granicy z obszarem martwicy [19].

1.7.3.2 Angiogeneza jako czynnik prognostyczny w raku jajnika

MVD (*microvessel density*) oznacza gęstość naczyń krwionośnych w guzie nowotworowym. Udowodniono istnienie zależności między wartością MVD a rokowaniem w przebiegu wielu nowotworów, w tym m. in. jajnika, szyjki macicy, piersi, jelita grubego [68].

Nadmierna ilość nieprawidłowych naczyń krwionośnych to negatywny czynnik prognostyczny we wczesnym, jak w zaawansowanym raku jajnika. Wykazano, że stanowi niezależny czynnik prognostyczny dla długości PFS [201].

VEGF jest najważniejszą cząsteczką, regulującą powstawanie patologicznych naczyń krwionośnych w guzach rakowych. Wysoką ekspresję VEGF stwierdza się w około 75% guzów złośliwych jajnika. W przypadku guzów łagodnych obserwuje się ją w około 13% przypadków, na niskim poziomie. Wysokie wartości ekspresji VEGF wykazano w płynie z wodobrzusza u chorych na raka jajnika [12].

1.7.3.3 Terapia antyangiogenna u chorych na raka jajnika

Zastosowanie inhibitorów VEGF znosi dominację czynników proangiogen-nych w obrębie rozrastających się tkanek raka, prowadząc do normalizacji budowy i funkcji naczyń krwionośnych, co z kolei redukuje oporność na cytostatyki [103].

Bewacyzumab jest humanizowanym przeciwciałem, skierowanym przeciwko VEGF. Blokuję wiązanie VEGF z jego receptorami- VEGFR1 i VEGFR2, co skutkuje zahamowaniem tworzenia naczyń i regresją waskularyzacji guza.

Podanie leku wpływa na zmniejszenie przepływu krwi przez sieć naczyń krwionośnych w guzie nowotworowym, oraz na zmniejszenie gęstości sieci naczyń [238], co wpływa na wydłużenie PFS. Głównymi powikłaniami stosowania leku są: nadciśnienie tętnicze, neutropenia, zakrzepica żylna, krwawienia i perforacje w obrębie przewodu pokarmowego.

Na podstawie wyników dwóch randomizowanych badań III fazy (GOG 218 i ICON7), decyzją *European Medicines Agency* (EMA) bewacyzumab został dopuszczony do stosowania w Europie w zaawansowanym raku jajnika oraz raku jajowodu i otrzewnej, w dawce 15 mg/ kg m.c., w skojarzeniu z chemioterapią opartą na paklitakselu i karboplatynie [59].

Bewacyzumab podaje się dożylnie podczas chemioterapii, przez maksymalnie 6 cykli leczenia, a następnie w monoterapii aż do progresji choroby, lub maksymalnie przez 15 miesięcy, lub do wystąpienia nieakceptowanej toksyczności, zależnie od tego, które z tych zjawisk wystąpi wcześniej.

W badaniach ICON7 i GOG 218 największą korzyść z terapii (wydłużenie PFS o 5,4 miesiąca) odniosły chore w stadium zaawansowania FIGO III i IV, z wysokim ryzykiem progresji choroby – niezoperowane, lub zoperowane nieoptymalnie, R> 1 cm [24, 172].

W ostatnim czasie przybywa doniesień, wskazujących na konieczność dobierania kandydatów do terapii bewacyzumabem na podstawie badań profili molekularnych raka jajnika.

Badanie Borisa Winterhoffa, zaprezentowane na Kongresie ASCO w 2014 r., oparte na ustalonym przez *The Cancer Genome Atlas* molekularnym podziale raka jajnika na podtypy: zróżnicowany, immunoreaktywny, mezenchymalny i proliferujący, wykazało, że największy zysk z podawania bewacyzumabu osiągają chore z mezenchylanym podtypem surowiczego raka jajnika, poprzez wydłużenie PFS o 9,5 miesiąca ($p=0,03$) [17].

Gourley z kolei w swoim badaniu, na podstawie analizy mRNA, podzielił HGSOc na 3 grupy: dwie z nich wykazywały podwyższoną ekspresję genów angiogenezy – tzw. grupy „proangiogenne”, w trzeciej – „immunologicznej”, stwierdzono represję genów angiogenezy, a podwyższoną ekspresję genów odpornościowych. Chory z grupy „immunologicznej” wykazywały znacznie lepsze przeżycia całkowite, ale dołączenie u nich bewacyzumabu do standardowej chemioterapii powoduje pogorszenie PFS i OS w porównaniu z chorymi, leczonymi tylko chemioterapią standardową. W grupie „proangiogennej” włączenie bewacyzumabu powodowało nieistotne wydłużenie PFS, o 5,1 miesiąca [83].

W leczeniu raka jajnika w zaawansowanej postaci, bada się obecnie inhibitory kinazy tyrozynowej: cediranib, sorafenib, sunitinib, pazopanib, imatinib, vatalanib, vandetanib, vargatef [46].

1.7.4 Zasady nowoczesnego leczenia skojarzonego raka jajnika (EBM)

Standardem postępowania w chemioterapii raka jajnika jest karboplatyna w dawce AUC 5 – 7 mg/ ml/ min, oraz paklitaksel w dawce 175 mg/m² powierzchni ciała w 3 – godzinny wlew dożylny, z uwagi na lepszą tolerancję i wygodę stosowania [53]. Schemat stanowi standard w leczeniu raka jajnika w I i II stopniu zaawansowania FIGO.

W przypadku wyższego zaawansowania choroby, po optymalnej cytoredukcji z resztkami ≤ 1 cm, u chorych bez zrostów w jamie brzusznej, należy rozważyć chemioterapię dootrzewnową, która u wybranych pacjentek daje szansę na najdłuższe przeżycie.

Gdy pierwotna interwencja chirurgiczna nie pozwoliła na uzyskanie optymalnej cytoredukcji, opcją postępowania adiuwantowego jest zastosowanie chemioterapii o dużej gęstości dawki lub schematu klasycznego, rozszerzonego o bewacyzumab.

Chemioterapię neoadiuwantową należy rozważyć w przypadku chorych z rakiem w stopniu IIIC i IV, u których uzyskanie pierwotnej optymalnej cytoredukcji oceniono jako nieosiągalne.

1.7.5 Radioterapia w raku jajnika

Rak jajnika jest nowotworem wrażliwym na promieniowanie jonizujące [58]. Radioterapia nie zapewnia jednak osiągnięcia długotrwałych remisji [95].

Problemem, ograniczającym skuteczność metody, jest szybko postępujący rozsiew nowotworu w jamie brzusznej, w sąsiedztwie narządów, wrażliwych na

promieniowanie jonizujące: nerek, pęcherza moczowego, jelit, wątroby, których uszkodzenie niesie za sobą szereg poważnych konsekwencji.

1.7.6 Wyniki leczenia raka jajnika

Według FIGO, wyniki leczenia raka jajnika uległy znaczącej poprawie. Odsetek kobiet leczonych w latach 1976-1978 które przeżyły okres 5 lat wynosił 29,8%. Dwadzieścia lat później osiągnął wartość 49,7% [90].

W Stanach Zjednoczonych, 5-letnie przeżycia dla wszystkich stadiów zaawansowania poprawiono z 37% w latach 1975-1977 do 45% w okresie 1996-2003 [105].

Mimo wysiłków, które doprowadziły do uzyskiwanej obecnie przeżywalności 5-letniej na poziomie 50%, wyniki leczenia nie są zadowalające.

Pojawiają się nowe terapie, antyangiogenne oraz inne, nakierowane na blokowanie szlaków sygnałowych, związanych z proliferacją komórki nowotworowej. Na ASCO pojawiły się doniesienia o pierwszej skutecznej, biologicznej immunoterapii w leczeniu nowotworów ginekologicznych. Wydaje się być zasadne poszukiwanie metod pobudzających nakierowanie własnego potencjału cytolitycznego komórek układu limfatycznego, w celu blokowania choroby. Szczególnego znaczenia w onkologii nabiera zatem immunoterapia.

1.8 Teoria immunoedycji w nowotworach: nadzór, równowaga i ucieczka

W 1863 r. Rudolf Virchow zauważył, że guzy nowotworowe są zawsze nacieczone leukocytami i zasugerował związek pomiędzy „przebiegami” zapalnymi a złośliwieniem komórek. Na podstawie tych obserwacji Paul Ehrlich sformułował teorię, dotyczącą nadzoru immunologicznego nad nowotworem, którą potwierdzili w latach pięćdziesiątych dwudziestego wieku Thomas i Macfarlane Burnet [25].

Koncepcja nie była jednak rozwijana przez ponad 50 kolejnych lat. Odżyła na początku XXI wieku, po opublikowaniu wyników badań nad częstością nowotworów u myszy transgeniczných, z genetycznie określonymi niedoborami odporności [56]. W 2004 r. Dunn i współpracownicy przedstawili nowatorską tezę „immunoedycji” układu odpornościowego [57].

Teoria Immunoedycji zakłada, że relacje pomiędzy nowotworem a układem odpornościowym są plastyczne i mają różne etapy.

W pierwszym etapie układ odpornościowy pobudza uszkodzenia genetyczne komórek, które są odpowiedzialne za genezę nowotworu. Powstaje od-

powieź immunologiczna, skierowana przeciwko guzowi, określana jako nadzór immunologiczny. Na tym etapie nie ma klinicznych objawów choroby, a układ odpornościowy może skutecznie pokonać nowotwór eliminując uszkodzone komórki [73].

Przedłużająca się wybiórcza walka nadzoru immunologicznego z guzem, może prowadzić do drugiego etapu immunoedycji, w którym nowotwór nie jest już całkowicie eliminowany i utrzymuje się w specyficznym mikrośrodku tkankowym. Podczas tej fazy, komórki guza kontynuują podziały, ale jego wzrost pozostaje pod kontrolą układu immunologicznego. Klinicznie brak jest objawów choroby i wykrycie jej może być wyłącznie przypadkowe. Wyniki obserwacji pochodzących z leczenia pacjentów po przeszczepach narządów zdecydowanie potwierdzają tezę, że nieczynne schorzenia mogą istnieć w równowadze immunologicznej przez wiele lat, zanim staną się „nowotworem” [132].

W trzecim, ostatnim etapie immunoedycji, komórki nowotworowe osiągają stan, po którym mogą skutecznie unikać układu odpornościowego. Następuje ucieczka immunologiczna nowotworu. Wówczas uszkodzenia postępują i choroba staje się klinicznie widoczna.

Poznanie mechanizmu ucieczki immunologicznej nowotworu jest kluczowe dla zrozumienia jego patofizjologii w wymiarze klinicznym, ponieważ proces ten zamienia „uśpione” uszkodzenia komórek w objawową chorobę nowotworową. Stworzenie skutecznych metod walki z ucieczką immunologiczną stwarza nadzieję na nowe metody leczenia nowotworów, zwłaszcza po zabiegach operacyjnych.

W ostatnim dziesięcioleciu dokonał się znaczący postęp w wyjaśnieniu mechanizmów nabywania zdolności do ucieczki immunologicznej przez guzy nowotworowe [111, 246].

Większość dotychczasowych strategii immunoterapeutycznych skupia się głównie na stymulowaniu lub uzupełnianiu funkcji komórek efektorowych. Być może wszystkie ograniczenia tych terapii wynikają z faktu występowania „sieci immunosupresyjnych” w mikrośrodku guzów nowotworowych.

Wydaje się, że zakłócenie mechanizmów immunosupresji może skutecznie odblokować układ immunologiczny i w rezultacie skierować pełen potencjał odporności przeciwko guzowi. Sieci immunosupresyjne dostarczają zatem zupełnie nowych miejsc do terapeutycznej interwencji, tym razem małymi molekułarnymi związkami zamiast biologicznych

czynników, co może okazać się tańsze, łatwiejsze do wykonania, a z biegiem czasu bardziej efektywne [147].

1.9 Egfl7

Początkowo Egfl7 opisywano jako białko 30 kD, podlegające ekspresji wyłącznie w komórkach śródbłónka naczyniowego [214]. Obecnie wiadomo, że jest produkowane także m.in. przez neurony dorosłych myszy, co sugeruje szerszy zakres funkcji, wychodzący poza układ naczyniowy [200]. Analiza ludzkiego Egfl7 wykazała istnienie 3 izoform, podlegających transkrypcji z różnych promotorów [66].

U kręgowców gen Egfl7 koduje 2 aktywne biologicznie formy miRNA: miR 126 i miR 126*, które odgrywają istotną rolę w rozwoju układu sercowo naczyniowego, jak i w patologii chorób sercowo – naczyniowych i nowotworów [228].

W trakcie życia osobniczego, stężenie Egfl7 występuje na względnie stałym poziomie. Oznaczalne stężenia białka utrzymują się w części naczyń płucnych, serca, nerek, wątroby, macicy. Zwiększenie ekspresji Egfl7 może wiązać się z sytuacjami fizjologicznymi (np. w naczyniach macicy w trakcie ciąży), jak i patologicznymi: uszkodzenie naczyń tętniczych, uraz niedokrwienny [28], w guzach litych [125].

1.9.1 Egfl7 i angiogeneza

Do rozwoju naczyń krwionośnych przyczyniają się dwa różne mechanizmy: waskulogeneza, która jest powstawaniem naczyń krwionośnych *de novo* z komórek progenitorowych, oraz angiogeneza – tworzenie nowych naczyń krwionośnych z istniejących wcześniej [233].

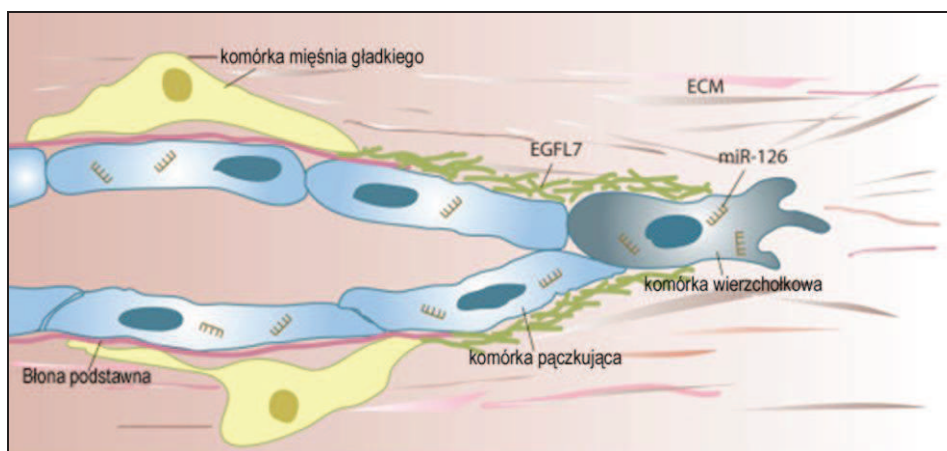
Angiogeneza jest bardzo uporządkowanym i starannie regulowanym, wieloetapowym procesem. Warunkiem prawidłowego tworzenia funkcjonalnych naczyń krwionośnych jest współdziałanie komórek śródbłónka ścian naczyń (np. komórki mięśni gładkich, perycyty) [129]. Relacje między tymi dwoma typami komórek są regulowane pośrednio przez czynniki wzrostu, oraz bezpośrednio poprzez interakcje na poziomie komórka – komórka i komórka – macierz. Wydzielany przez komórki śródbłónka Egfl7 pełni ważną rolę regulacyjną w rekrutacji komórek mięśni gładkich i komórek endotelium, oraz formowaniu naczyń – tubulogenezy, tworzeniu światła naczyń [62, 130, 228]. Powoduje stymulowanie migracji komórek śródbłónka, jako pojedynczy czynnik, lub poprzez

kompleksy, tworzone z cząstkami macierzy pozakomórkowej, z którą wykazuje ścisły związek, a której skład cząsteczkowy wpływa na morfogenezę naczyń [131].

Egfl 7 odgrywa rolę w angiogenezie w warunkach prawidłowych, jak i patologicznych [67]. Podwyższona ekspresja Egfl7 występuje w naczyniach tkanek proliferujących, obniżona w większości rozwiniętych naczyń, zaopatrujących prawidłowe, dojrzałe tkanki [125].

Egfl7 zapewnia optymalne środowisko dla prawidłowej migracji komórek endotelialnych. O istotności udziału Egfl7 w procesie angiogenezy świadczy badanie, w którym oceniono rozwój naczyń w tkankach myszy ze zmutowanym Egfl7. Potwierdzono, że u tych osobników zasięg unaczynienia w poszczególnych tkankach jest zmniejszony lub osiągany z opóźnieniem, a morfogeneza naczyń – nieprawidłowa [131].

Schematyczny udział Egfl7 w procesie kiełkowania naczyń krwionośnych przedstawia rycina 1.



Ryc. 1. Schemat, przedstawiający znaczenie Egfl w procesie kiełkowania naczyń krwionośnych [158]

Fig. 1. Putative function of Egfl7 in angiogenic sprouting

Proces kiełkowania naczyń odbywa się dzięki skoordynowanej aktywności komórek wierzchołkowych i pączkujących. Komórka wierzchołkowa prowadzi kiełkowanie w środowisku macierzy pozakomórkowej, podczas gdy komórki pączkujące rozmnażają się, umożliwiając progresję procesu. Wraz z rozwojem kielka, lub później, dochodzi do procesu kanalizacji, tworzenia błony podstawnej i rekrutacji komórek mięśni gładkich. Egfl7 znajduje się w środowisku macierzy, otaczającej kiełkujące naczynie.

1.9.2 Egfl7 i nowotwory

W przypadku raków u ludzi, poza komórkami śródbłónka, Egfl7 został wykryty w komórkach nowotworowych. Poziom ekspresji Egfl7 koreluje z wyższym stopniem zróżnicowania histopatologicznego (*grading*) w przypadku glejaka [96, 97] i raka jelita grubego [48], a także z gorszym rokowaniem i większym ryzykiem przerzutów u chorych z rakiem wątrobowokomórkowym [242].

Chociaż obserwacje te wskazują na pewną rolę Egfl7 w progresji raka, jego bezpośrednia rola tym procesie pozostaje niejasna.

Aktualne dane (opublikowane online 28 października 2011 r.) wykazują, że Egfl7 jest endogennym regulatorem aktywacji komórek śródbłónka, który gdy ulega ekspresji w komórkach nowotworowych, chroni guz przed układem immunologicznym gospodarza [47]. Badanie *in vitro* wykazało, że w komórkach raka sutka i raka płuc u myszy, Egfl7 hamuje ekspresję ICAM1 i VCAM1, co wpływa negatywnie na proces adhezji i migracji limfocytów przez ścianę naczynia krwionośnego. Zatem Egfl7 hipotetycznie może wpływać na ucieczkę raka spod nadzoru układu immunologicznego gospodarza, poprzez hamowanie diapedezy w guzie nowotworowym [47].

Pośrednim wykładnikiem takiego działania powinna być negatywna korelacja pomiędzy hipotetyczną ekspresją Egfl7 w komórkach HGSOC a liczbą limfocytów naciekających jego gniazda – *Tumor Infiltrating Lymphocytes* (TILs).

Do tej pory nie zbadano ekspresji Egfl7 wybiórczo w tkance HGSOC.

1.10 TILs: komórki immunokompetentne w tkance raka

Odpowiedź immunologiczna skierowana przeciw nowotworowi obejmuje mechanizmy komórkowe i humoralne. Najważniejsze mechanizmy efektorowe odpowiedzi przeciwnowotworowej to:

- cytotoksyczność limfocytów T,
- aktywność cytokin wydzielanych przez limfocyty T,
- aktywność komórek NK (*natural killer*),
- cytotoksyczność pobudzonych makrofagów i granulocytów obojętnochłonnych,
- aktywność cytokin wydzielanych przez makrofagi,
- cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał,
- cytotoksyczność zależna od dopełniacza [104].

W doniesieniach z ostatnich lat można znaleźć prace, dotyczące oceny mechanizmów odpowiedzi komórkowej i humoralnej, wskazujące na szczególną rolę

limfocytów CD4+ i CD8+, oraz cytokin wydzielanych przez te komórki w procesie rozrostu nowotworowego [22, 36, 45, 100, 109, 110, 224].

W immunologii nowotworów, szczególną uwagę zwraca się na limfocyty T z bezpośredniego otoczenia guza, tzw. limfocyty naciekające guz, czyli komórki TILs (*Tumor Infiltrating Lymphocytes*). TILs mogą rozpoznawać antygeny guza i powodować bezpośrednio jego lizę, bądź też doprowadzać do niej za pośrednictwem uwalnianych cytokin: IFN- γ , TNF- α . W obrazach pochodzących z mikroskopu elektronowego zaobserwowano, że w regionach bezpośredniego kontaktu TILs i komórek nowotworowych występuje w tych ostatnich zniszczenie błon komórkowych i cytoplazmy, a w niektórych przypadkach stwierdzono penetrację limfocytu do wnętrza komórki nowotworowej, a nawet niszczenie jądra komórkowego [124, 163].

Ważnym dowodem klinicznym na nadzór układu odpornościowego nad komórkami raka jest udokumentowana w licznych nowotworach korelacja, pomiędzy intensywnością nacieków limfocytarnych CD4+, CD8+ w bezpośrednim otoczeniu guza, a korzystniejszym przebiegiem choroby [150, 151, 203].

1.10.1 Znaczenie prognostyczne TILs w raku jajnika

Metaanaliza, która dotyczyła 1815 chorych pierwotnie operowanych z powodu raka jajnika, potwierdziła korzystny wpływ naciekania tkanki rakowej przez limfocyt CD8+ na czas przeżycia pacjentów [217].

Limfocyty CD8+ mogą skutecznie ograniczać wzrost guzów na drodze cytolizy komórek nowotworowych i/lub zwiększać efektywność działania cytostatyków, stosowanych w chemioterapii. Szczególnie silne znaczenie prognostyczne zaobserwowano w grupie chorych, u których nie udało się wykonać optymalnej cytoredukcji, co z kolei może sugerować, że kobiety z silną odpowiedzią immunologiczną organizmu, posiadają zdolność do stabilizacji choroby resztkowej. W badaniach, w których dodatkowo oceniono nacieki tkanki rakowej przez komórki regulatorowe FOXP3+, wykazano korzystne znaczenie prognostyczne wskaźnika CD8+/ FOXP3+ [217].

2. CEL PRACY

1. Zbadanie, czy komórki raka jajnika wykazują endogenną ekspresję Egfl7 (czy występuje ona wyłącznie w komórkach śródbłonna naczyń, zaopatrujących guz).
2. Określenie korelacji pomiędzy ekspresją Egfl7 a liczbą limfocytów (CD8+ i CD4+), naciekających gniazda komórek rakowych.
3. Analiza związku ekspresji Egfl7 z wybranymi czynnikami kliniczno-patologicznymi.
4. Ocena znaczenia prognostycznego Egfl 7.

3. MATERIAŁ I METODA

Badanie uzyskało zgodę Wewnętrznej Komisji Bioetycznej GUMed (NKBBN/263/2012) i zostało sfinansowane ze środków projektu naukowego Narodowego Centrum Nauki (NCN 2012/07B/NZ5/00018), którego kierownikiem jest dr hab. n. med. Jacek Sznurkowski.

3.1 Pacjenci

Materiał badany to 73 chore, operowane z powodu raka jajnika w okresie XII 2007 r. – XII 2012 r. w Oddziale Ginekologii Onkologicznej Gdyńskiego Centrum Onkologii (GCO). U wszystkich pacjentek włączonych do badania, histopatologicznie rozpoznano niskozróżnicowanego surowiczego raka jajnika (*High Grade Serous Ovarian Cancer* – HGSOC).

Wszystkie chore przebyły pierwotny zabieg cytoredukcyjny. Wybór zakresu leczenia operacyjnego odbywał się zgodnie z zasadami, opisanymi we wstępie niniejszej monografii.

Na podstawie wyniku badania histopatologicznego materiału tkankowego, pozyskanego w trakcie operacji pierwotnej, ustalano stopień zaawansowania klinicznego choroby, zgodnie z klasyfikacją FIGO z 2009 r.. Następnie każda chora podlegała odrębnej kwalifikacji do chemioterapii pierwszego rzutu w Poradni Onkologicznej Gdyńskiego Centrum Onkologii.

Wznowę interpretowano jako potwierdzenie zmian w badaniach obrazowych (TK), wykonywanych rutynowo, i/ lub na podstawie podwyższonego poziomu CA 125 w badaniu kontrolnym.

PFS obliczano jako liczbę dni od dnia podania ostatniego cyklu chemioterapii I rzutu do dnia, w którym, stwierdzono wznowę choroby.

Wrażliwość na platynę zdefiniowano jako nie wystąpienie wznowy choroby w okresie dłuższym niż 6 miesięcy od zakończenia chemioterapii.

Oporność na platynę zdefiniowano jako wystąpienie wznowy choroby w okresie krótszym niż 6 miesięcy od zakończenia chemioterapii.

Informacje dotyczące przebiegu leczenia i dalszego losu pacjentów pozyskano z historii chorób Oddziału Ginekologii Onkologicznej Gdyńskiego Centrum Onkologii (GCO), Oddziału Onkologii Klinicznej GCO, Poradni Onkologicznej przy GCO, a także na podstawie ankiety specjalnie przygotowanej na potrzeby tego badania. Ankiety były uzupełniane podczas indywidualnych spo-

tkań, lub na podstawie rozmów telefonicznych z chorymi albo członkami ich rodzin. Odtworzono kliniczny przebieg choroby u wszystkich badanych chorych.

Dane o przeżyciach uzyskano z Centrum Personalizacji Dokumentów Ministerstwa Spraw Wewnętrznych i Administracji, Wydziału Ochrony Informacji Niejawnych w Warszawie. Koniec obserwacji ustalono na 30.06.2014r.

3.2 Materiał tkankowy

Materiał tkankowy był utrwalany w 4% lub 8% zbuforowanej formalinie, następnie odwadniany we wzrastających stężeniach etanolu, prześwietlany w ksylenie i zatapiany w parafinie w temperaturze 54-56 °C w Zakładzie Patomorfologii Szpitala Morskiego w Gdyni.

Z archiwum Zakładu wyciągnięto 113 bloczków parafinowych i odpowiadających im szkiełek z rozpoznanym surowiczym rakiem jajnika (SOC). Dwóch niezależnych patomorfologów dokonało ponownej oceny preparatów w celu wyselekcjonowania grupy raków niskozróżnicowanych (HGSOC), oraz wybrało miejsca najbardziej adekwatne do przyszłych oznaczeń immunohistochemicznych.

Z grupy 113 preparatów, 9 zweryfikowano jako typy niesurowicze, 31 jako wysokozróżnicowane (LGSOC).

Ostatecznie do badań immunohistochemicznych (IHC) włączono 73 pacjentki z kompletnym, zweryfikowanym histopatologicznie materiałem tkankowym, a także całkowicie znanym przebiegiem klinicznym choroby. Żadna z chorych przed zabiegiem nie otrzymywała neoadiuwantowej chemioterapii lub radioterapii.

Materiał poddano barwieniu immunohistochemicznemu i dalszej ocenie w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUMed)

3.3 Oznaczenia immunohistochemiczne

3.3.1 Przygotowanie preparatów

Barwienia immunohistochemiczne wykonywano na skrawkach tkankowych o grubości 4 µm. Były one umieszczane na szkiełkach „*Superfrost PLUS*” (producent – *Surgipath*), a następnie inkubowano je w temperaturze 37 °C przez noc.

Tak przygotowane preparaty przechowywano w temperaturze pokojowej do momentu wykonania barwienia.

W trakcie obróbki immunohistochemicznej jeden z preparatów zaginął.

3.3.2 Przeciwciała

Do barwień immunohistochemicznych zostały wybrane przeciwciała wykrywające ludzkie antygeny: Egfl7, CD8+ oraz CD4+ (tabela 7).

Tabela 7. Wykaz przeciwciał pierwotnych użytych do badań immunohistochemicznych
Table 7. Schedule of primary antibodies used in immunohistochemical evaluation

Nr katalogowy	Nazwa przeciwciała	Producent	Stężenie	Kontrola pozytywna	Metoda
CD4-1F6-L-CE	anti Human CD4 Mouse monoclonal (MoAb) antibody	Novocastra Laboratories	1:20	Migdałek <i>Tonsil</i>	Ilościowa
CD8-295-L-CE	anti Human CD8 Mouse monoclonal (MoAb) antibody	Newcastle upon Tyne, UK	1:20	Migdałek <i>Tonsil</i>	Ilościowa
SC-101349	anti-human Egfl7 Mouse monoclonal antibody	Santa Cruz	1:800	Łożyisko <i>Placenta</i>	Jakościowo-ilościowa

3.3.3 Barwienie immunohistochemiczne

Barwienie immunohistochemiczne przeprowadzono według następującego schematu:

1. Odparafinowanie preparatów w szeregu ksilen-alkohol (100%, 96%, 70%).
2. Odzyskiwanie epitopów antygenów. Gotowanie w szybkowarze ciśnieniowym w buforze cytrynianowym o pH=6,0 (DAKO) przy temperaturze 120 °C przez 2,5 min.
3. Blokada endogennej peroksydazy przy pomocy 0,03% nadtlenu wodoru przez 5 min.
4. Ekspozycja z przeciwciałem pierwotnym, w temperaturze pokojowej, przez 1 godz.
5. Ekspozycja w roztworze Post Primary przez 30 min.
6. Ekspozycja z przeciwciałem wtórnym (zestaw Novolink firmy Novocastra) przez 30 min.

7. Ekspozycja z DAB (diaminobenzzydina) przez 2-8 min – odzyskanie aktywności endogennej peroksydazy.
8. Podbarwienie hematoksyliną Mayera przez 5 – 8 min.
9. Odwodnienie (szereg alkohol – ksylen) i nakrycie szkiełkiem nakrywkowym.

Z każdą badaną grupą preparatów były równocześnie oceniane próbki kontrolne dodatnie (migdałek, łożysko)

3.3.4 Ocena odczynów immunohistochemicznych Egfl 7 – metoda półilościowa

Badaniu poddano ekspresję Egfl7 w tkance HGSOE, ze szczególnym uwzględnieniem komórek raka. Oceniano obecność ekspresji cytoplazmatycznej i jądrowej.

Do opisanie ekspresji cytoplazmatycznej posłużono się metodą półilościową (HSCORE):

Oceniano intensywność odczynu immunohistochemicznego skali od 0 do 3 oraz rozległość obszarów tych 4 frakcji komórek w procentach, w odniesieniu do całej powierzchni preparatu. Na podstawie uzyskanych danych obliczano zintegrowany indeks ekspresji odczynu immunohistochemicznego, według następującej formuły: $HS = 1 \times x + 2 \times y + 3 \times z$, gdzie „x”, „y”, „z” – oznaczają odsetek powierzchni obszaru nowotworu o odpowiedniej intensywności odczynu.

Wartość HSCORE oszacowano dla wszystkich włączonych do badania chorych. Mediana wyniosła 90. Wynik powyżej mediany uznawano za potwierdzenie ekspresji cytoplazmatycznej Egfl7, poniżej – nie ma ekspresji cytoplazmatycznej Egfl7.

W grupie pacjentek z potwierdzoną endogenną ekspresją Egfl7 w komórkach HGSOE, przeprowadzono podział na dwie podgrupy, w oparciu o medianę ekspresji Egfl7 w tej grupie (HSCORE – 100) którą użyto jako punkt odcięcia.

Pacjenci, u których ekspresja przekraczała wartość mediany, zostali określani jako Egfl7 dodatni z wysoką ekspresją (*highEgfl7+*), natomiast chorzy z wartością HSCORE poniżej mediany, zostali uznani jako Egfl7 dodatni z niską ekspresją (*lowEgfl7+*).

Przypadki, w których odczyn jądrowy występował w >10% komórek był uznawany za dodatni.

3.3.5 TILs: CD8+ i CD4+ – metoda ilościowa

Ilościową metodę oceny zastosowano dla komórek limfatycznych CD4, CD8, naciekających gniazda komórek HGSOE. Dla każdego przypadku przeanalizowano 10 pól widzenia (HPF) w ogniskach raka, z których sfotografowano 3 – 5, o najbardziej licznej ekspresji badanego markera. Za pomocą programu komputerowego *Multiscan 14.02* policzono komórki dodatnie i obliczono ich wartość średnią dla każdego przypadku. Do analizy statystycznej wykorzystano dodatkowo podział pacjentów na odpowiednie podgrupy:

CD4+ ujemna/CD4+ dodatnia,

CD8 +/ujemna/CD8+ dodatnia

na podstawie mediany, obliczonej z całej grupy badanej, która również posłużyła jako punkt odcięcia w analizie przeżycia.

3.4 Analiza cech kliniczno-patologicznych w grupie chorych z HGSOE

Analizie poddano następujące parametry kliniczno-patologiczne:

1. Wiek chorych w momencie rozpoznania.
2. Status hormonalny w momencie rozpoznania. Dokonano podziału chorych na dwie grupy. Jedna z nich objęła chore, które nie miesiączkowały przez okres dłuższy niż 12 miesięcy do momentu rozpoznania. W drugiej grupie znalazły się pacjentki, które zachorowały przed menopauzą. Porównano przebieg choroby i przeżywalność w obu grupach.
3. Waga ciała. Oceniono wagę chorych przed operacją – struktura grupy badanej, wpływ przedoperacyjnej masy ciała na stopień uzyskiwanej cytoredukcji. Zbadano też znaczenie zmiany wagi ciała między operacją a pierwszym cyklem chemioterapii w przewidywaniu oporności lub wrażliwości na pochodne platyny.
4. BMI przed zabiegiem operacyjnym a także wpływ przedoperacyjnego BMI na zakres cytoredukcji i wielkość choroby resztkowej.
5. Optymalna cytoredukcja. Zbadano częstość, z jaką w badanej grupie uzyskiwano cytoredukcję optymalną.
6. Poziom CA 125 przed zabiegiem operacyjnym i jego wartość predykcyjną dla optymalnej cytoredukcji.
7. Stopień zaawansowania klinicznego według klasyfikacji FIGO z 2009 r.

W stadium FIGO II w badanej grupie znalazła się jedna chora, w stadium IV – 2 chore.

W związku z małą liczebnością tych grup, niemożliwe było statystyczne porównywanie chorych w stopniu zaawansowania II i IV z chorymi z FIGO I – 10 chorych i FIGO III – 60 chorych. Zdecydowano zatem, by całą badaną populację podzielić na dwie:

- 1) chore we wczesnym stadium choroby (*early stage*), obejmującą przypadki w stopniu zaawansowania FIGO I i FIGO II – choroba ograniczona do miednicy mniejszej. Grupa 1. objęła 11 chorych.
 - 2) chore w późnym stadium choroby (*late stage*), obejmującą przypadki w stopniu zaawansowania FIGO III i FIGO IV – choroba przekracza granicę miednicy mniejszej. Do tej grupy włączono 62 chore.
8. Wodobrzusze.
 9. Liczba limfocytów i neurocytów w surowicy krwi, wskaźnik limfocytar-no- neutrocytarny przed operacją pierwotną.
 10. Czas od operacji do pierwszego cyklu chemioterapii.
 11. Liczebność TILs: CD4+ i CD8+ w gnieździe komórek HGSOc

Oceniono znaczenie prognostyczne (korelację z PFS i OS) wszystkich opisanych powyżej cech kliniczno-patologicznych.

3.5 Ocena ekspresji egfl7

Zbadano, czy komórki HGSOc posiadają endogenną ekspresję Egfl7 i czy koreluje ona z wybranymi czynnikami kliniczno – patologicznymi, ze szczególnym uwzględnieniem liczebności TILs (CD8+ i CD4+) w gnieździe raka. Oceniono również znaczenie prognostyczne Egfl7 w badanej grupie chorych.

3.6 Analiza statystyczna

W celu weryfikacji czy badana cecha posiada rozkład normalny, zastosowano test *Kolmogorova-Smirnova*. Jeśli nie był to rozkład normalny, cechy oceniano przy pomocy testów nieparametrycznych.

Do określenia różnicy pomiędzy zmiennymi ilościowymi w różnych podgrupach nowotworu wykorzystano test *U-Manna-Whitneya*, natomiast pomiędzy zmiennymi jakościowymi – testy *Fishera*. Korelację oceniano za pomocą współczynnika korelacji rang *Spearmana*, z oceną wiarygodności.

W celu oceny znaczenia prognostycznego poszczególnych czynników klinicznych, morfologicznych i immunohistochemicznych, uwzględniono wyłącznie przypadki z pełną informacją o przeżyciach. Analizę przeprowadzono, wykorzystując metodę *Kapłana-Mayera* z testem *F-Coxa* dla zbadania wiarygodności. Ponadto dla zmiennych, znamienne wpływających na przeżycie, obliczono jednoczynnikowe i wieloczynnikowe modele regresji proporcjonalnego ryzyka *Coxa*. W związku z tym, że badane czynniki nie spełniały wymogów rozkładu normalnego, zastosowano testy nieparametryczne. Wszystkie badania statystyczne wykonano za pomocą pakietu Statystyka 10.0 *StatSoft Inc.* USA.

Dla wszystkich zastosowanych testów przyjęto obustronny poziom istotności $p < 0,05$.

4. WYNIKI

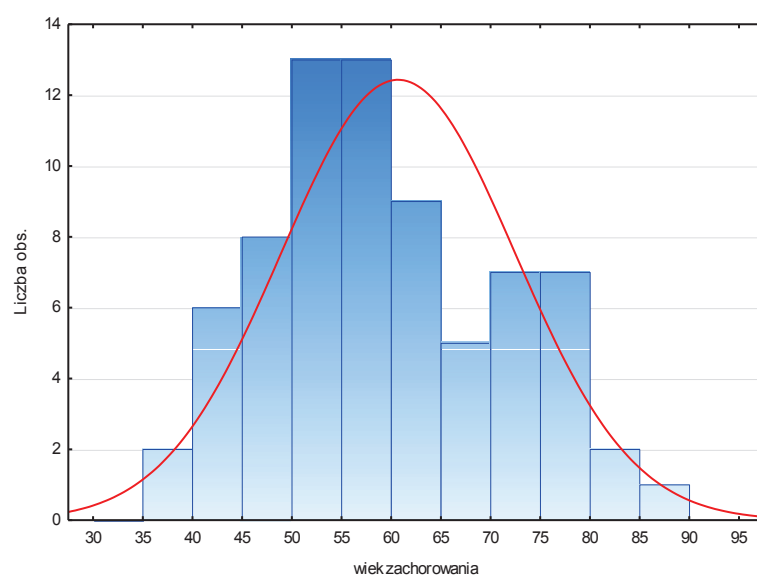
W badanej grupie mediana czasu wolnego od progresji choroby (PFS) oraz całkowitego przeżycia (OS) wyniosły odpowiednio 10,23 i 26,75 miesiąca.

Mediana czasu obserwacji chorych – 47,25 miesiąca.

4.1 Badana populacja – opis grupy pod względem kliniczno-patologicznym

4.1.1 Wiek

Rozkład wieku chorych na raka jajnika w badanej grupie miał charakter nienormalny. Mediana wieku zachorowania wyniosła 59 lat. Najmłodsza chora miała 39, najstarsza – 86 lat.

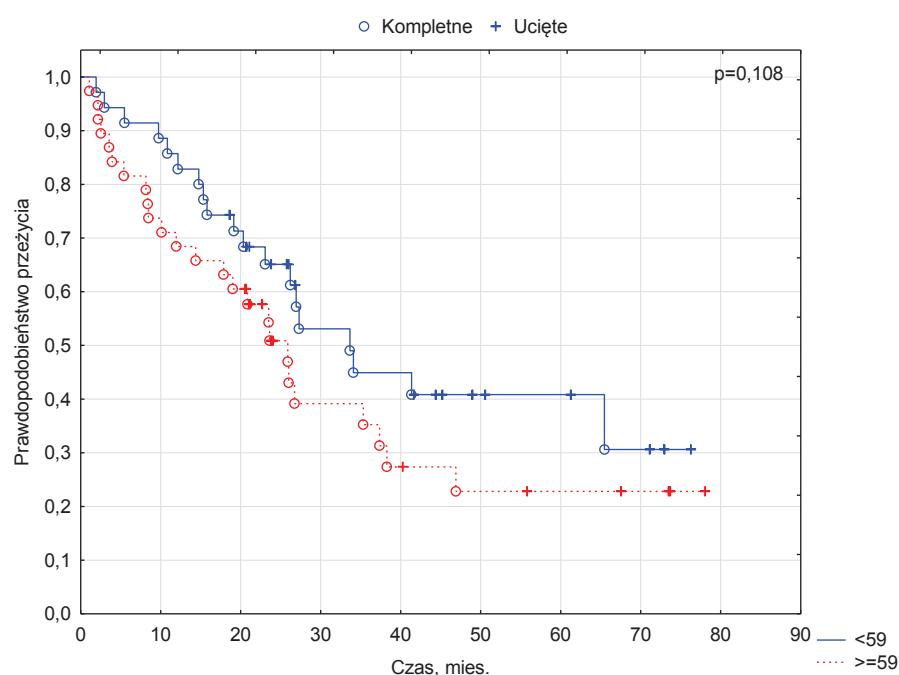


Rycina 2. Struktura wieku chorych w badanej grupie

Figure 2. The age structure of patients in study group

Najczęściej do zachorowania dochodziło w wieku 50-60 lat (26 zachorowań, co stanowiło 35% grupy). Strukturę wieku chorych przedstawia ryc. 2.

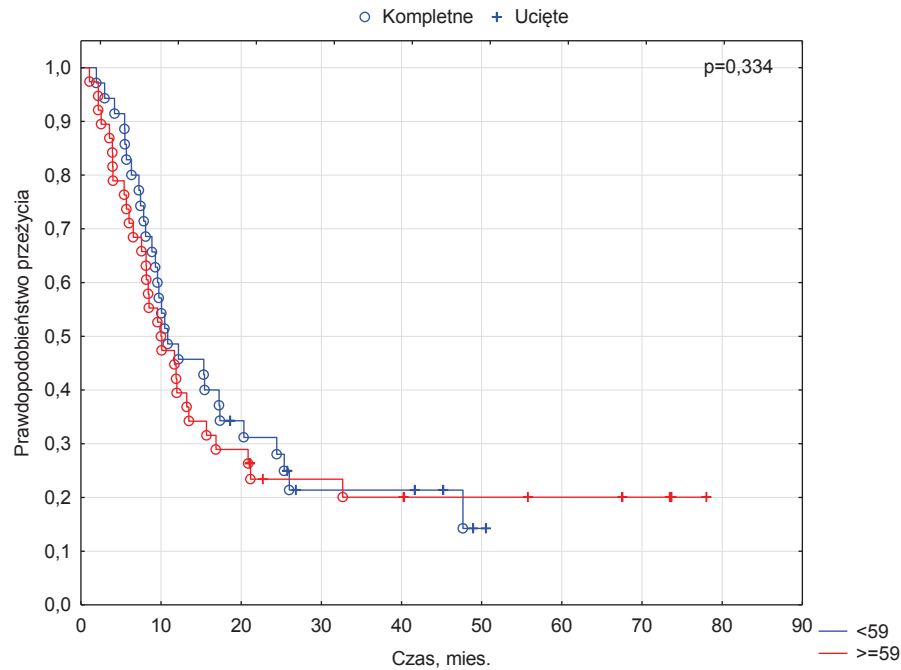
Zbadano znaczenie prognostyczne wieku pacjentek w momencie rozpoznania HGSOV. Za punkt odcięcia przyjęto medianę. W grupie chorych w wieku poniżej mediany zaobserwowano tendencję do dłuższego przeżycia niż w grupie starszych pacjentek. Różnice nie były jednak istotne statystycznie ($p=0,1$) (ryc. 3). Badane grupy nie różniły się istotnie również czasem PFS. ($p=0,33$) – ryc.4.



Ryc. 3. Prawdopodobieństwo przeżycia pacjentów w zależności od wieku zachorowania; (punkt odcięcia: mediana, 59 lat)

Fig 3. Probability of survival of patients, depending on the age at diagnosis (cut – off point: median age, 59 years old)

czas – czas obserwacji w miesiącach / observation time in months



Ryc. 4. Związek między przedziałem wiekowym pacjentek w momencie zachorowania a czasem wolnym od progresji choroby

Fig. 4. The relationship between age at diagnosis and progression free time

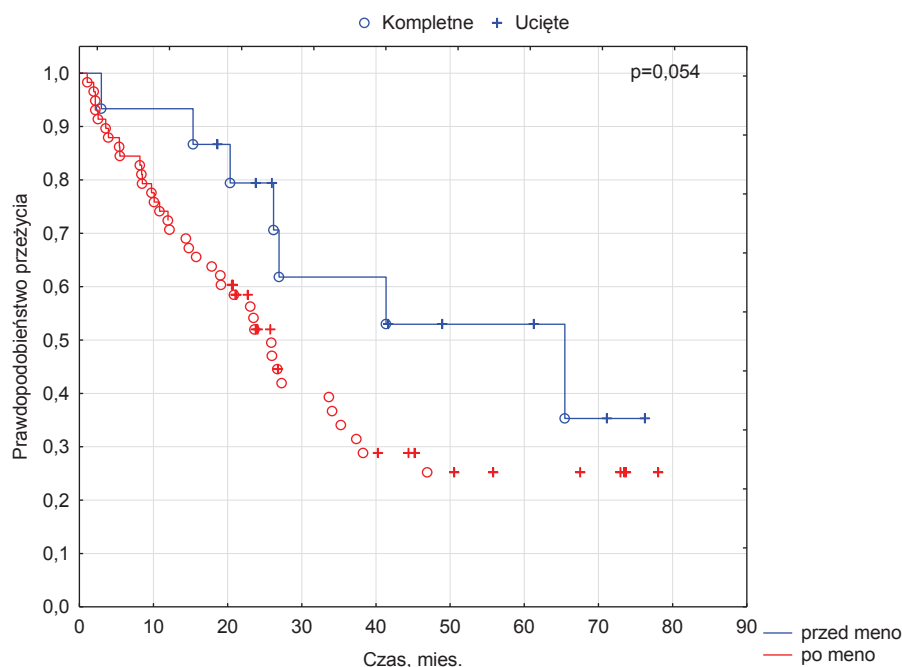
czas – czas obserwacji w miesiącach / observation time in months

4.1.2 Status menopauzalny kobiet w chwili rozpoznania choroby

58 pacjentek (79%) nie miesiączkowało przez okres dłuższy niż 12 miesięcy.

Mediana wieku wystąpienia menopauzy wyniosła 49 lat. Do zachorowania najczęściej dochodziło w 8 lat po ostatniej miesiączce.

U pozostałych 15 pacjentek, u których rozpoznano HGSOC przed menopauzą, zaobserwowano tendencje do dłuższego OS ($p = 0,05$; granica istotności) (ryc. 5). Nie stwierdzono wpływu statusu menopauzalnego na PFS w badanej grupie.



Ryc. 5. Przeżycia całkowite w HGSOV w zależności od statusu hormonalnego chorych

Fig. 5. Overall survival in HGSOV depending on the hormonal status of patients

(przed meno – premenopausal; po meno – postmenopausal)

czas – czas obserwacji w miesiącach / observation time in months

4.1.3 Waga ciała

Zgromadzono dane, dotyczące wagi ciała chorych w okresie poprzedzającym operację pierwotną (n= 72) i pierwszy cykl chemioterapii (n= 64).

Mediana wagi przed operacją wynosiła 64 kg (zakres 45-100 kg), przed chemioterapią 60,5 kg (zakres 40-87 kg).

Oceniono wpływ wagi przedoperacyjnej na stopień uzyskanej cytoredukcji ($R \leq 1$ cm lub $R > 1$ cm). Za punkt odcięcia przyjęto medianę (64 kg). Nie stwierdzono, by waga przedoperacyjna w grupie poniżej i powyżej mediany miała wpływ na stopień uzyskiwanej cytoredukcji (tabela 8).

W badanej grupie pacjentek waga przedoperacyjna poniżej i powyżej mediany nie miała wpływu na OS ani na PFS.

Tabela 8. Stopień uzyskanej cytoredukcji w trakcie PDS w zależności od wagi przedoperacyjnej
Table 8. The result of primary debulking surgery depending on preoperative weight of patients

Waga przed PDS	p= 0,48975		
	R≤1cm	R>1cm	Razem
≥ 64 kg	20	18	38
< 64kg	15	19	34
Suma	35	37	72

4.1.4 Zmiana wagi między operacją pierwotną a pierwszym cyklem chemioterapii

Chemioterapię zastosowano u 64 chorych z badanej grupy.

U 53 pacjentek odnotowano utratę wagi ciała w porównaniu z wartością przed operacją. Dziewięć chorych zwiększyło swoją wagę w analogicznej sytuacji. W 2 przypadkach waga ciała nie uległa zmianie.

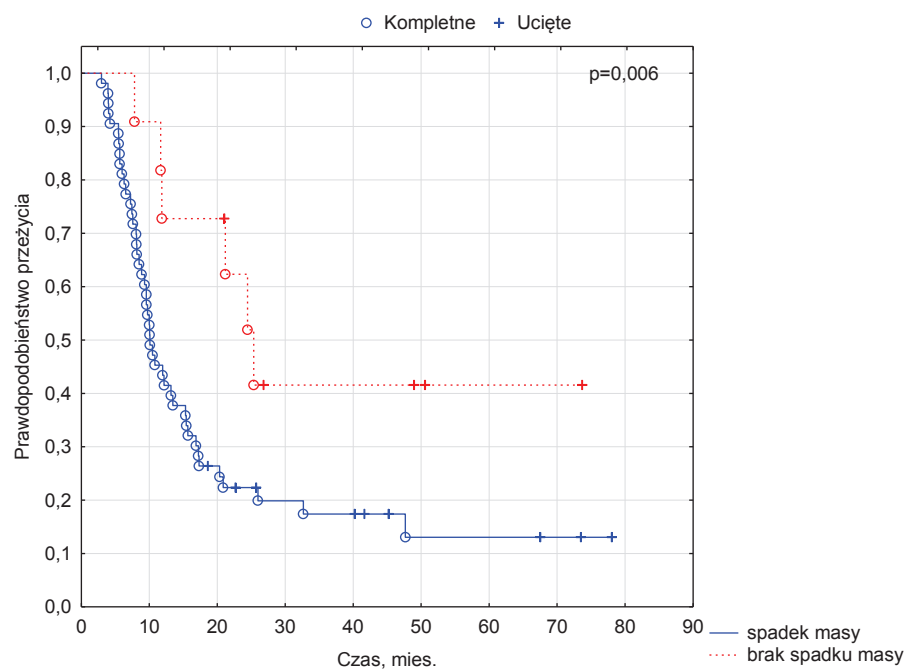
Mediana zmiany wagi ciała w badanej grupie wyniosła -3,5 kg (zakres -33 kg do +5 kg).

Nie stwierdzono różnic w długości OS i PFS w grupie poniżej i powyżej mediany zmiany wagi ciała.

Badaną populację podzielono na dwie grupy:

- 1) pierwsza objęła 53 chore, u których doszło do utraty wagi ciała
- 2) druga grupa 11 chorych, u których waga wzrosła lub pozostała bez zmian.

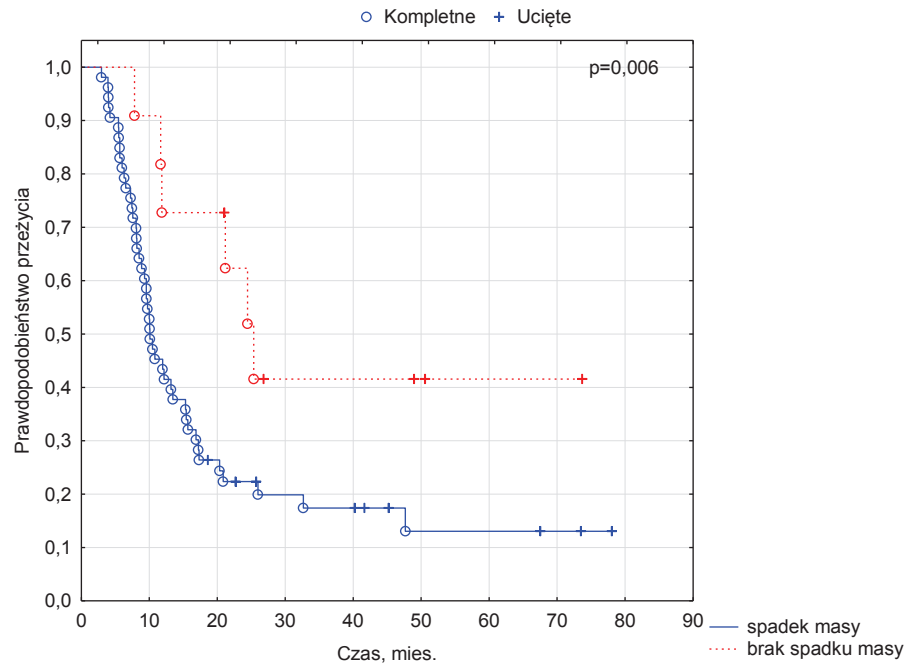
Porównano obie grupy pod kątem czasu przeżycia i czasu wolnego od wznowy choroby. Stwierdzono, że w grupie chorych, które nie straciły wagi ciała pomiędzy PDS a chemioterapią, czas OS ($p=0,01$) oraz PFS ($p=0,006$) są istotnie dłuższe w porównaniu z grupą, u której doszło do utraty wagi w analogicznym okresie (ryc. 6, ryc. 7).



Ryc. 6. Czas całkowitego przeżycia (OS) w zależności od utraty wagi ciała między zabiegiem operacyjnym a chemioterapią

Fig. 6. Overall survival (OS) depending on weight loss between the PDS and chemotherapy (spadek masy – weight loss; brak spadku masy – without weight loss)

czas – czas obserwacji w miesiącach / observation time in months



Ryc.7. Czas wolny od progresji choroby (PFS) w zależności od utraty wagi ciała między zabiegiem operacyjnym a chemioterapią

Fig. 7. PFS depending on weight loss between the PDS and chemotherapy (spadek masy – weight loss; brak spadku masy – without weight loss)

czas – czas obserwacji w miesiącach / observation time in months

4.1.5 Wskaźnik masy ciała BMI (*Body Mass Index*)

Oceniono BMI przed operacją u 56 chorych. Dla pozostałych pacjentek nie uzyskano danych dotyczących wzrostu. Mediana BMI wynosiła 25,12 (zakres 16,53-36,73). Wartość BMI poniżej i powyżej mediany nie korelowała ze stopniem uzyskiwanej cytoredukcji ($p=0,1$) (tabela 9). Nie stwierdzono również wpływu przedoperacyjnego BMI na OS ani PFS w badanej grupie.

Tabela 9. Zależność między BMI przed zabiegiem operacyjnym a wynikiem cytoredukcji

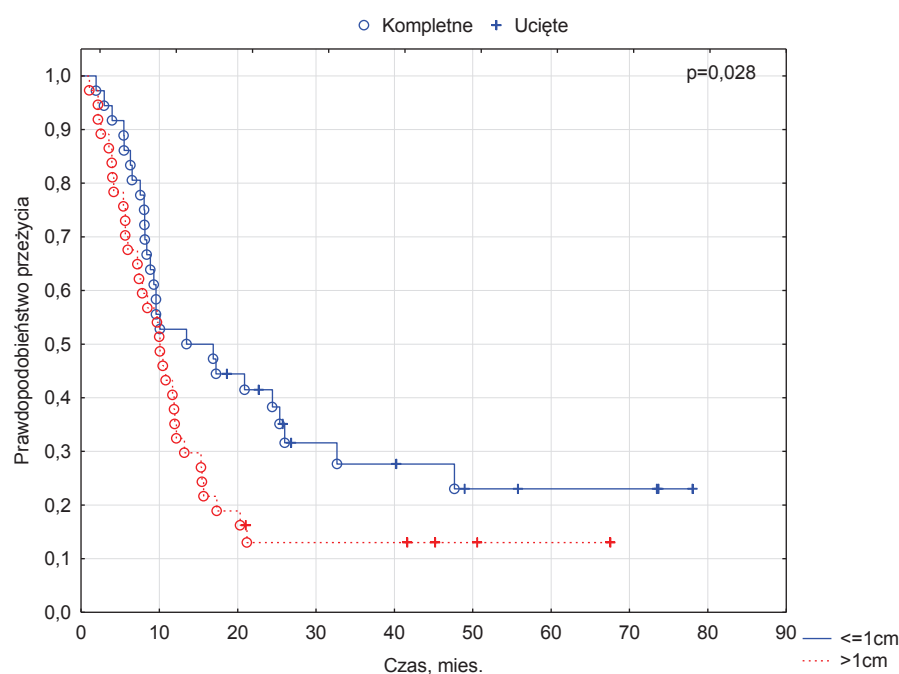
Table 9. The relationship between preoperative BMI and the result of PDS

BMI przed PDS (mediana 25,12)	p=0,10781		
	R≤ 1cm	R>1 cm	Wiersz razem
≥ 25,12	17	11	28
<25,12	10	18	28
Ogółem	27	29	56

4.1.6 Optymalna cytoredukcja

Optymalną cytoredukcję ($R \leq 1$ cm) osiągnięto w 36 przypadkach, co stanowi 49,4% badanej grupy. Cytoredukcję nieoptymalną ($R > 1$ cm) uzyskano u 37 chorych, w 50,6%.

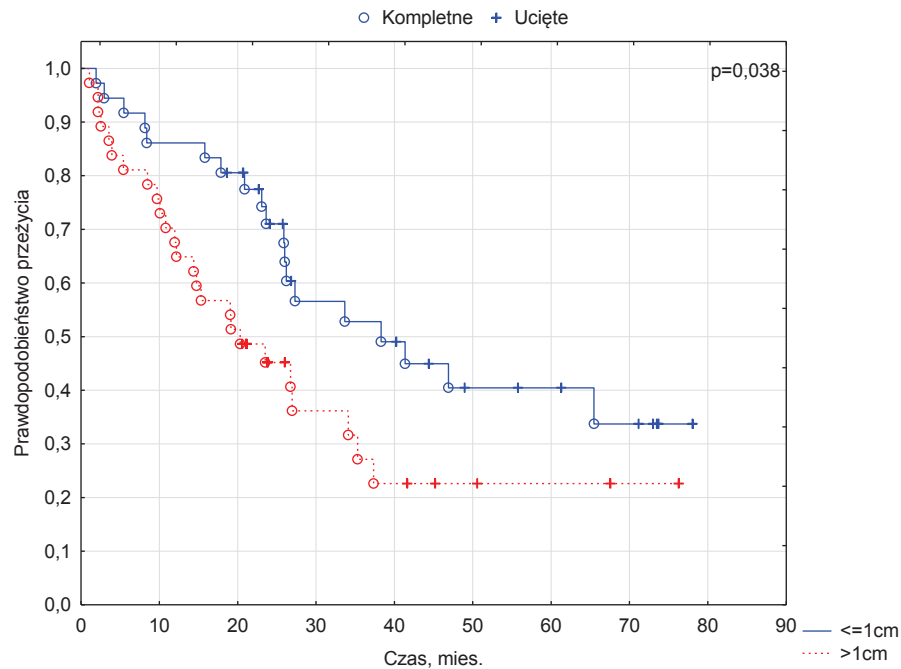
Wykazano, że uzyskanie cytoredukcji optymalnej w sposób istotny wpływa na wydłużenie czasu PFS ($p=0,028$) i OS ($p=0,038$). Odsetek pięcioletnich przeżyć w grupie z $R \leq 1$ cm wynosił 40%, natomiast w grupie z $R > 1$ cm – 22%. (ryc. 8, ryc. 9).



Ryc. 8. Czas wolny od progresji choroby (PFS) w zależności od wyniku cytoredukcji

Fig. 8. PFS depending on the result of PDS

czas – czas obserwacji w miesiącach / observation time in months



Ryc. 9. Czas przeżycia (OS) w zależności od wyniku cytoredukcji

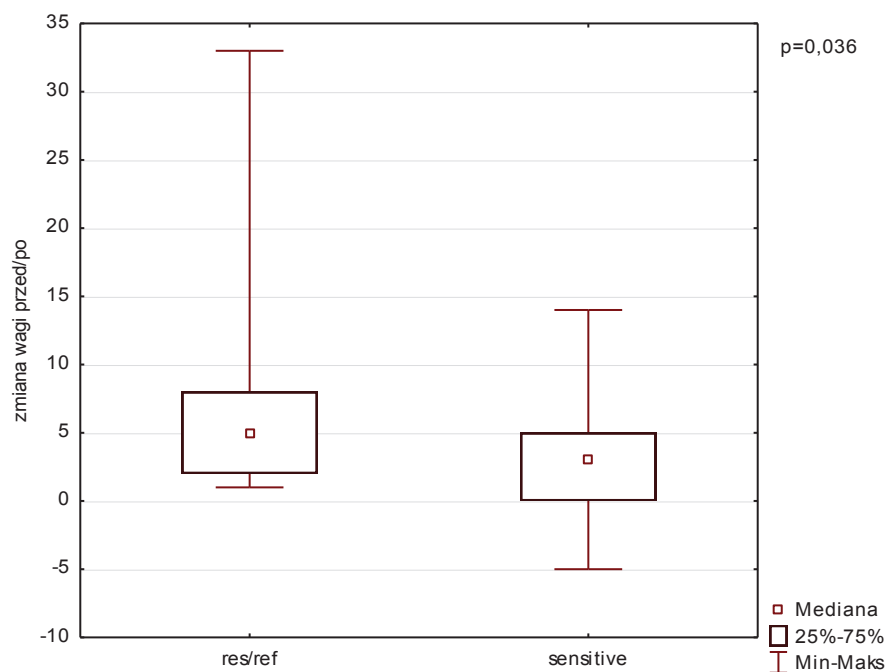
Fig. 9. OS depending on the result of PDS

czas – czas obserwacji w miesiącach / observation time in months

4.1.7 Ocena związku między utratą wagi ciała pomiędzy operacją pierwotną a pierwszym cyklem chemioterapii z opornością na platynę

Pacjentki podzielono na dwie grupy: wrażliwe na chemioterapię (*sensitive*), oraz odporne na chemioterapię (*resistance*) według kryteriów opisanych w rozdziale Materiał i metoda.

Stwierdzono, że w grupie opornych na platynę ($n=21$), wszystkie chore straciły na wadze w okresie pomiędzy pierwotną operacją cytoredukcyjną a pierwszym cyklem chemioterapii. Mediana utraty wagi ciała wyniosła w tej grupie 5 kg (zakres utraty wagi 1- 33 kg). Wśród pacjentek wrażliwych na platynę ($n=43$) mediana zmiany wagi ciała wyniosła -3,5 kg (zakres zmiany od 5 do -14 kg). Różnica jest istotna statystycznie ($p= 0,03$) (ryc. 10).



Ryc. 10. Związek utraty wagi ciała między operacją a chemioterapią i odpowiedzią na chemioterapię

Fig. 10. The response to chemotherapy depending on weight loss between the PDS and the first dose of chemotherapy

4.1.8 Poziom antygenu CA 125 przed leczeniem

U 70 chorych oznaczono przed leczeniem operacyjnym poziom CA 125 w surowicy krwi. Mediana CA 125 wyniosła 836,5 IU/ ml (zakres 6,8-25000).

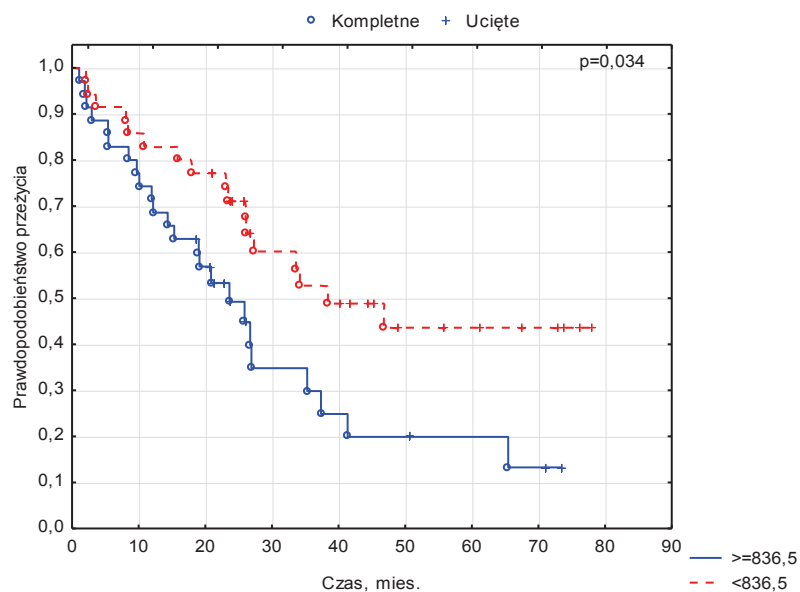
Poziom CA 125 wykazywał istotny związek ze stopniem zaawansowania klinicznego ($p=0,00073$; $r=0,394$).

Mediana CA 125 dla stopnia FIGO I wyniosła 133,5 IU/ ml (zakres 6,8-2086,0), dla stopnia II – 400 (1 chora), stopnia III – 980 (zakres 52,7-25000), IV – 1418 (zakres 96,0-2740,0).

W grupie pacjentek z wczesnym stopniem zaawansowania (FIGO I i II) mediana CA 125 wyniosła: 167 (zakres 6,8-2086); natomiast u chorych w późnym stadium choroby (FIGO III i IV) była znamienne wyższa i wyniosła 980 (zakres 52,7-25000) ($p=0,000072$).

Wartość przedoperacyjnego CA 125 miała negatywne znaczenie prognostyczne.

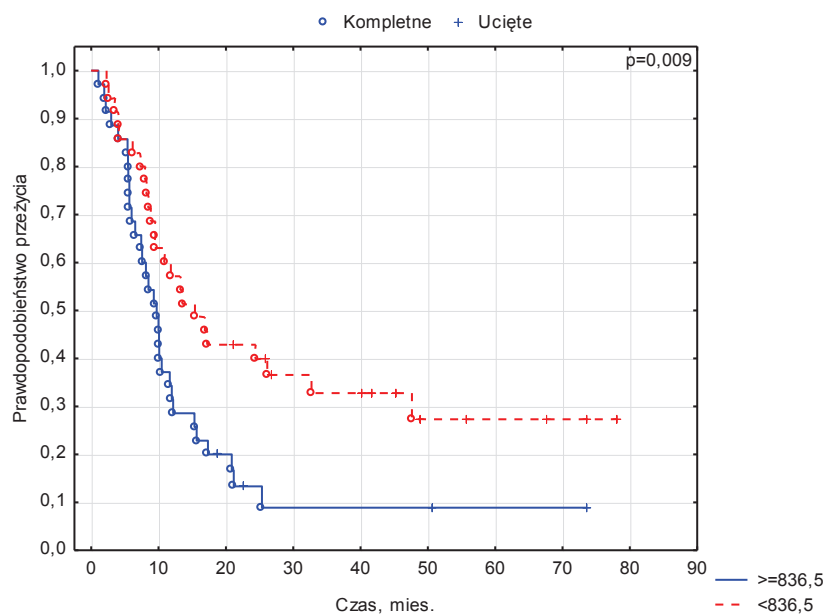
W grupie chorych z CA 125 poniżej 836,5, mediana czasu do wystąpienia wznowy wyniosła 16 miesięcy, 5-letnie przeżycia – 42%. W grupie powyżej mediany stężenia CA 125 – mediana PFS wyniosła 10 miesięcy, przeżycia 5-letnie – 19%.



Ryc. 11. Czas całkowitego przeżycia (OS) zależnie od przedoperacyjnej wartości CA 125

Fig 11. Overall survival depending on the preoperative serum CA 125 level

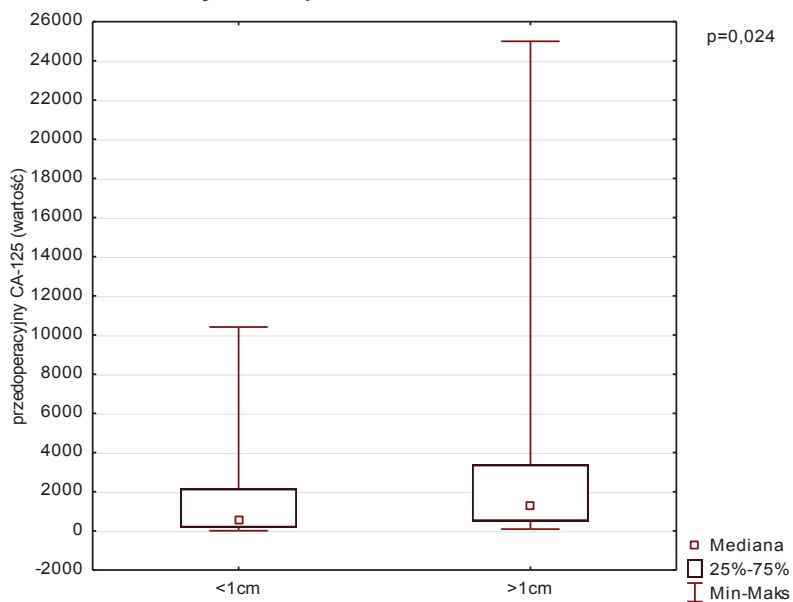
czas – czas obserwacji w miesiącach / observation time in months



Ryc. 12. Czas wolny od progresji (PFS) zależnie od przedoperacyjnej wartości CA 125

Fig 12. Progression free survival (PFS) depending on the preoperative serum CA 125 level

czas – czas obserwacji w miesiącach / observation time in months



Ryc. 13. Stopień uzyskiwanej cytoredukcji zależnie od przedoperacyjnej wartości CA 125

Fig. 13. Result of PDS depending on the preoperative serum CA 125 level

Oceniono związek pomiędzy poziomem CA 125 a stopniem cytoredukcji, uzyskiwanej podczas operacji pierwotnej. Stwierdzono, że w grupie chorych z nieoptymalną cytoredukcją ($R > 1$ cm) był on istotnie wyższy ($p = 0,02$). Mediana CA 125 w tej grupie wyniosła 1315 IU/ml, podczas gdy w grupie, w której osiągnięto optymalną cytoredukcję ($R \leq 1$ cm), mediana CA 125 wyniosła 577 IU/ml (ryc. 13).

4.1.9 Stopień zaawansowania klinicznego choroby według FIGO

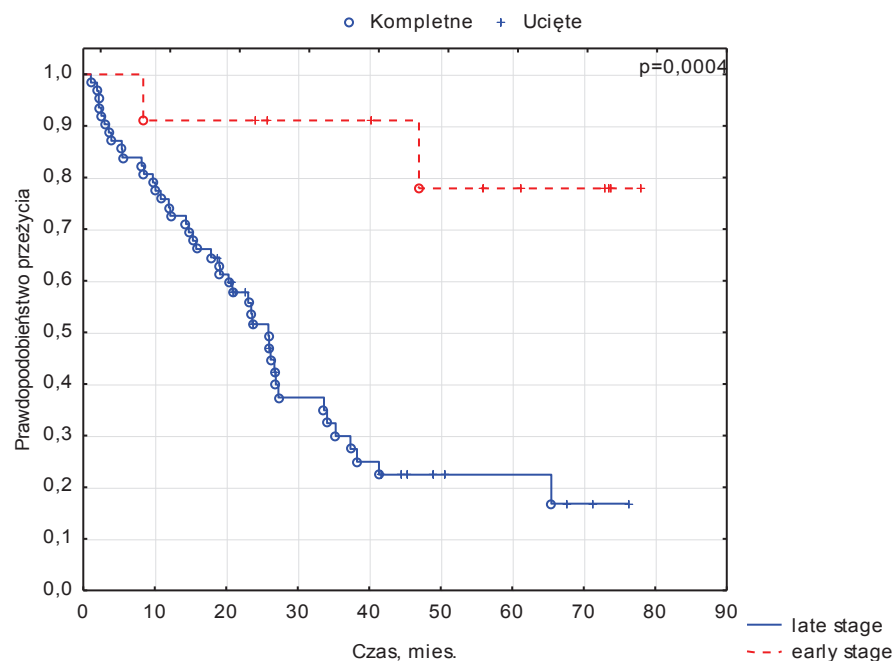
Tabela 10. Rozkład stopni zaawansowania wg FIGO w badanej grupie

Table 10. Distribution of FIGO stages in the study group.

Stopień zaawansowania	Liczba	%
1. wczesny (FIGO I i II)	11	15,06
2. późny (FIGO III i IV)	62	84,94

Stwierdzono istotne różnice pomiędzy wynikami 5-letnich przeżyć chorych z wczesnym i późnym stadium choroby (78% vs 22%, $p = 0,0043$), (ryc.14).

W chwili zakończenia obserwacji żyło 9 chorych z grupy 1) oraz 20 chorych z grupy 2).



Ryc. 14. Przeżycia całkowite chorych zależnie od stopnia zaawansowania FIGO

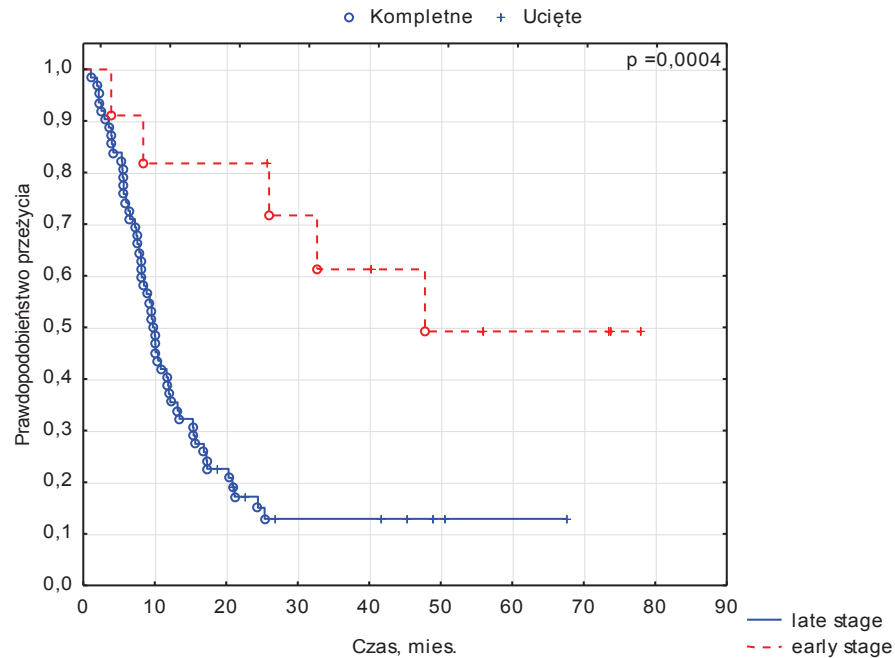
Fig. 14. Overall survival in study group depending on FIGO stage at diagnosis.

(early stage – FIGO I/ II; late stage – FIGO III/ IV)

czas – czas obserwacji w miesiącach / observation time in months

W grupie 1) do wznowy doszło w 5 przypadkach (45%). W grupie 2) wystąpiła u 53 chorych (85%), mediana PFS wyniosła 10 miesięcy.

Różnica była istotna statystycznie ($p=0,0004$) (ryc. 15).



Ryc. 15. Czas wolny od progresji choroby zależnie od stopnia zaawansowania FIGO

Fig. 15. PFS in study group depending on FIGO stage at diagnosis.

(early stage – FIGO I/II; late stage - FIGO III/IV)

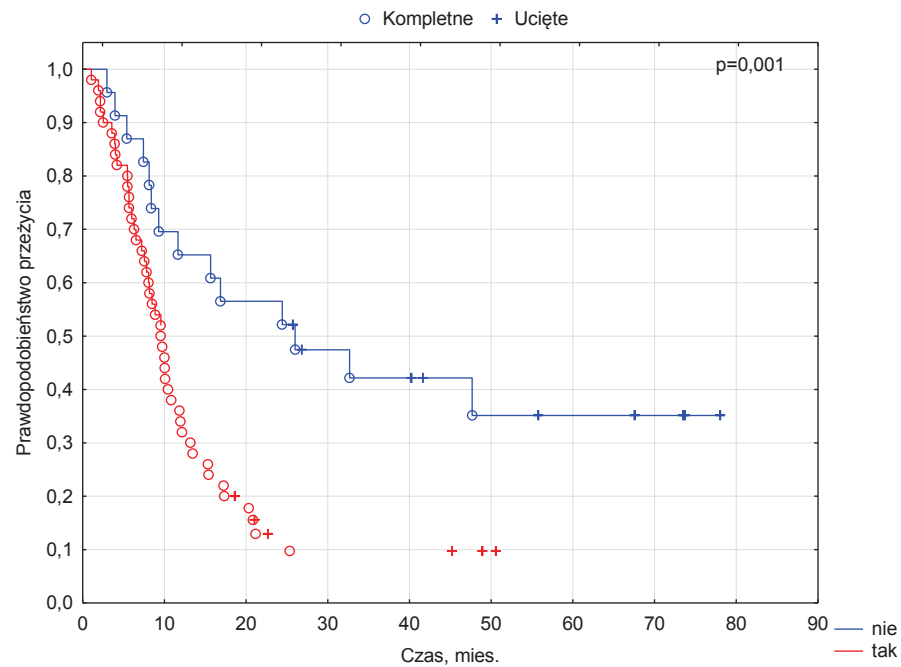
czas – czas obserwacji w miesiącach / observation time in months

4.1.10 Wodobrzusze

Wodobrzusze rozpoznano u 50 chorych. Oceniono związek między występowaniem wodobrzusza a długością PFS i OS. Wykazano, że w grupie chorych z wodobrzuszem przeżycia całkowite ($p=0,00013$) oraz czas wolny od progresji ($p=0,001$) były znacząco krótsze (ryc. 16, ryc. 17).

W grupie chorych z wodobrzuszem: wznova wystąpiła w 44 przypadkach (88%), mediana PFS wyniosła 9,57 miesiąca, mediana OS – 22,19 miesiąca.

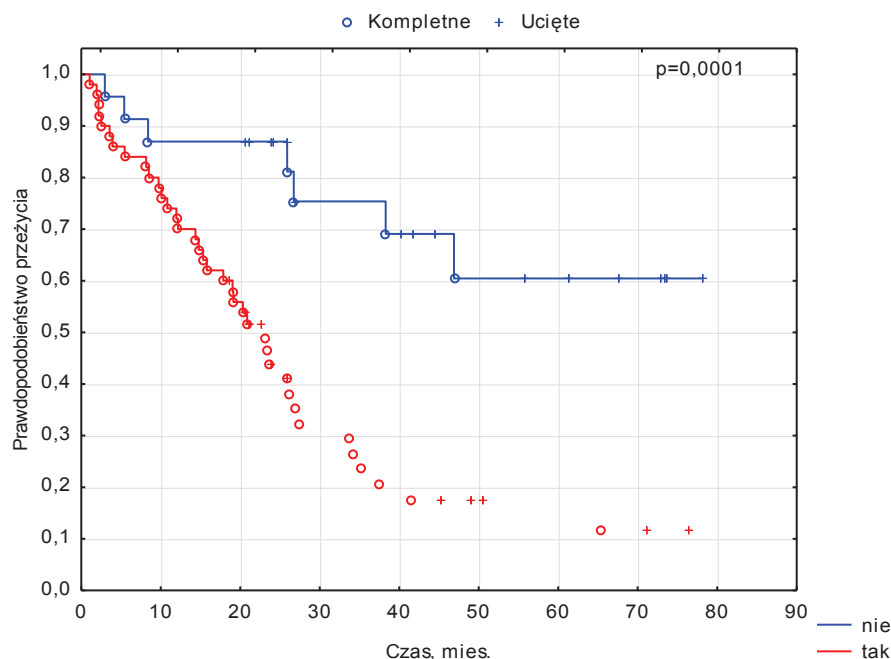
W grupie bez wodobrzusza: wznova wystąpiła u 14 chorych (60%), mediana PFS wyniosła 25,15 miesiąca. Ze względu na zbyt małą liczbę przypadków, nie określano mediany OS.



Ryc. 16. Związek między występowaniem wodobrzusza a PFS

Fig. 16. The relationship between occurring of ascites and PFS

czas – czas obserwacji w miesiącach / observation time in months



Ryc. 17. Związek między występowaniem wodobrzusza a OS

Fig. 17. The relationship between occurring of ascites and OS

czas – czas obserwacji w miesiącach / observation time in months

4.1.11 Liczba neutrocytów i limfocytów w surowicy krwi oraz wskaźnik neutrocytarno-limfocytarny przed operacją pierwotną

U wszystkich chorych dokonano przedoperacyjnej oceny liczby neutrocytów (mediana 7,45 tys./mm³, zakres 2,56-20,36 tys./mm³), limfocytów (mediana 1,35 tys./mm³; zakres 0,34-3,57 tys./mm³) oraz określono wskaźnik neutrocytarno-limfocytarny – mediana 4,83 (zakres 0,72-59,88.)

Zbadano znaczenie prognostyczne tych parametrów, przyjmując za punkt odcięcia medianę liczebności każdej z populacji badanych leukocytów.

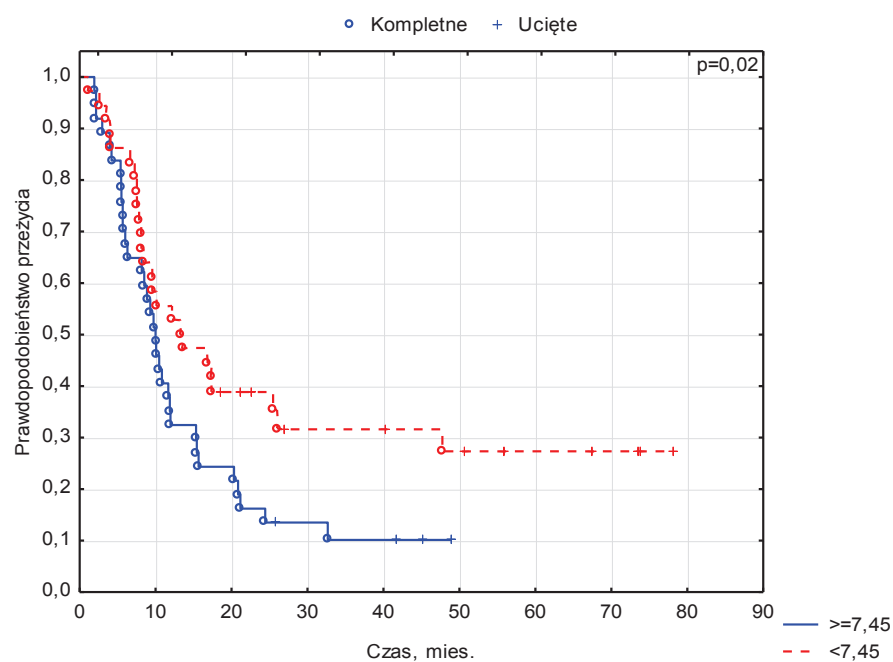
Grupa powyżej mediany liczby neutrocytów: mediana OS – 23,84 miesiąca; mediana PFS – 9,87 miesiąca.

Grupa poniżej mediany liczby neutrocytów: mediana OS – 27,76 miesiąca; mediana PFS – 13,2 miesiąca.

Czas przeżycia pacjentek i czas wolny od wznowy choroby różnią się istotnie statystycznie w grupie chorych mających poziom neutrocytów poniżej i po-

wyżej mediany (ryc. 18 i 19); pacjentki z liczbą neutrocytów przekraczającą wartość mediany żyją krócej. Różnica OS wyniosła 3,92 miesiąca ($p=0,04$). Różnica PFS – 3,33 miesiąca ($p=0,02$).

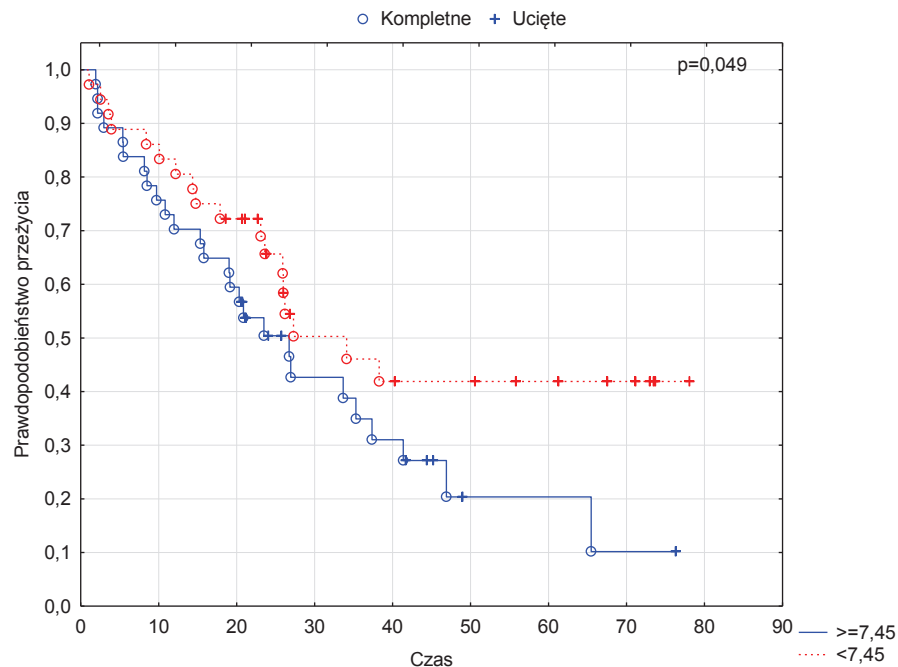
Nie wykazano istotnej zależności między przedoperacyjnym poziomem limfocytów a PFS ($p=0,28$) i OS ($p=0,39$).



Ryc. 18. PFS w zależności od przedoperacyjnego poziomu neutrocytów

Fig. 18. PFS depending on preoperative neutrophil level

czas – czas obserwacji w miesiącach / *observation time in months*

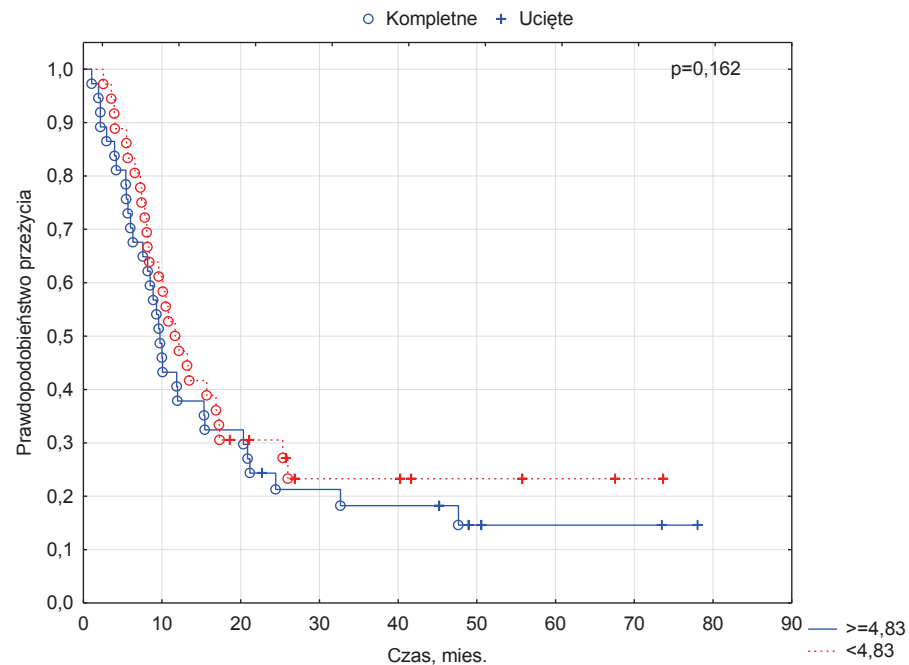


Ryc. 19. OS w zależności od przedoperacyjnego poziomu neutrocytów

Fig. 19. OS depending on preoperative neutrophil level

czas – czas obserwacji w miesiącach / observation time in months

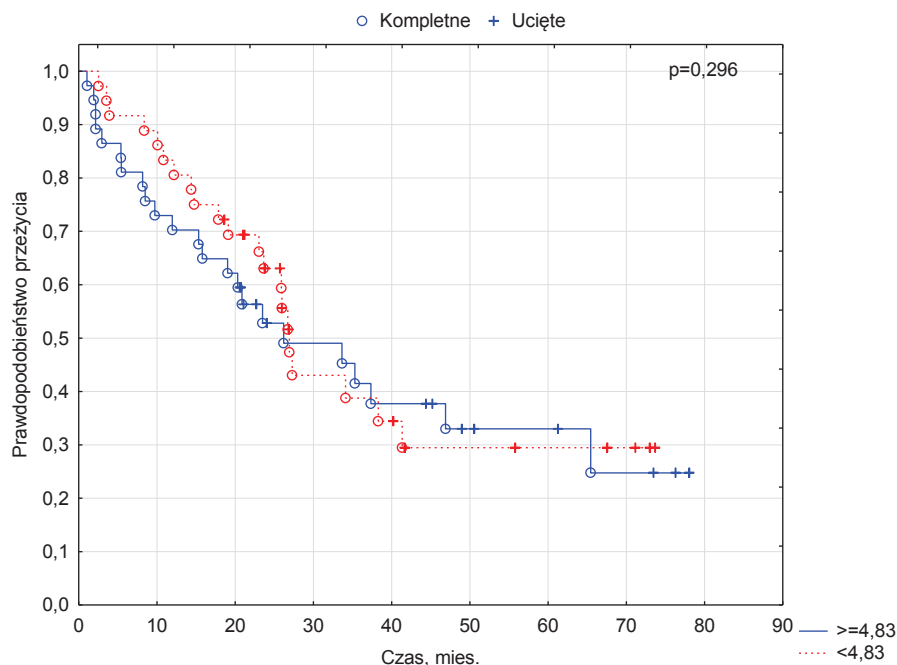
Zbadano również znaczenie prognostyczne wskaźnika neutrocytarno-limfocytarnego, określonego jako stosunek neutrocytów do limfocytów w surowicy krwi pacjentek. Mediana tego wskaźnika wyniosła 4,83 (zakres 0,72-59,88). Nie stwierdzono, aby PFS ($p=0,16$) i OS ($p=0,29$) w grupie chorych powyżej i poniżej mediany różniły się w sposób istotny (ryc. 20, ryc.21).



Ryc. 20. Czas wolny od progresji choroby w zależności od wskaźnika neutrocytarno-limfocytarnego

Fig. 20. Progression free survival depending on neutrophil-lymphocyte ratio

czas – czas obserwacji w miesiącach / observation time in months

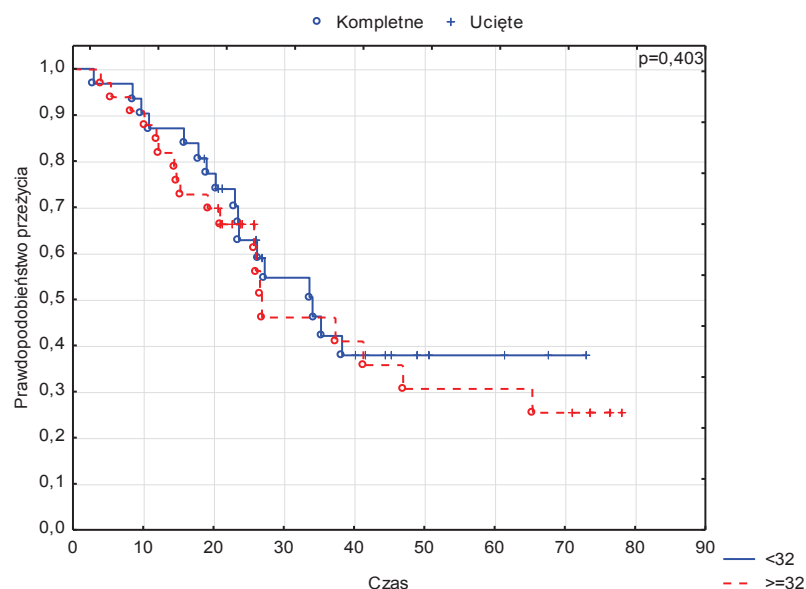


Ryc. 21. Przeżycia całkowite zależnie od wartości wskaźnika neutrocytarno-limfocytarnego
 Fig. 21. Overall survival depending on the neutrophil- lymphocyte ratio
 czas – czas obserwacji w miesiącach / observation time in months

4.1.12 Czas oczekiwania od zabiegu do pierwszego cyklu chemioterapii

Chemioterapii adiuwantowej poddano 64 z grupy 73 badanych chorych (87,6%). Mediana czasu oczekiwania od dnia zabiegu operacyjnego do podania pierwszego cyklu chemioterapii wyniosła 32 dni (zakres: 7-155 dni). Pacjentki oczekujące najdłużej, otrzymały chemioterapię po 149 i 155 dniach. U jednej z nich w przebiegu pooperacyjnym wystąpiła zakrzepica żylna, u drugiej – zawał mięśnia sercowego. Zdarzenia wymusiły wydłużenie czasu oczekiwania. Poza tymi chorymi, najdłuższy czas oczekiwania wyniósł 73 dni i wynikał ze stanu ogólnego chorej po zabiegu operacyjnym, który uniemożliwiał wcześniejsze rozpoczęcie leczenia uzupełniającego.

Nie wykazano, aby chore, niezależnie od stopnia uzyskanej cytoredukcji (podczas PDS), które otrzymały chemioterapię w czasie krótszym od zabiegu operacyjnego niż mediana, miały dłuższy PFS ($p=0,14$) lub OS ($p=0,40$) (ryc. 22).

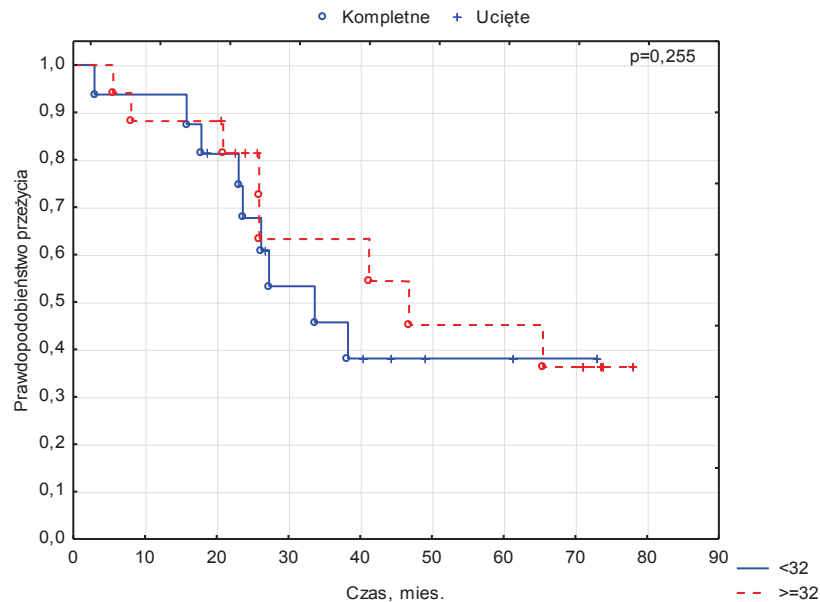


Ryc. 22. OS w zależności od liczby dni między operacją a rozpoczęciem chemioterapii

Fig. 22. OS depending on the number of days between the PDS and the first dose of chemotherapy

czas – czas obserwacji w miesiącach/ observation time in months

Oceniono znaczenie czasu oczekiwania na chemioterapię w grupie chorych, u których osiągnięto cytoredukcję $R \leq 1$ cm. Chore, które rozpoczęły leczenie w czasie poniżej i powyżej mediany, nie różnią się między sobą czasem wolnym od progresji choroby PFS ($p = 0,46$), ani czasem całkowitego przeżycia OS ($p = 0,25$) (ryc. 23).



Ryc. 23. OS w zależności od liczby dni między operacją a rozpoczęciem chemioterapii w grupie chorych poddanych cytoredukcji optymalnej $R \leq 1$ cm

Fig. 23. OS depending on the number of days from surgery to first dose of chemotherapy for patients with PDS result $R \leq 1$ cm

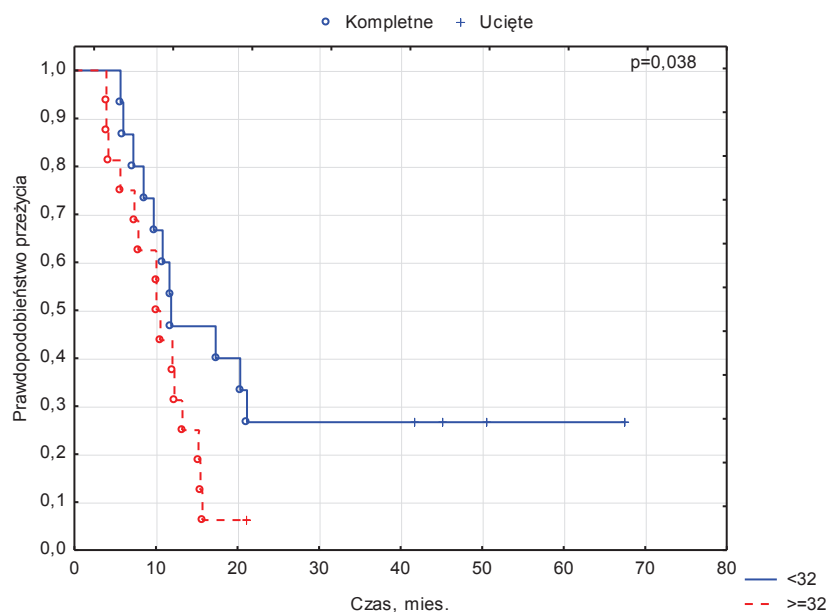
czas – czas obserwacji w miesiącach/ observation time in months

W grupie chorych $R > 1$ cm wykazano, że czas oczekiwania na chemioterapię wpływa w sposób istotny na czas wolny od progresji choroby ($p = 0,03$) (ryc. 24). Mediana czasu PFS u chorych, które otrzymały chemioterapię w czasie poniżej mediany, wynosiła 11,77 miesięcy, natomiast wśród chorych, które otrzymały pierwszy cykl po czasie dłuższym niż 32 dni – 10,1 miesięcy. Wykazano również, że chore, które otrzymały chemioterapię wcześniej, żyją dłużej, jednak różnica nie jest istotna statystycznie ($p = 0,17$) (ryc. 25) Mediana OS dla chorych, które otrzymały chemioterapię po czasie dłuższym niż 32 dni wyniosła 19,13 miesiąca. Chore, które otrzymały leczenie w czasie krótszym niż 32 dni-żyły 32,58 miesiąca (tabela 11).

Tabela 11. PFS i OS w grupie chorych R> 1 cm w zależności od liczby dni od operacji do rozpoczęcia chemioterapii

Table 11. PFS and OS for patients with PDS result R> 1 cm depending on the number of days between PDS and the first dose of chemotherapy.

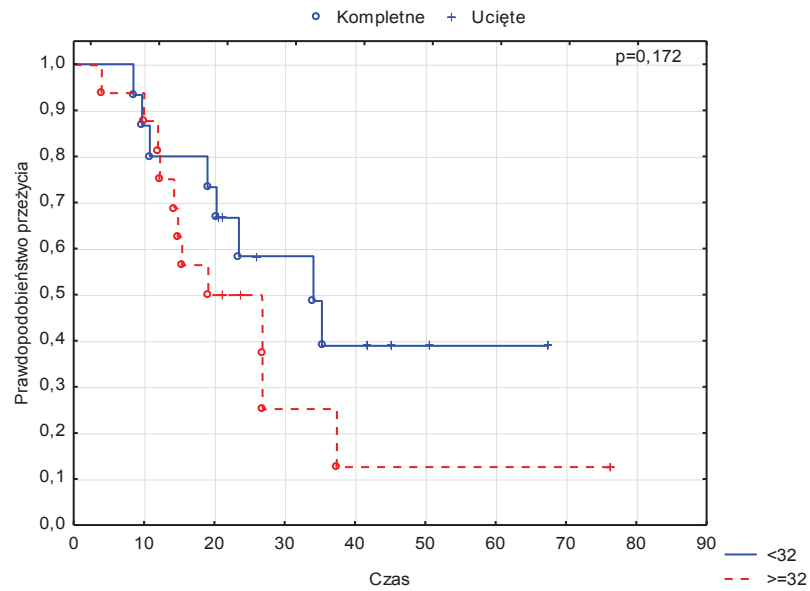
	<32 dni	≥32 dni	P
PFS	11,77	10,1	*0,03
OS	19,13	32,58	0,17



Ryc. 24. PFS w zależności od liczby dni między operacją a rozpoczęciem chemioterapii w grupie chorych poddanych cytoredukcji suboptymalnej R> 1 cm

Fig. 24. PFS depending on the number of days from PDS to first dose of chemotherapy for patients with PDS result R> 1 cm

czas – czas obserwacji w miesiącach/ observation time in months



Ryc. 25. OS w zależności od liczby dni między operacją a rozpoczęciem chemioterapii w grupie chorych poddanych cytoredukcji suboptymalnej $R > 1$ cm

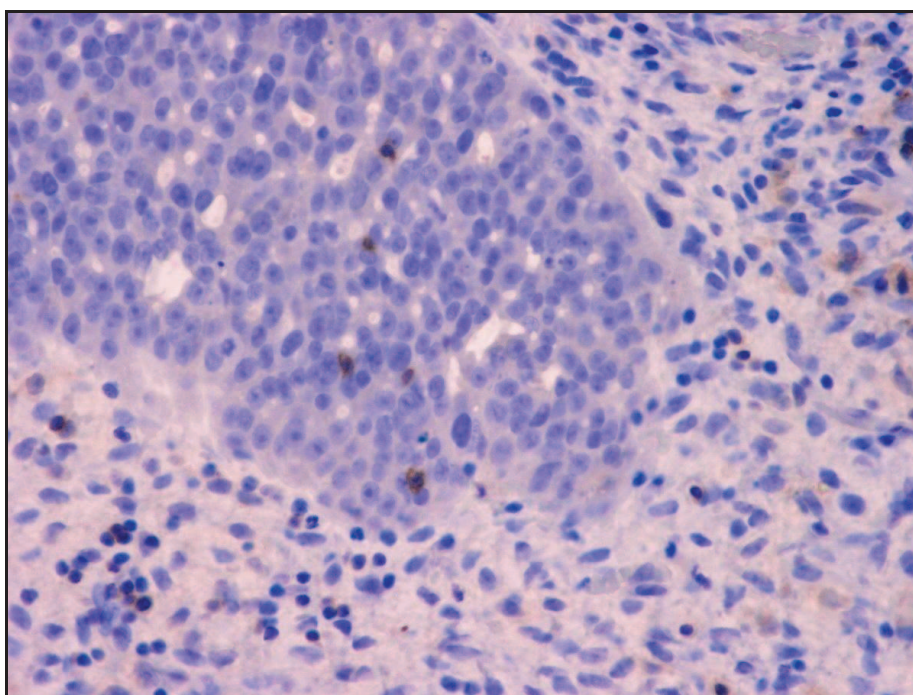
Fig. 25. OS depending on the number of days from PDS to first dose of chemotherapy for patients with PDS result $R > 1$ cm

czas – czas obserwacji w miesiącach/ observation time in months

4.2 Komórki immunokompetentne w mikrośrodowisku HGSOE

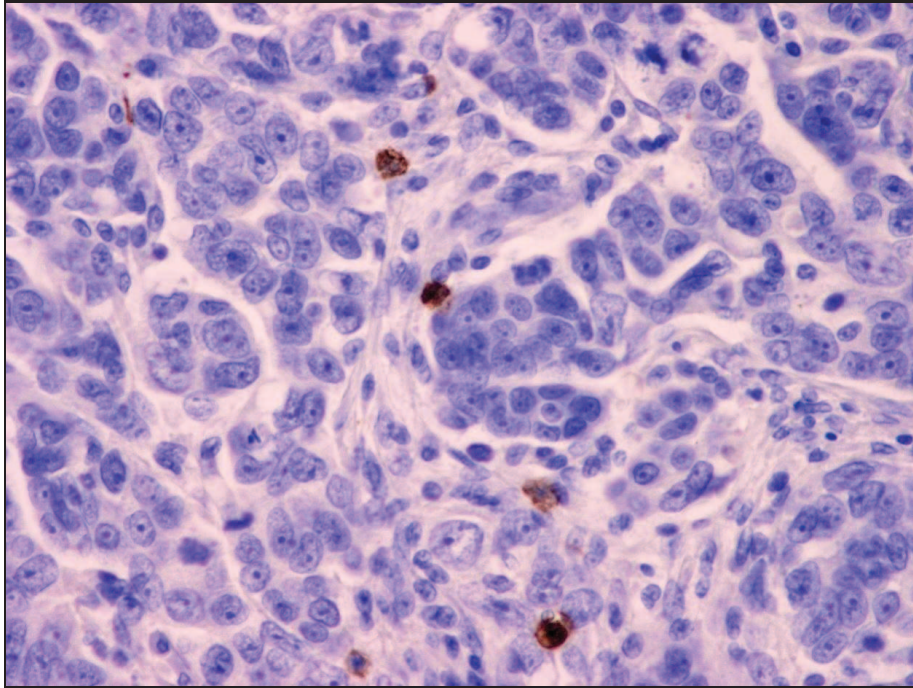
4.2.1 Komórki efektorowe CD4+ i CD8+

Limfocyty T CD4+ i CD8+ obecne były zarówno w gniazdach komórek rakowych, jak i w mezenchymalnym podścielisku. Ryciny 26 i 27 przedstawiają oba typy limfocytów T naciekające gniazdo komórek rakowych (*TILs*).



Ryc. 26. Limfocyty T CD4+ naciekające ognisko komórek rakowych

Fig. 26. *Lymphocytes T CD4+ infiltrating the nest of cancer cells*



Ryc. 27. Limfocyty T CD8+ naciekające ognisko komórek rakowych
Fig. 27. Lymphocytes T CD8+ infiltrating the nest of cancer cells

Mediana limfocytów CD4+ przypadających na pojedyncze pole widzenia (HPF) w gnieździe raka wynosiła 5,00 (zakres 0,33-26,33).

Mediana limfocytów CD8+ przypadających na pojedyncze pole widzenia (HPF) w gnieździe raka była wyższa i wynosiła 12,33 (zakres 1,00-53,33).

4.3 Egfl7 w HGSOC

W grupie 63 pacjentek z potwierdzoną endogenną ekspresją Egfl7 w komórkach HGSOC, przeprowadzono podział na dwie podgrupy, w oparciu o medianę ekspresji Egfl7 (HSCORE – 100) którą użyto jako punkt odcięcia.

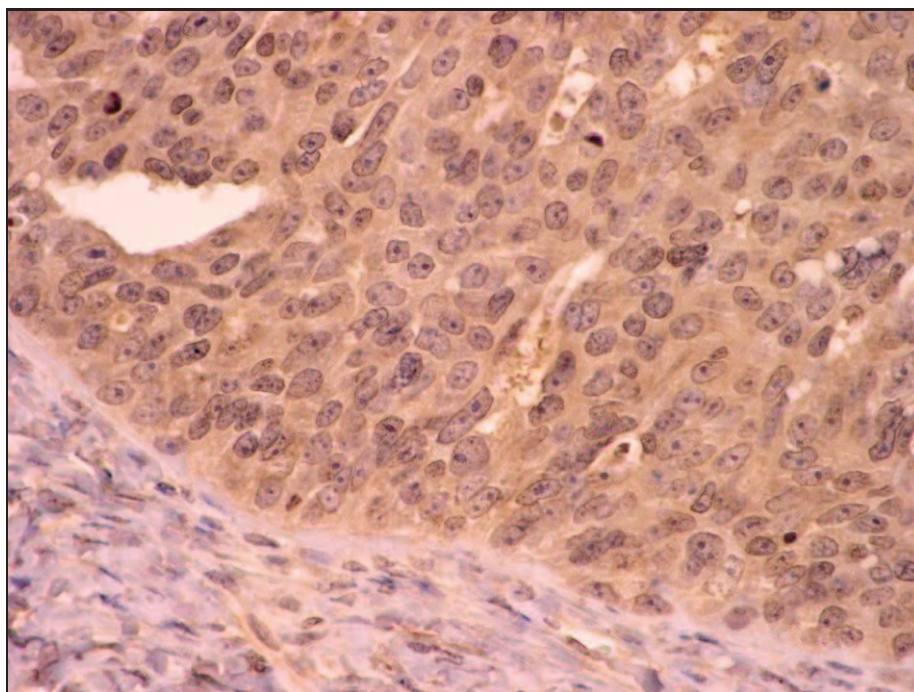
Pacjentki, u których ekspresja przekraczała wartość mediany, zostały określone jako Egfl7+ (dodatni) z wysoką ekspresją (highEgfl7+), natomiast chore z ekspresją poniżej wartości mediany, zostały uznane jako Egfl7+ (dodatni) z niską ekspresją (lowEgfl7+).

4.3.1 Ekspresja Egfl 7 w tkance HGSOE

Przeprowadzone barwienia immunohistochemiczne wykazały obecność ekspresji Egfl7 w pierwotnym HGSOE u 63 chorych (63 z 72; 87,5%). W pozostałych 9 przypadkach ekspresja była nieobecna (9 z 72, 12,5%).

Ekspresja Egfl7 występuje głównie w komórkach rakowych, oraz sporadycznie w komórkach podścieliska.

Rakowa endogenna ekspresja Egfl7 miała charakter błonowo-cytoplazmatyczny, a w części przypadków również jądrowy (ryc. 28 i ryc. 29).

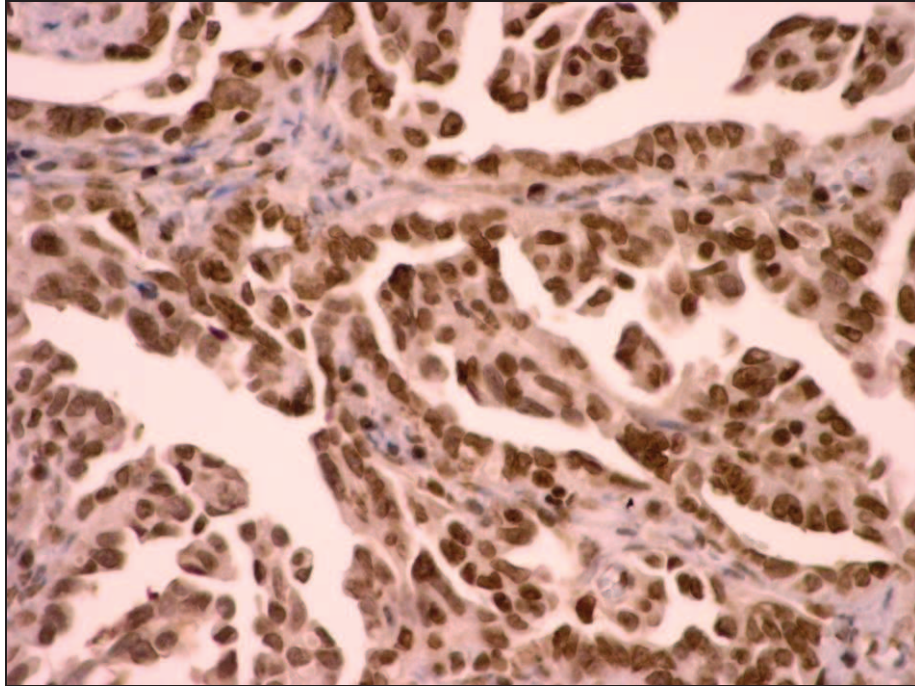


Ryc. 28. Ekspresja cytoplazmatyczna Egfl7 w komórkach HGSOE

Fig. 28. The cytoplasmic expression of Egfl7 in HGSOE cells

Do oceny poziomu ekspresji cytoplazmatycznej wykorzystano metodę jakościowo-ilościową HSCORE, opisaną w rozdziale Materiał i metoda.

Mediana intensywności ekspresji cytoplazmatycznej Egfl7 określona za pomocą HSCORE, w badanej grupie Egfl7+ wyniosła 100 (zakres 30-220).



Ryc. 29. Cytoplazmatyczna i jądrowa ekspresja Egfl7 w komórkach HGSOC

Fig. 29. Cytoplasmic and nuclear expression of Egfl7 in HGSOC cells

4.3.2 Związek Egfl7 z cechami kliniczno-patologicznymi

Nie stwierdzono korelacji pomiędzy stopniem cytoplazmatycznej ekspresji Egfl7 a: wiekiem chorych w momencie operacji pierwotnej ($r=0,129$), statusem hormonalnym kobiety, występowaniem wodobrzusza, przedoperacyjnym poziomem CA 125 w surowicy chorej, resekcyjnością nowotworu, stopniem zaawansowania choroby, wrażliwością na platynę podczas chemioterapii I rzutu, liczbą neutrocytów i limfocytów obecnych we krwi obwodowej bezpośrednio przed operacją oraz liczebnością limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ i pomocniczych CD4⁺ naciekających gniazda komórek rakowych HGSOC (tabela 12).

Tabela 12. Związek cytoplazmatycznej ekspresji Egfl7 z wybranymi cechami kliniczno –
patologicznymi w badanej grupie (n=63)

Table 12. The relationship of cytoplasmic expression of Egfl7 with clinico-pathological features in
study group (n=63)

Cecha kliniczno-patologiczna	Egfl7+ HSCORE	*P
Wiek w momencie rozpoznania	-0,135	0,291
Menopauza (TAK)	-0,196	0,123
Obecność wodobrzusza	0,021	0,869
Poziom CA 125	0,157	0,226
Cytoredukcja optymalna R≤1 cm TAK	0,027	0,836
Stadium zaawansowania (wczesne/późne)	0,039	0,757
Wrażliwość na platynę (tak/nie)	-0,058	0,672
Liczba neutrocytów	0,197	0,122
Liczba limfocytów	-0,115	0,369
CD4+ w gnieździe HGSOE (liczba)	-0,182	0,153
CD8+ w gnieździe HGSOE (liczba)	-0,118	0,359

*Zastosowano test rang Spearmana

4.3.3 Znaczenie cytoplazmatycznej ekspresji Egfl7+ i jej wartość prognostyczna

Wysoce dodatnia ekspresja Egfl7 (powyżej 100-HSCORE) wystąpiła w 29 z 63 (46%) guzów HGSOE Egfl7+, co stanowiło 39,72% całej badanej grupy, natomiast niska (lowEgfl7+) w 34 z 63 (54%) tkanek HGSOE Egfl7+, stanowiąc 47,2% całej badanej grupy..

Sprawdzono, czy pacjentki z wysoką i niską intensywnością ekspresji Egfl7 w HGSOE różnią się pomiędzy sobą wybranymi cechami kliniczno- patologicznymi, z uwzględnieniem porównania w obu grupach OS i PFS (tabela 13).

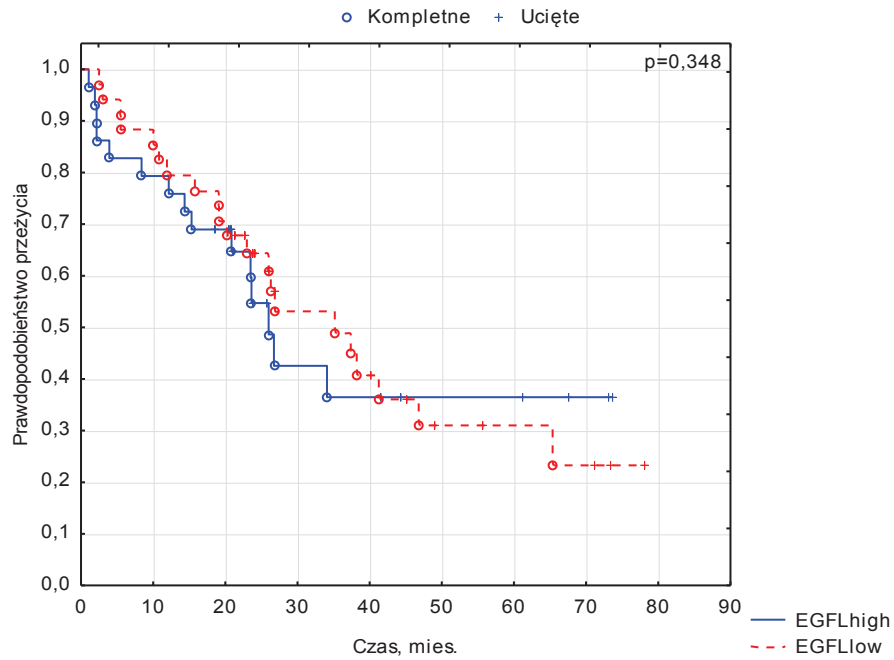
Tabela 13. Porównanie cech kliniczno-patologicznych pacjentek z niską i wysoką ekspresją cytoplazmatyczną Egfl7 (N=63)

Table 13. The comparison of clinico-pathological features in patients with low and high cytoplasmic of Egfl7 expression (N=63)

Cecha kliniczno-patologiczna	*LowEgfl7+ (n=34)	**HighEgfl7+ (n=29)	Metoda	p
Wiek w momencie rozpoznania (mediana)	59	60	UMW	0,492
Menopauza (TAK)	26	32	Fisher	0,388
Obecność wodobrzusza	27	23	Fisher	0,141
Poziom CA 125(mediana)	813	893	UMW	0,678
Cytoredukcja optymalna R≤ 1 cm TAK	16	20	Fisher	0,642
Stadium zaawansowania (wczesne/ późne)	3/31	8/21	Fisher	0,194
Wrażliwość na platynę (TAK)	20	23	Fisher	1,00
Liczba neutrocytów*** (mediana)	7,51	6,81	UMW	0,763
Liczba limfocytów*** (mediana)	1,31	1,45	UMW	0,224
PFS (mediana)	10,83	12,02	FCOX	0,150
OS (mediana, miesiące)	25,8	27,9	FCOX	0,150
CD4+ (mediana)	5,00	5,00	UMW	0,886
CD8+(mediana)	13,33	12,33	UMW	0,155

*< mediana 100, **>mediana100, *** wyrażono w tys./mm³

Obie grupy porównano (tabela 13). Nie różnią się one istotnie statystycznie co do: wieku chorych, statusu hormonalnego wyrażonego występowaniem menopauzy w momencie rozpoznania choroby, obecności wodobrzusza, poziomu CA 125, liczby przypadków z optymalną cytoredukcją, wrażliwości na platynę, liczby neutrocytów i liczby limfocytów we krwi obwodowej, intensywności naciekania gniazd komórek rakowych przez limfocyty cytotoksyczne CD8+ i pomocnicze CD4+, całkowitego czasu przeżycia (OS) (ryc. 30) oraz czasu wolnego od progresji (PFS) (ryc. 31).

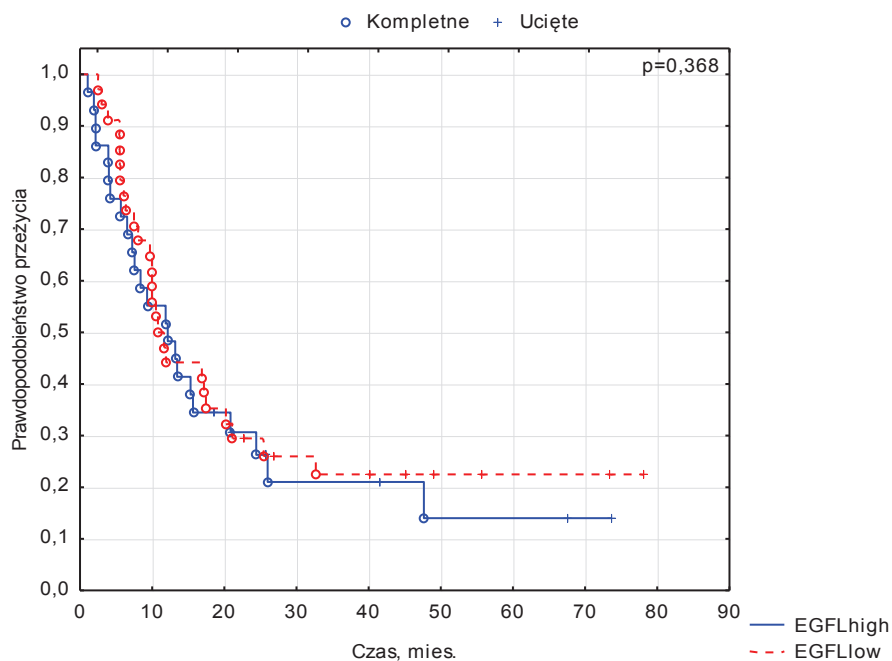


Ryc. 30. Całkowite przeżycia pacjentów w zależności od intensywności cytoplazmatycznej ekspresji Egfl7 w gnieździe HGSOc

Fig. 30. Overall survival depending on the strength of cytoplasmic Egfl7 expression in HGSOc

(EGFLhigh high Egfl7+; EGFLlow lowEgfl7+)

czas – czas obserwacji w miesiącach/ observation time in months



Ryc. 31. PFS pacjentów w zależności od intensywności cytoplazmatycznej ekspresji Egfl7+ w gnieździe HGSOC

Fig. 31. Progression free survival depending on the strength of cytoplasmic Egfl7+ expression in HGSOC (EGFLhigh high Egfl7+; EGFLlow lowEgfl7+)

czas – czas obserwacji w miesiącach/ observation time in months

4.3.4 Znaczenie ekspresji jądrowej Egfl7 w HGSOC

W grupie 63 chorych z cytoplazmatyczną ekspresją Egfl7, odnotowano 13 przypadków z odczynem jądrowym (13 z 63, 20,6%).

Porównano wybrane cechy kliniczno-patologiczne u chorych, których guzy pierwotne HGSOC poza dodatnim odczynem cytoplazmatycznym, wykazywały obecność ekspresji jądrowej (*Nucleus-positive + Cytoplasm-positive*; n= 13) z przypadkami z całkowitym brakiem ekspresji Egfl7 w komórkach raka (*Nucleus-negative + Cytoplasm-negative*; n=9) (tabela 14A); z przypadkami, u których w tkance raka nie było endogennej ekspresji jądrowej Egfl7, ale była obecna ekspresja cytoplazmatyczna (*Nucleus-negative + Cytoplasm-positive*; n=50) (tabela 14B) oraz z wszystkimi przypadkami bez ekspresji jądrowej, niezależnie czy odnotowano u nich rakową ekspresję cytoplazmatyczną Egfl7 (*Nucleus-negative + Cytoplasm-positive and negative*; n=59) (tabela 14C).

Tabela 14A. Porównanie cech kliniczno-patologicznych chorych z HGSOE Egfl7 *Nucleus-positive* + *Cytoplasm-positive* oraz Egfl7 *Nucleus-negative* + *Cytoplasm-negative*

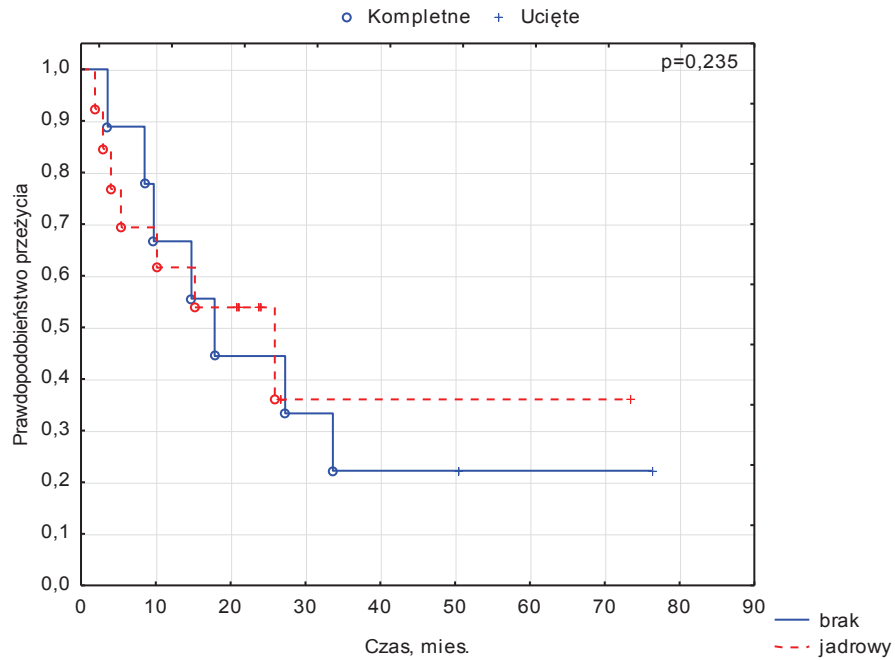
Table 14A. Comparison of clinico-pathological features of patients with HGSOE Egfl7 *Nucleus-positive* + *Cytoplasm-positive* and Egfl7 *Nucleus-negative* + *Cytoplasm-negative*

Cecha kliniczno-patologiczna	Egfl7 Jądro(+) Cytoplazma(+) (n=13)	Egfl7 Jądro(-) Cytoplazma(-) (n=9)	Metoda	p
Wiek w momencie rozpoznania	60	55	UMW	0,744
Status menopauzalny (tak)	10/13	8/9	Fisher	0,616
Obecność wodobrzusza	7/13	9/9	Fisher	0,046
Poziom CA 125(mediana)	2156,5	757,2	UMW	0,270
Cytoredukcja optymalna R≤1 cm	8/13	3/9	Fisher	0,387
Stadium zaawansowania (wczesne/późne)	2/11	0/9	Fisher	0,494
Wrażliwość na platynę (tak)	5/12	6/8	Fisher	0,197
Liczba neutrocytów* (mediana)	7,15	5,93	UMW	0,896
Liczba limfocytów* (mediana)	1,25	1,28	UMW	0,695
CD4+ (mediana)	6,0	5,6667	UMW	0,471
CD8+(mediana)	12,667	11,0	UMW	0,393

*wyrażono w tys./mm³

Pacjentki, u których komórki HGSOE wykazywały jądrową i cytoplazmatyczną ekspresję Egfl7 miały znacznie rzadziej wodobrzusze w porównaniu z kobietami nie posiadającymi w ogóle ekspresji Egfl7 (zarówno cytoplazmatycznej jak i jądrowej) w tkance rakowej (p=0,046).

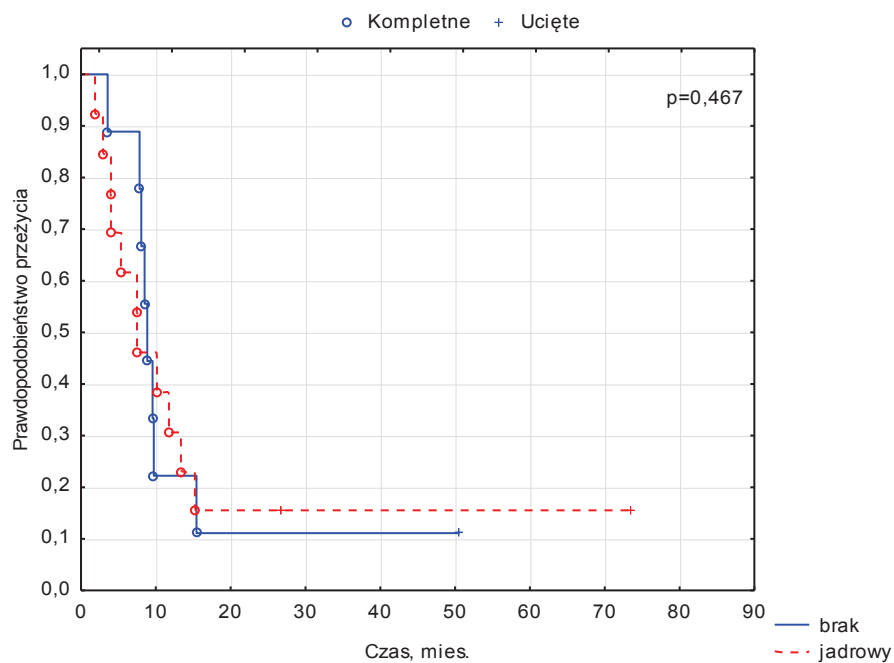
Obie porównywane grupy chorych nie różniły się całkowitym czasem przeżycia (ryc. 32) oraz czasem wolnym od progresji choroby (ryc. 33).



Ryc. 32. Porównanie czasu całkowitego przeżycia (OS) chorych z jądrową ekspresją Egfl7 (Nucleus- positive + Cytoplasma- positive) oraz chorych z całkowitym brakiem ekspresji Egfl7 (Nucleus- negative + Cytoplasma- negative)

Fig. 32. Comparison of OS in patients with nuclear expression of Egfl7 (Nucleus- positive + Cytoplasma- positive) and patients with total lack of expression in HGSOc (Nucleus- negative + Cytoplasma- negative)

czas – czas obserwacji w miesiącach/ observation time in months



Ryc. 33. Porównanie czasu wolnego od progresji choroby (PFS) chorych z jądrową ekspresją Egfl7 (Nucleus-positive + Cytoplasma-positive) oraz chorych z całkowitym brakiem ekspresji Egfl7 (Nucleus- negative + Cytoplasma- negative)

Fig. 33. Comparison of PFS in patients with nuclear expression of Egfl7 (Nucleus-positive + Cytoplasma-positive) and patients with total lack of expression in HGSOV (Nucleus-negative + Cytoplasma-negative)

czas – czas obserwacji w miesiącach/ observation time in months

Tabela 14B. Porównanie cech kliniczno-patologicznych chorych z HGSOE Egl7 *Nucleus-positive* + *Cytoplasm-positive* oraz Egl7 *Nucleus-negative* + *Cytoplasm-positive*

Table 14B. Comparison of clinico-pathological features of patients with HGSOE Egl7 *Nucleus-positive* + *Cytoplasm-positive* and Egl7 *Nucleus-negative* + *Cytoplasm-positive*

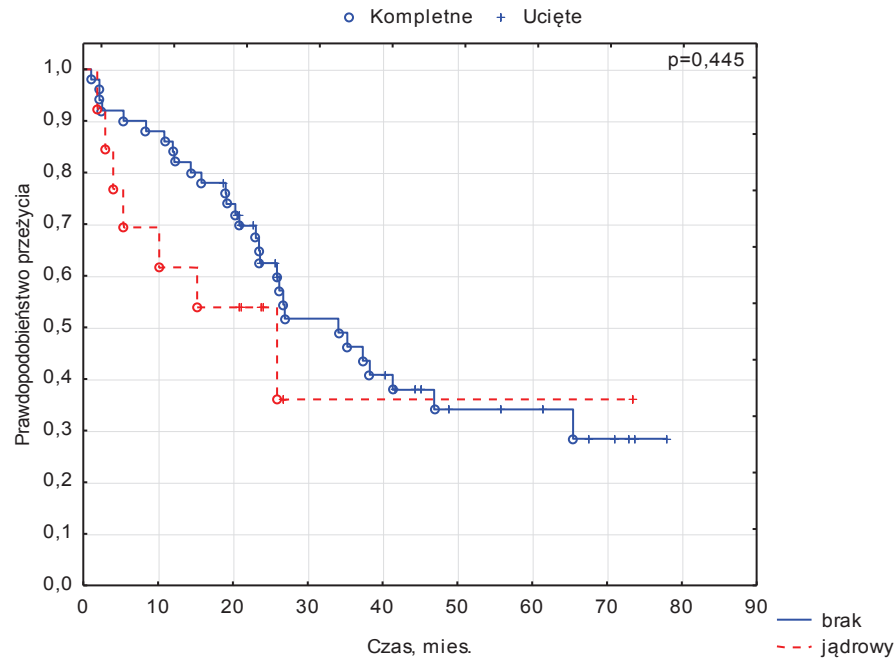
Cecha kliniczno-patologiczna	Egl7 Jądro(+) Cytoplazma(+) (n=13)	Egl7 Jądro(-) Cytoplazma(+) (n=50)	Metoda	p
Wiek w momencie rozpoznania	60	59,5	UMW	0,743
Status menopauzalny (tak)	10/13	39/50	Fisher	1,00
Obecność wodobrzusza	7/13	33/50	Fisher	0,521
Poziom CA125 (mediana)	2156,5	660	UMW	0,048
Cytoredukcja optymalna R≤1 cm	8/13	24/50	Fisher	0,535
Stadium zaawansowania: (wczesne/późne)	2/11	9/41	Fisher	1,00
Wrażliwość na platynę (tak)	5/12	32/43	Fisher	0,043
Liczba neutrocytów* (mediana)	7,15	7,495	UMW	0,756
Liczba limfocytów* (mediana)	1,25	1,48	UMW	0,562
CD4+ (mediana)	6,0	4,667	UMW	0,529
CD8+ (mediana)	12,667	12,5	UMW	0,873

* wyrażone w tys./mm³

Pacjentki z cytoplazmatyczną ekspresją Egl7 w tkance HGSOE, która dodatkowo wykazywała jądrową ekspresję Egl7, miały znamienne wyższy poziom CA 125 ($p=0,048$) oraz były częściej odporne na platynę w porównaniu z grupą kobiet, nie posiadających jądrowej ekspresji Egl7($p=0,043$).

Oznacza to, że obecność jądrowej ekspresji w Egl7-dodatniej tkance raka koreluje ze znamienne wyższym poziomem CA125 oraz może wpływać na odpowiedź na leczenie adiuwantowe (chemioterapię).

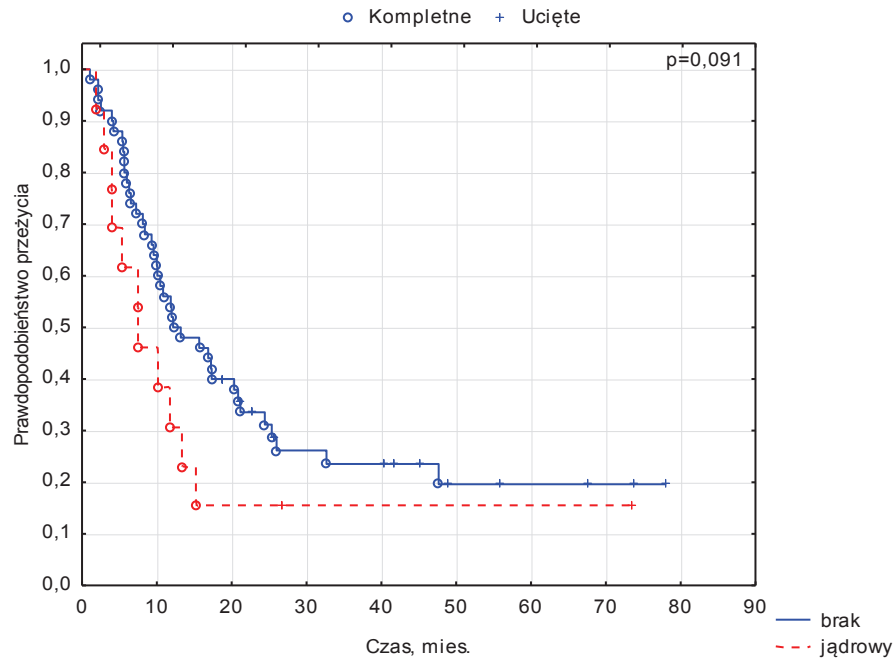
Obie porównywane grupy chorych nie różniły się całkowitym czasem przeżycia (ryc. 34) oraz czasem wolnym od progresji choroby (ryc. 35).



Ryc. 34. Porównanie czasu całkowitego przeżycia (OS) chorych z jądrową ekspresją Egf17 (Nucleus-positive + Cytoplasma- positive) oraz chorych bez ekspresji jądrowej, posiadających endogenną ekspresję cytoplazmatyczną Egf17 (Nucleus- negative + Cytoplasma- positive)

Fig. 34. Comparison of OS in patients with nuclear expression of Egf17 (Nucleus- positive + Cytoplasma- positive) and patients with HGSOE Egf17Nucleus- negative + Cytoplasma- positive.

czas – czas obserwacji w miesiącach/ observation time in months



Ryc. 35. Porównanie czasu wolnego od progresji choroby (PFS) chorych z jądrową ekspresją Egfl7 (Nucleus- positive + Cytoplasma- positive) oraz chorych bez ekspresji jądrowej, posiadających endogenną ekspresję cytoplazmatyczną Egfl7 (Nucleus- negative + Cytoplasma- positive)

Fig. 35. Comparison of PFS in patients with nuclear expression of Egfl7 (Nucleus- positive + Cytoplasma- positive) and patients with HGSOE Egfl7 Nucleus- negative + Cytoplasma- positive.

czas – czas obserwacji w miesiącach/ observation time in months

Tabela 14C. Porównanie cech kliniczno-patologicznych chorych z HGSOC *Egfl7 Nucleus-positive + Cytoplasma-positive* oraz *Egfl7 Nucleus-negative + Cytoplasma-positive and negative*

Table 14C. Comparison of clinicopathological features of patients with HGSOC *Egfl7 Nucleus-positive + Cytoplasma-positive* and *Egfl7 Nucleus-negative + Cytoplasma-positive and negative*

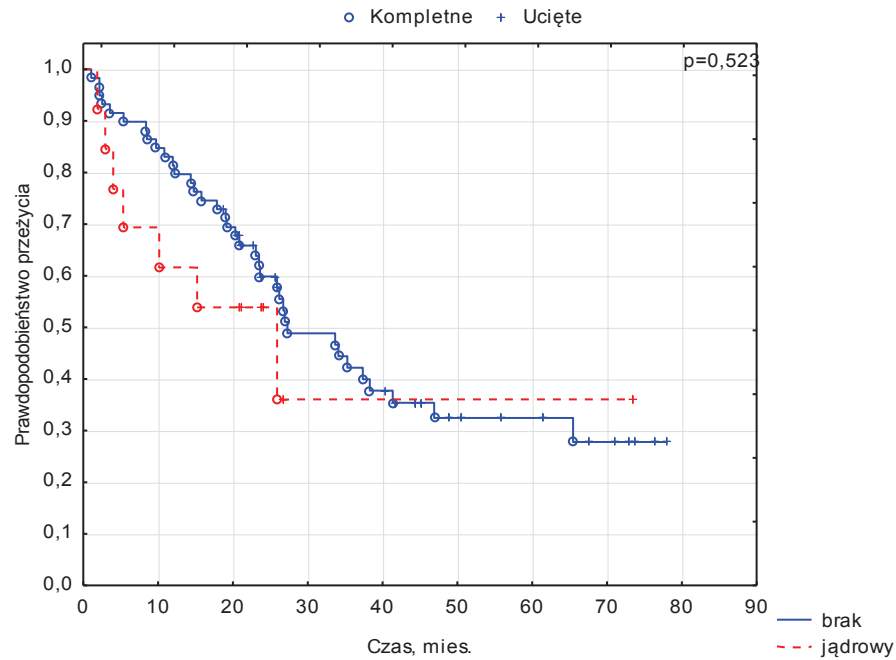
Cecha kliniczno-patologiczna	Egfl7 Jądro(+) Cytoplasma(+) (n=13)	Egfl7 Jądro(-) Cytoplasma(+) i cytoplasma(-) (n=59)	Metoda	p
Wiek w momencie rozpoznania	60	59	UMW	0,828
Status menopauzalny (tak)	10/13	47/59	Fisher	1,00
Obecność wodobrzusza	7/13	42/59	Fisher	0,324
Poziom CA125 (mediana)	2156,5	678,4	UMW	0,049
Cytoredukcja optymalna R≤1 cm	8/13	27/59	Fisher	0,367
Stadium zaawansowania wczesne/późne	2/11	9/50	Fisher	1,00
Wrażliwość na platynę (tak)	5/12	38/51	Fisher	0,04
Liczba neutrocytów* (mediana)	7,15	7,45	UMW	0,817
Liczba limfocytów* (mediana)	1,25	1,36	UMW	0,674
CD4+ (mediana)	6,0	4,667	UMW	0,487
CD8+ (mediana)	12,667	12,333	UMW	0,739

* wyrażono w tys./mm³

Pacjentki z jądrową ekspresją Egfl7 w tkance HGSOC miały znamienne wyższy poziom CA 125 oraz były częściej odporne na platynę w porównaniu z grupą kobiet nieposiadających jądrowej ekspresji Egfl7.

Ta dodatkowa analiza, w której do grupy kontrolnej dodano przypadki z całkowitym brakiem ekspresji Egfl7, potwierdza silny związek jądrowej ekspresji Egfl7 z występowaniem wysokich poziomów CA 125 oraz z gorszą odpowiedzią na leczenie adiuwantowe (chemioterapię).

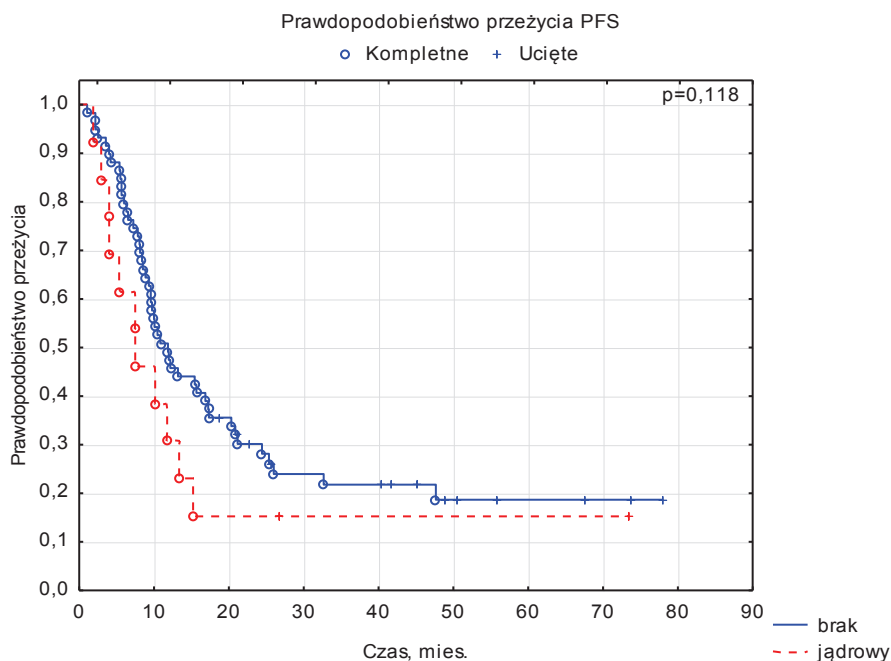
Obie porównywane grupy chorych nie różniły się całkowitym czasem przeżycia (ryc. 36) oraz czasem wolnym od progresji choroby (ryc. 37).



Ryc. 36. Porównanie czasu całkowitego przeżycia (OS) chorych z jądrową ekspresją Egfl7 (Nucleus- positive + Cytoplasma- positive) oraz chorych bez ekspresji jądrowej, niezależnie od posiadanej endogennej ekspresji cytoplazmatycznej Egfl7 (Nucleus- negative + Cytoplasma- positive and negative)

Fig. 36. Comparison of OS in patients with nuclear expression of Egfl7 (Nucleus- positive + Cytoplasma- positive) and patients with HGSOE Egfl7 Nucleus- negative + Cytoplasma- positive and negative.

czas – czas obserwacji w miesiącach/ observation time in months



Ryc. 37. Porównanie czasu wolnego od progresji choroby (PFS) chorych z jądrową ekspresją Egfl7 (Nucleus- positive + Cytoplasm- positive) oraz chorych bez ekspresji jądrowej, niezależnie od posiadanej endogennej ekspresji cytoplazmatycznej Egfl7 (Nucleus- negative + Cytoplasm- positive and negative)

Fig. 37. Comparison of PFS in patients with nuclear expression of Egfl7 (Nucleus- positive + Cytoplasm- positive) and patients with HGSOE Egfl7Nucleus- negative + Cytoplasm- positive and negative.

czas – czas obserwacji w miesiącach/ observation time in months

4.4 Analiza jedno- i wieloczynnikowa

Dla czynników, które korelowały znamienne z całkowitym czasem przeżycia pacjentów oraz z czasem wolnym od progresji choroby, zostały wykreślone modele regresji jednoczynnikowej proporcjonalnego ryzyka Coxa.

Potwierdzono znaczenie prognostyczne utraty wagi ciała pomiędzy operacją pierwotną a pierwszym cyklem chemioterapii, skuteczności cytoredukcji, poziomu CA 125 przed zabiegiem operacyjnym, obecności wodobrzusza oraz przedoperacyjnego poziomu neutrocytów w surowicy krwi (tabela 17, tabela 18).

Tabela 17. Zestawienie cech pacjentek z HGSOc które korelują znamienne z OS (model regresji jednoczynnikowa ryzyka proporcjonalnego Coxa)

Table 17. Summary of the characteristics of patients with HGSOc that correlate significantly with OS (univariate Cox proportional hazard regression)

Zmienna	Kategorie	OS		P
		HR	95% CI	
Zmiana wagi ciała między operacją a pierwszym cyklem Chth	+ / 0	1	1,00-10,66	0,050562
	–	3,259799		
Stopień cytoredukcji	≤1	1	1,05-3,51	0,034599
	>1	1,92		
Poziom CA 125	<836,5	1	1,11-3,92	0,021712
	≥836,5	2,09		
Wodobrzusze	Nie	1	1,81-9,28	0,000730
	Tak	4,1		
Poziom neurocytów przed operacją (tys./mm ³)	<7,45	1	0,91-3,06	0,096270
	≥7,45	1,67		

Tabela 18. Zestawienie cech pacjentek z HGSOc które korelują znamienne z PFS (model regresji jednoczynnikowej ryzyka proporcjonalnego Coxa)

Table 18. Summary of the characteristics of patients with HGSOc that correlate significantly with PFS (univariate Cox proportional hazard regression)

Zmienna	Kategorie	PFS		P
		HR	95% CI	
Zmiana wagi ciała między operacją a pierwszym cyklem Chth	+ / 0	1	1,1-6,13	0,029187
	–	2,6		
Stopień cytoredukcji	≤1	1	0,97-2,82	0,056470
	>1	1,67		
Poziom CA 125	<836,5	1	1,15-3,42	0,013852
	≥836,5	1,98		
Wodobrzusze	Nie	1	1,41-4,91	0,002338
	Tak	2,63		
Poziom neurocytów przed operacją (tys./mm ³)	<7,45	1	1,01-2,88	0,046931
	≥7,45	1,17		

W modelu wieloczynnikowym stwierdzono niezależny istotny wpływ utraty wagi ciała między operacją pierwotną a pierwszym cyklem chemioterapii, oraz obecności wodobrzusza przed leczeniem chirurgicznym, zarówno w odniesieniu do całkowitego czasu przeżycia chorych jak i czasu wolnego od progresji choroby (tabela 19, tabela 20).

Tabela 19. Wieloczynnikowa analiza przeżyć dla chorych z HGSOE

Table 19. Multivariate survival analysis using Cox's regression model

Zmienna	Kategorie	OS		P
		HR	95% CI	
Wodobrzusze	Nie	1	2,05-14,01	0,000624
	Tak	5,36		
Zmiana wagi ciała między operacją a pierwszym cyklem Chth	Wzrost/bez zmian	1	1,15-12,53	0,028458
	Spadek	3,8		

Tabela 20. Wieloczynnikowa analiza PFS dla chorych z HGSOE (model regresji Coxa)

Table 20. Multivariate analysis of PFS for patients with HGSOE (Cox's regression model)

Zmienna	Kategorie	PFS		P
		HR	95% CI	
Wodobrzusze	Nie	1	1,49-6,08	0,002056
	Tak	3,02		
Zmiana wagi ciała między operacją a pierwszym cyklem Chth	Wzrost/bez zmian	1	1,28-7,38	0,012266
	Spadek	3,07		

5. DYSKUSJA

Rak jajnika cechuje się najwyższą śmiertelnością spośród wszystkich nowotworów ginekologicznych. W Polsce w 2012 r. współczynnik zachorowalności i śmiertelności wyniósł odpowiednio 13,6/100 tys. i 7,3/100 tys. W liczbach bezwzględnych oznacza to, że mieliśmy 4456 zachorowań i 2692 zgonów z powodu tej choroby [79]. Przeżycia 5-letnie według danych KRN wynoszą 42,6% i są niższe niż przeciętna w Unii Europejskiej, wynosząca 47,5% [79].

Przeżycia wśród chorych na raka jajnika nie zmieniły się zasadniczo przez ostatnie 50 lat, a badania skrinigowe, prowadzone przez ponad 2 minione dekady nie zdołały doprowadzić do poprawy przeżywalności wśród chorych na ten nowotwór.

Niemoc w przekroczeniu pewnego pułapu wyników leczenia może wynikać z faktu ukierunkowania działań terapeutycznych przeciwko rozpoznanej już chorobie, a nie przeciw mechanizmom, prowadzącym do jej powstawania. Dziś wiele wskazuje, że rak jajnika ma heterogenne podłoże molekularne i dopóki nie zostaną wyjaśnione mechanizmy, leżące u podstaw jego powstawania, perspektywa poprawy wyników leczenia pozostanie niepewna.

W ostatnich latach doszło do wielu istotnych odkryć, które pogłębiły rozumienie biologii raka jajnika i mogą w perspektywie nadchodzących lat wpłynąć na poprawę wyników leczenia. Na ich podstawie podzielono surowicze raki jajnika nadwa typy: LGSOC i HGSOC [209].

Typ niskozróżnicowany (HGSOC) jest najczęstszą postacią tego nowotworu. Stanowi 75% ogółu i odpowiada za większość zgonów [209].

Przedstawiony i badany materiał obejmował 73 kobiety z HGSOC, operowane w Oddziale Ginekologii Onkologicznej Gdyńskiego Centrum Onkologii (GCO) w okresie między XII 2007 r. a XII 2012 r. Liczba wszystkich przypadków surowiczego raka jajnika, leczonych operacyjnie w wybranym okresie w GCO wynosiła 104. Odsetek HGSOC wynosił zatem 70,2%. Istotnie, według danych literaturowych, większość surowiczego raka jajnika stanowią przypadki o niskim stopniu zróżnicowania histologicznego, niezależnie od wieku zachorowania [175].

W badaniu, którym objęto 381 kobiet, leczonych z powodu raka surowiczego, w 9,2% przypadków było LGSOC, a w 91,8% stanowiły przypadki HGSOC [142].

Mediana wieku zachorowania w badanej grupie HGSOc wyniosła 59 lat (zakres 39 – 86 lat). Jest to wartość zbliżona do danych pochodzących z badania GOG 182 (mediana 59,3 lat) [63], ale odbiega od wartości deklarowanej w badaniu opublikowanym niedawno przez Chińczyków (mediana 56 lat) [142].

W badanej grupie do zachorowania najczęściej dochodziło podczas menopauzy (79%). Chore, które zachorowały przed wystąpieniem menopauzy, wykazywały tendencje do dłuższego całkowitego czasu przeżycia. Jest to zgodne z doniesieniami innych autorów, którzy wykazali, że ponad 2/3 przypadków HGSOc występuje po menopauzie, oraz że występuje korelacja pomiędzy wiekiem zachorowania i gorszym rokowaniem pacjentów [161, 185].

W badanej grupie chorych HGSOc był rozpoznawany, w większości przypadków, w późnym stopniu zaawansowania klinicznego choroby: III lub IV stopień według klasyfikacji FIGO (84,94%). Wczesne stopnie (FIGO I lub II) rozpoznano w 15,06%. W badaniu Ming, w którym objęto grupę 346 przypadków HGSOc, pacjentki z III i IV stopniem FIGO stanowiły 74% całej populacji. W stopniu I lub II rozpoznano 90 przypadków – 26% chorych [142].

W badaniu Seidmana, obejmującym 400 chorych z HGSOc, u których przeprowadzono pełen *staging*, występowanie choroby ograniczonej wyłącznie do jajników odnotowano zaledwie w 1,25% przypadków [Seidman, Waszyngton, dane nieopublikowane]. Według *British Columbia Tumor Registry*, HGSOc ograniczony wyłącznie do jajników dotyczy jedynie 0,5% wszystkich rozpoznań.

Fakt rozpoznawania HGSOc głównie w zaawansowanym stadium choroby, potwierdza nieskuteczność badań przesiewowych dla tego podtypu histologicznego. Przeciwnie do postaci niskozróżnicowanej (*High Grade*), postać dobrze zróżnicowana surowiczego raka jajnika (*Low Grade* – LGSOc) posiada udokumentowane zmiany prekursorowe oraz bardziej powolną dynamikę rozsiewu, dlatego w stadium I lub II rozpoznawana jest w 22% przypadków [142].

Być może agresywna biologia HGSOc, oraz przewaga liczebna nad LGSOc leży u podstaw braku skuteczności stosowanych metod skринingu. Fiasco dotychczasowych wysiłków, zmierzających do wczesnego wykrywania raka jajnika, zostało potwierdzone w dużym, wieloośrodkowym badaniu prospektywnym, w którym 35000 kobiet poddano corocznym badaniom poziomu CA 125, wraz z przezpochwową ultrasonograficzną oceną jajników (USG TV). W chwili rozpoznania zaawansowanie raka jajnika w tej grupie nie różniło się od populacji nie objętej skринingiem [27].

Trwają badania nad etiopatogenezą i biologią molekularną tej szczególnie agresywnej formy surowiczego raka jajnika, które być może w niedalekiej przyszłości dostarczą niezbędnych informacji do opracowania skutecznego testu, wykrywającego chorobę w swoim stadium początkowym [121].

W grupie badanych chorych wykazano związek pomiędzy stopniem zaawansowania choroby a poziomem CA 125. Wśród chorych z wczesnym stopniem zaawansowania (FIGO I i II), mediana CA 125 była istotnie niższa w porównaniu do grupy FIGO III i IV (167 vs 980 IU/ml). Zróżnicowanie poziomu CA 125 w zależności od stopnia FIGO jest zgodne z doniesieniami innych autorów [33, 135, 184]. Wykazano, że poziom CA 125 koreluje ze skróceniem PFS i OS, brakuje jednak podstaw (nie jest niezależnym czynnikiem prognostycznym), by na podstawie wartości przedoperacyjnego poziomu CA 125 prognozować PFS lub OS [33].

Wodobrzusze stwierdzone w chwili rozpoznania raka jajnika stanowi niezależny czynnik prognostyczny. Jego obecność wiąże się z krótszym czasem wystąpienia progresji choroby oraz krótszym całkowitym czasem przeżycia pacjentów. Wykazano, że chore w III lub IV stopniu zaawansowania klinicznego wg FIGO z wodobrzuszem w chwili rozpoznania, wykazują 5-letnie przeżycia na poziomie 5%, podczas gdy chore w tym samym stopniu zaawansowania bez wodobrzusza mają odsetek 5-letnich przeżyć 45% [179]. Obecność wodobrzusza wiąże się również ze zwiększoną opornością na chemioterapię i częstszym nawrotem choroby [113]. Doniesienia te potwierdziły się w badanym materiale. Występowanie wodobrzusza w chwili rozpoznania odnotowano u 50 z 73 chorych (68%). W grupie tej częściej obserwowano wznowę choroby. Czas do wznowy choroby oraz czas przeżycia pacjentów były zmiennie krótsze w porównaniu do grupy pacjentek bez wodobrzusza.

W badanej grupie wykazano, że pacjentki, u których uzyskano cytoredukcję nieoptymalną, mają przedoperacyjny poziom CA 125 istotnie wyższy niż chore, u których udało się wykonać cytoredukcję optymalną (1315 IU/ml vs 577 IU/ml). Sugeruje to, że przedoperacyjne stężenie CA 125 może być brane pod uwagę jako czynnik predykcyjny uzyskania cytoredukcji optymalnej w przypadku HGSO. Doniesienia na ten temat w literaturze nie są jednoznaczne. Metaanaliza z 2010 r. wskazała, że przedoperacyjne stężenie CA 125 jest istotnym czynnikiem predykcyjnym optymalnej cytoredukcji [107]. Ibeanu i Bristow podali, że stężenie CA 125 < 500 IU/ml można potraktować jako punkt odcięcia w predykcji cytoredukcji optymalnej [99].

Współczesną strategią leczenia operacyjnego jest wykonanie cytoredukcji optymalnej, definiowanej jako pozostawienie pierwotnej masy guza w postaci guzków, o maksymalnej średnicy poniżej 1 cm każdy [240]. W badanej grupie pacjentek wynik optymalny uzyskano w 49% przypadków ($n=36$). Potwierdzono silną korelację pomiędzy stopniem osiągniętej cytoredukcji a czasem do wznowy (PFS) i całkowitym czasem przeżycia pacjentów (OS).

W grupie chorych zoperowanych optymalnie, PFS wynosił 13,46 miesięcy, a OS 37 miesięcy. W przypadku pozostawienia resztek > 1 cm, PFS wynosił 10,05 miesięcy, a OS 19,7 miesięcy.

Wyniki własne są zbliżone do danych, opublikowanych przez Ming i wsp. [142]. Autorzy ci podobnie oceniali wyniki leczenia wyłącznie w typie surowiczego raka jajnika. PFS i OS w grupie optymalnie zoperowanych pacjentów wynosił odpowiednio 16 i 44 miesiące. W grupie chorych zoperowanych nieoptymalnie PFS= 13 miesięcy a OS= 28 miesięcy

Osiągnięty wynik jest zgodny również z innymi badaniami, w których nie uwzględniając podziału na typy histologiczne raka jajnika, udowodniono, że chore po cytoredukcji optymalnej $R \leq 1$ cm żyją od 30 do 40 miesięcy [2, 32, 118, 197].

Spośród grupy 73 chorych, poddanych pierwotnej operacji cytoredukcyjnej, 64 zakwalifikowano do chemioterapii. Wrażliwość (definiowana w rozdziale Materiał i metoda) na chemioterapię opartą na taksolu i platynie stwierdzono w 43 przypadkach, co stanowi 67% badanej grupy. W pozostałych 21 przypadkach (32%) stwierdzono oporność na pochodne platyny. Według danych literaturowych, odsetek odpowiedzi na chemioterapię opartą na taksolu i platynie w grupie chorych z HGSOc wynosi 66-90% [23, 190].

Odpowiedź lub jej brak na chemioterapię opartą na platynie to uznany, przydatny klinicznie czynnik rokowniczy przebiegu choroby. Jest też kryterium, na podstawie którego podejmuje się decyzje o typie chemioterapii II rzutu [39].

Stan zapalny odgrywa bardzo istotną rolę w rozwoju i progresji wielu nowotworów. Odbywa się to poprzez aktywację cytokin i mediatorów zapalnych, hamowanie apoptozy, indukcję angiogenezy, stymulowanie uszkodzenia DNA, pośredniczenie w immunosupresji oraz korzystne dla raka przebudowanie macierzy pozakomórkowej [43, 88].

Miernikiem nasilenia stanu zapalnego w organizmie jest poziom neutrocytów we krwi obwodowej. W ostatnim czasie pojawił się szereg doniesień, w których albo sama liczba neutrocytów we krwi obwodowej, lub stosunek neutrocytów do limfocytów (określany jako wskaźnik NL: neutrophil- lymphocyte

ratio) – okazały się niezależnymi czynnikami prognostycznymi skróconego czasu przeżycia w wielu typach nowotworów złośliwych: raku okrężnicy [234], piersi [9], żołądka [35], oraz mięsaków tkanek miękkich [37]. Ponadto, w kilku badaniach wykazano, że podwyższony wskaźnik NLR przed rozpoczęciem leczenia może być przydatnym narzędziem w prognozowaniu odpowiedzi na leczenie i nawrotu choroby [35, 162, 207, 244].

W badaniu Wang, w grupie chorych z surowiczym rakiem jajnika, wśród pacjentek o najwyższym wskaźniku NLR – stosunek HGSOC/ LGSOC miał najwyższą wartość. Analiza przeżyć wykazała, że stosunek neutrocytarno - limfocytarny jest niezależnym czynnikiem prognostycznym dla PFS i OS u chorych na surowiczego raka jajnika [40]. Wykazano, że chore z wysoką wartością NLR wykazują istotnie słabszą odpowiedź na Chth niż chore z niskim wskaźnikiem NLR, co potwierdziło się z wynikami badań, dotyczących raka żołądka i trzustki [35, 244].

W badaniu Cho wykazano, że wartość NLR jest istotnie podwyższona u chorych na raka jajnika w porównaniu z łagodnymi chorobami ginekologicznymi lub z osobami zdrowymi [34].

Williams w ocenie retrospektywnej 519 chorych z rakiem jajnika wykazał, że podwyższony NLR wskazuje na bardziej agresywny przebieg choroby, koreluje z czynnikami ryzyka, jak obciążający wywiad rodzinny, oraz przewiduje okres przeżycia [239].

W niniejszym badaniu dokonano przedoperacyjnej oceny liczby neutrocytów, limfocytów, oraz określono wskaźnik neutrocytarno-limfocytarny u wszystkich chorych. Wykazano, że chore z liczbą neurocytów powyżej mediany wykazują istotnie krótszy PFS i OS niż pozostałe. Różnica w PFS wyniosła 3,92 miesiąca, dla OS – 3,33 miesiąca. Nie wykazano takiego związku dla wskaźnika NLR, w przeciwieństwie do przytoczonego wcześniej badania Wang. Porównując kohorty, w niniejszym badaniu oceniana grupa składała się wyłącznie z chorych z HGSOC, zawierała niższy odsetek chorych zoperowanych optymalnie, większy odsetek chorych w późnym stopniu zaawansowania (FIGO III i IV). Dokonano oceny NLR u wszystkich chorych, nie wyłączając tych, u których poziom neurocytów lub limfocytów mógł być zaburzony przez inne czynniki lub choroby inne niż rak jajnika. Dodatkowo badanie Wang dotyczyło populacji azjatyckiej. Być może różnice rasowe wpłynęły na rozbieżności w uzyskanych wynikach.

W metaanalizie 3776 przypadków, opublikowanej w 2014 r. wykazano, że nadwaga i otyłość wiążą się z podwyższonym ryzykiem zachorowania na raka jajnika, w porównaniu do kobiet z prawidłową wagą ciała, niezależnie od tego, czy są w okresie przed- czy pomenopauzalnym [176].

W zgromadzonym materiale nie stwierdzono, aby przedoperacyjna waga ciała lub BMI wpływały na zachorowalność na raka jajnika. Liczebność grup powyżej i poniżej mediany wagi była jednakowa. Nie stwierdzono wpływu BMI ani przedoperacyjnej wagi pacjentek na stopień uzyskiwanej cytoredukcji w trakcie PDS. Nie wykazano również wpływu przedoperacyjnej wagi ciała lub BMI na PFS i OS w badanej grupie.

W naszym badaniu stwierdziliśmy, że utrata wagi ciała w okresie między zabiegiem operacyjnym a pierwszym cyklem chemioterapii, którą odnotowaliśmy u 53 z 64 analizowanych chorych (82,8%), wiąże się z istotnie krótszym okresem PFS i OS w stosunku do chorych, które nie straciły na wadze w analogicznym czasie ($n=11$; 17,2%).

Wykazano też, że w grupie chorych opornych na platynę ($n=21$), wszystkie pacjentki straciły na wadze w okresie między zabiegiem operacyjnym a chemioterapią. Spadek wagi ciała pomiędzy operacją pierwotną a pierwszym cyklem chemioterapii był czynnikiem prognostycznym skróconego czasu do wystąpienia wznowy i krótszego całkowitego czasu przeżycia pacjentów. Prawdopodobnie jest to związane z odnotowaną gorszą odpowiedzią na chemioterapię adiuwantową w tej grupie chorych.

W jedynej publikacji, oceniającej wpływ prognostyczny utraty wagi w trakcie leczenia i występowania niedowagi po zakończeniu leczenia raka jajnika, wykazano, że u chorych z niedowagą w momencie rozpoznania, częściej osiągnięta jest cytoredukcja optymalna. Chore z niedowagą, którą stwierdza się po zakończeniu leczenia, wykazują istotnie krótszy PFS i OS. Nie oceniono wpływu utraty wagi ciała na odpowiedź na chemioterapię adiuwantową, stwierdzono jednak utratę wagi ciała między PDS a pierwszym cyklem chemioterapii adiuwantowej u większości chorych, podobnie jak w niniejszym badaniu. Wykazano, że chore, które w trakcie całego procesu leczniczego utraciły powyżej 10% wagi wyjściowej, wykazują gorsze PFS i OS w porównaniu z chorymi, które utraciły poniżej 10% wyjściowej wagi ciała. Grupa badana objęła także chore, które poddane zostały chemioterapii neoadiuwantowej [206].

W zebranym materiale własnym do wznowy doszło w 58 przypadkach (79,4%), częściej w grupie chorych w późnym stopniu zaawansowania (85% chorych) niż w przypadku choroby w stopniu FIGO I lub II (45% chorych). Jest

to zgodne z doniesieniami innych autorów, według których do wznowy dochodzi w 83,5% przypadków HGSOE [142].

Mediana czasu obserwacji chorych w badaniu własnym wyniosła 47,25 miesiąca.

Dla całej badanej grupy uzyskano medianę PFS 10,23 miesiąca, medianę OS 26,75 miesiąca.

Obecnie *American Cancer Society* szacuje, że 5-letnie przeżycia wśród chorych na HGSOE wynoszą 44%, biorąc pod uwagę wszystkie stadia zaawansowania, ale tylko 25%, jeśli uwzględnimy chore w stopniu III i IV (*late stage*) [122]. W naszym badaniu mediana 5-letniego przeżycia w grupie wczesnego zaawansowania klinicznego wg FIGO wyniosła 78%. Dla chorych w stopniu III i IV według FIGO- 22%.

W zebranym materiale 5-letnie przeżycie dla całej badanej grupy wyniosło 31,4%.

Mediana czasu oczekiwania na pierwszy cykl chemioterapii po zabiegu operacyjnym wyniosła 32 dni (7-155). W badanej grupie wykazano, że wydłużenie czasu oczekiwania na chemioterapię powyżej mediany skraca PFS, ale tylko w grupie chorych po cytoredukcji nieoptymalnej $R > 1$ cm.

Wyniki porównano z publikacją Hofstettera, której celem była ocena znaczenia prognostycznego czasu pomiędzy pierwotnym leczeniem operacyjnym a chemioterapią w grupie 191 chorych z surowiczym rakiem jajnika, rozpoznanym w stopniu zaawansowania III i IV wg FIGO. Było to badanie prospektywne, wieloośrodkowe, o akronimie OVCAD (*O*Varian *C*ancer *D*iagnosis). Mediana czasu oczekiwania na podanie chemioterapii wyniosła w tym badaniu 28 dni (4 – 158) a więc była zbliżona do naszej. Wykazano, że opóźnienie rozpoczęcia chemioterapii skraca czas całkowitego przeżycia chorych z zaawansowanym rakiem jajnika, zwłaszcza po cytoredukcji suboptymalnej ($R > 1$ cm). Nie ma natomiast znaczenia w grupie po cytoredukcji $R=0$ (*microscopic*). Nie wykazano, aby okres pomiędzy PDS i chemioterapią poniżej lub powyżej 28 dni wpływał na PFS w całej badanej grupie [91].

Podsumowując, wnikliwa analiza cech kliniczno-patologicznych wykazała, że wyselekcjonowana do badań populacja pacjentek z HGSOE, odpowiada pod względem struktury oraz czynników prognostycznych innym kohortom, opisywanym wcześniej w literaturze medycznej.

W latach 90. wykazano, że czynniki angiogenne podlegają ekspresji w komórkach raka piersi [183] oraz w zmianach niezłośliwych, związanych z wysoką

gęstością naczyń. Są one powiązane ze zwiększonym ryzykiem rozwoju raka [235, 236].

Potwierdzono związek pomiędzy ekspresją czynników angiogennych a występowaniem mikroprzerzutów do kości [70] oraz z czasem przeżycia pacjentów [223]. Zakładano, że ocena stopnia angiogenezy może pomóc przewidzieć wystąpienie progresji nowotworu [60, 87], jak też odpowiedź na jego leczenie [69].

Egfl7 (*Epidermal Growth Factor-Like Domain 7*) to gen, który po raz pierwszy został wykryty w komórkach endotelium, w przebiegu rozwoju zarodka myszy [157].

Wstępnie uznawany był za specyficzny dla komórek endotelium, ważny regulator tubulogenezy w trakcie rozwoju zarodkowego [157]. Dotychczasowe badania wykazały, że Egfl 7 występuje również w innych komórkach [29].

U myszy, ekspresja Egfl 7, wysoka podczas rozwoju embrionalnego, ulega zmniejszeniu w niemal wszystkich dojrzałych tkankach, z wyjątkiem płuc, serca, nerek. Ulega silnemu wzmocnieniu w tkankach proliferujących, w tym guzach [29, 228]. Zaobserwowany wzór ekspresji, podobny do płodowej alfa- feto proteiny (AFP) i antygenu karcinoembriogenego (CEA) wskazuje Egfl7 jako potencjalny, nowy biomarker nowotworowy [11, 133, 192].

U ludzi gen Egfl7 zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 9 [157, 214, 215]. Wykazano zmienną nasiloną ekspresję Egfl7 w komórkach zdrowych tkanek. Silna w trakcie rozwoju zarodkowego, ulega obniżeniu po urodzeniu. U dorosłych ogranicza się do miejsc aktywnej przebudowy naczyniowej. Działa na naczynia śródbłonna, by kontrolować rozwój naczyń krwionośnych podczas angiogenezy w warunkach fizjologicznych, np. menstruacja, oraz patologicznych: gojenie ran, rozrost guza nowotworowego, przerzutowanie nowotworowe.

Silną ekspresję Egfl7 potwierdzono w płucach, sercu, mózgu, siatkówce oka. Pośrednio wysokie stężenia stwierdza się w tarczycy, trzustce, śledzionie, moczowodzie, pęcherzu moczowym, prostaty, jądrach, mięśniach, żyłach wrotnej i aorty. Najniższe odnotowano w tkankach przewodu pokarmowego: wątroba, żołądek, dwunastnica, jelito cienkie i grube [64]. Do ekspresji dochodzi głównie w komórkach endotelium.

Zwiększenie ekspresji Egfl7 w obrębie układu rozrodczego zaobserwowano w ciąży [28].

Z czasem potwierdzono także, że do nieprawidłowej ekspresji Egfl 7 dochodzi w komórkach nabłonkowych nowotworów złośliwych u ludzi, takich jak:

rak jelita grubego i odbytnicy, raku wątrobowokomórkowym, raku piersi, rakach głowy i szyi, glejaku wielopostaciowym [97, 128, 242, 243].

W przypadku raka wątrobowokomórkowego (HCC), wysoka ekspresja Egfl7 jest powiązana z gorszym rokowaniem. Obecność Egfl7 stwierdzono w komórkach raka HCC, ale nie w komórkach endotelium [242]. Ponadto, istotnie podwyższoną ekspresję Egfl7 stwierdzano w przypadku raka okrężnicy oraz płaskonabłonkowym raku krtani, gdzie potwierdzono korelację między Egfl7 a przerzutami do węzłów chłonnych, wyższym zaawansowaniem choroby oraz złym rokowaniem [49, 97, 128].

Badania te rzuciły nowe światło na kliniczne znaczenie ekspresji Egfl7 w nowotworach innych niż HCC, co sprawiło, że zaczęto rozważać ten biomarker pod kątem znaczenia prognostycznego.

Wzorce ekspresji Egfl7 w ludzkich tkankach, zarówno prawidłowych jak i nowotworowych, pozostają wciąż nie do końca zbadane. Dopiero w ostatnich kilku latach zintensyfikowano badania w celu uzupełnienia wiedzy na ten temat.

Fan i wsp. dokonali oceny ekspresji Egfl 7 w 19 dojrzałych tkankach ludzkich oraz tkankach 10 nowotworów nabłonkowych, a także w odpowiednich liniach hodowlanych komórek rakowych. Badacze odnotowali podwyższoną ekspresję Egfl7 we wszystkich zbadanych przez siebie nowotworach nabłonkowych, w tym w przypadkach raka jajnika, zarówno w świeżo pozyskanej tkance (n=3), w blokach parafinowych (n=6), jak i w surowicy krwi chorych (n=15) [64]. Jak widać, była to bardzo mała grupa tkanek, ale reprezentatywna do odnotowania faktu obecności Egfl7 w raku jajnika. W badaniu ekspresję Egfl7 oceniano, między innymi immunohistochemicznie, w preparatach uzyskanych z materiału archiwalnego, utrwalonego w parafinie. Podobnie do naszego badania, Fan i wsp. wykazali również obecność cytoplazmatyczno-błonowej ekspresji Egfl7 [64].

Co ciekawe, w badaniu ocenie poddano również zdrowe tkanki ludzkie (19 różnych typów), ale wśród ocenianych zabrakło prawidłowej tkanki jajnikowej.

W 2014 r. ukazało się badanie chińskie, które dotyczyło ekspresji Egfl7 wyłącznie w raku jajnika [161]. Ocenie poddano różne typy histologiczne, takie jak rak surowiczy (40,7%), rak śluzowy (24,9%), endometroidalny (18,1%) rak z komórek przejściowych (1,7%) i pozostałe raki (1,1%).

Jest to pierwsze opublikowane badanie, w którym oceniano również ekspresję Egfl7 w zdrowej tkance jajnikowej, pochodzącej od siedmiu kobiet, które przeszły operacje chirurgiczne z przyczyn innych niż nowotwór złośliwy. Co ważne, w żadnym z tych przypadków nie wykryto ekspresji Egfl7. Zatem obec-

ność tego biomarkera jest efektem transformacji nowotworowej komórek nabłonka jajnikowego [161].

Opisane powyżej dwa badania, są jedynymi dostępnymi w piśmiennictwie (do momentu pisania monografii), które podjęły temat analizy ekspresji Egfl7 w raku jajnika [64, 161]. Obie potwierdzają odnotowany w badaniu własnym profil ekspresji immunohistochemicznej. We wszystkich pracach, wykonane oznaczenia immunohistochemiczne wykazały ekspresję błonowo- cytoplazmatyczną, oraz w mniejszym odsetku, ekspresję jądrową (występującą równolegle do cytoplazmatycznej). Równocześnie obecność Egfl7 w komórkach endotelium, obecnych w zrębie tkanki raka, była sporadyczna.

Pozostałe dane, opublikowane we wcześniejszych pracach, nie mogą być wykorzystane do analizy porównawczej wyników, ze względu na heterogenność badanych w nich tkanek, oraz odmienne metody badawcze.

Oh i wsp. w 2014 r. zbadali ekspresję Egfl7 w heterogennej histologicznie grupie chorych na raka jajnika, u których wykonano pierwotną operację cytoredukcyjną z następową chemioterapią dożylną, opartą na paklitakselu i platynie. Analizą nie objęto pacjentek leczonych za pomocą chemioterapii neoadjuwantowej i odroczonej operacji cytoredukcyjnej.

Materiał tkankowy stanowiły archiwalne bloki parafinowe i jest to jedyna wspólna cecha z badaniem własnym. Immunohistochemiczną ekspresję Egfl7 oceniono już jednak nie za pomocą mediany HSCORE jak w naszym badaniu, ale na podstawie obserwacji intensywności barwienia w obrębie cytoplazmy i błony komórkowej. Siłę odczynu opisywano w 4-punktowej skali, zależnie od procentowego udziału komórek nowotworowych, które się wybarwiły, od 0 (do 10%), przez 1 (11 – 25%), 2 (26 – 50%) do 3 (powyżej 51%), przez 2 niezależnych patologów. Siłę odczynu klasyfikowano jako „niski” dla stopnia 0 i 1 (n=123; 63,9%), oraz jako „wysoki” dla stopni 2 i 3 (n=54; 47,3%).

Rak surowiczy stanowił w badaniu chińskim 40,7% badanych przypadków (72 z 177). Nie wiadomo, jaką część stanowiły przypadki raka surowiczego o niskim stopniu zróżnicowania (HGSOC). W 49 przypadkach surowiczych raków jajnika stwierdzono niską ekspresję Egfl 7 (68%), w pozostałych 23 wysoką (32%). W całej badanej populacji było 90 (50,8%) raków niskozróżnicowanych (różne typy histologiczne). W 39 z nich odnotowano wysokie wartości ekspresji Egfl7 (43%).

Do tej pory w żadnym innym opracowaniu przed Oh i wsp. [161] nie oceniono związku pomiędzy ekspresją Egfl7 a OS.

Badanie dotyczyło jednak populacji azjatyckiej i przede wszystkim różnych typów histologicznych raka jajnika, potraktowanych jako całość. Wysoka ekspresja Egfl7 korelowała z krótszym czasem do wznowy (PFS) oraz z licznymi cechami kliniczno patologicznymi, które od lat uznaje się jako czynniki prognostyczne skróconego czasu przeżycia w raku jajnika [161].

Wysoka ekspresja Egfl7 korelowała z niskim zróżnicowaniem nowotworu, ze stopniem zaawansowania choroby, przerzutami do węzłów chłonnych, wysokim stężeniem CA 125, zajęciem przestrzeni limfatycznej (LVSI), pozytywnymi wynikami wymazów z otrzewnej, z nieoptymalną cytoredukcją. Różnice w OS nie były istotne statystycznie pomiędzy grupą z wysokim i niskim poziomem ekspresji immunohistochemicznej Egfl7. Według autorów badania, czynnikiem ograniczającym mogła być liczba chorych objętych porównaniem podczas badania znaczenia prognostycznego (54 chore z potwierdzoną wysoką ekspresją Egfl7). Nie udało się chińskim badaczom wykazać niezależności prognostycznej dla wykrytego w analizie jednoczynnikowej związku pomiędzy wysoką ekspresją Egfl7 a czasem do wznowy choroby (PFS).

Warto zaznaczyć, że różnice pomiędzy badaniem własnym a pracą Chińczyków, dotyczą również sposobu definiowania czasów PFS i OS (Rozdział Materiał i metoda). W badaniu Oh i wsp. [161], OS określono jako czas od rozpoznania do śmierci z powodu raka jajnika – u nas do śmierci niezależnie od przyczyny. PFS Chińczycy zdefiniowali jako czas od rozpoznania do momentu potwierdzenia wznowy choroby [161].

Niezależnie od faktu, że w badaniu chińskim guzy SOC stanowiły mniej niż połowę wszystkich przypadków, należy dodatkowo zwrócić uwagę na istotne różnice w zaawansowaniu choroby, występującą w obu badaniach. W badaniu Oh i wsp. [161] zdecydowanie więcej pacjentek było we wczesnym stadium choroby – FIGO I i II (49,8%) W naszym badaniu odsetek takich przypadków wynosił zaledwie 15%.

Niniejsza monografia jest jedyną jak dotychczas pracą badawczą, poświęconą analizie ekspresji Egfl7 w jednorodnej histopatologicznie grupie raków jajnika, które dodatkowo odznaczają się tym samym (najwyższym) potencjałem złośliwości – HGSOE.

Mocną stroną jest weryfikacja histopatologiczna każdego preparatu przez dwóch niezależnych patologów, nie mających wiedzy klinicznej o losie pacjentów.

Podstawowym celem podjętych badań było ustalenie, czy w komórkach HGSOE występuje endogenna ekspresja Egfl7. W chwili stawiania sobie tego

celu badawczego, nie było jeszcze doniesień na ten temat, co wskazuje na podjęcie niezwykle aktualnego zagadnienia badawczego.

W naszym badaniu, ekspresję błonowo- cytoplazmatyczną Egfl7 stwierdziliśmy w 63 z 72 guzów pierwotnych HGSOE (86,3%). Tylko w 9 przypadkach (12,3%) była ona nieobecna (poniżej mediany HSCORE).

Ekspresja Egfl7 jest zatem częstą cechą tkanki rakowej, o nieokreślonej bliżej funkcji. W warunkach fizjologicznych Egfl7 produkowane przez komórki śródbłonna jest czynnikiem związanym z neoangiogenezą [67]. Trudno jest jednoznacznie wykluczyć lub potwierdzić takie działanie w odniesieniu do ekspresji tego biomarkera w komórkach HGSOE. Dlatego też badając znaczenie prognostyczne i korelację z wybranymi cechami kliniczno-patologicznymi, poszukiwaliśmy odpowiedzi, czy obecność Egfl7 jest korzystna czy niekorzystna w znaczeniu klinicznym.

Opierając się na kryteriach opisanych w rozdziale Materiał i metoda, badaną grupę guzów pierwotnych z dodatnią ekspresją błonowo-cytoplazmatyczną podzielono na dwie podgrupy: guzy o niskiej (34 z 63; 54%) i guzy o wysokiej ekspresji (29 z 63; 46%).

Porównanie cech kliniczno-patologicznych pacjentów (z uwzględnieniem czasów PFS i OS) mających guzy z wysoką i niską ekspresją Egfl7 nie wykazało żadnych istotnych statystycznie różnic w materiale własnym. Zatem ekspresja badanego biomarkera nie posiada znaczenia prognostycznego w HGSOE.

W naszym badaniu, w grupie 63 chorych, z ekspresją błonowo-cytoplazmatyczną, odnotowaliśmy 13 przypadków z ekspresją jądrową Egfl7 (20,6%). Jest to niezwykle ciekawa obserwacja, która wskazuje, że Egfl7 bierze aktywny udział w procesach transkrypcji jądrowej. Z tego też powodu uznaliśmy, że ta mała grupa chorych może wyróżniać się klinicznie w całej populacji badanej, jak też w grupie chorych, których tkanki raka miały dodatnią ekspresję błonowo-cytoplazmatyczną. Przeprowadziliśmy zatem odrębną analizę porównawczą dla pacjentek z ekspresją jądrową Egfl7 w komórkach HGSOE.

Pacjentki, u których komórki HGSOE wykazywały jądrową i cytoplazmatyczną ekspresję Egfl7, miały znamienne rzadziej wodobrzusze w porównaniu z kobietami nie posiadającymi w ogóle ekspresji Egfl7 (zarówno cytoplazmatycznej jak i jądrowej) w tkance rakowej. Wskazywać to może na nieznaną mechanizm z udziałem ekspresji jądrowej Egfl7, przeciwdziałający pojawianiu się wodobrzusza, które z kolei było czynnikiem prognostycznym skróconego czasu przeżycia OS i czasu do wznowy PFS, potwierdzonym w analizie jedno- i wieloczynnikowej w badanej grupie HGSOE. Nie wykazano, aby OS i PFS pacjen-

tek z grupy z ekspresją jądrową i cytoplazmatyczną różniły się od grupy nieposiadającej ekspresji Egfl7 w ogóle.

Poddane ocenie pacjentki, których tkanka raka wykazywała jądrową ekspresję Egfl7, miały znamienne wyższe poziomy przedoperacyjnego CA 125, oraz były częściej odporne na platynę w porównaniu z grupą kobiet, których rak posiadał wyłącznie cytoplazmatyczną ekspresję Egfl7. Dodatkowo, potwierdzono tę samą zależność w porównaniu z grupą wszystkich pacjentek bez ekspresji jądrowej, niezależnie od obecności ekspresji cytoplazmatycznej w komórkach raka.

Ta dodatkowa analiza potwierdza związek jądrowej ekspresji Egfl7 z występowaniem wysokich poziomów CA 125 i gorszą odpowiedzią na leczenie adiuwantowe, przy jednocześnie mniejszej skłonności do występowania wodobrzusza.

Pomimo wyraźnych związków statystycznych z niektórymi niekorzystnymi prognostycznie czynnikami kliniczno-patologicznymi, nie wykazano znaczenia prognostycznego dla jądrowej ekspresji Egfl7.

Związek Egfl7 z przeżyciem pacjentów i czasem do wznowy jest często przeciwny w badaniach dotyczących różnych typów nowotworów.

Niezależne od siebie analizy wykazały, że ekspresja Egfl7 ulega deregulacji w przebiegu raka jelita grubego u ludzi: wysoki poziom ekspresji transkryptów Egfl7 jest skorelowany z bardziej zaawansowanym stadium choroby oraz z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych. Nie wykazano jednak korelacji z całkowitym przeżyciem i przeżyciem wolnym od progresji [48].

Egfl7 ulega ekspresji w komórkach rakowych ludzkiego raka wątroby i wysokie poziomy ekspresji były związane ze skróceniem czasu przeżycia [242]. W grupie glejaków, wysokie poziomy Egfl7 w tkance guza korelowały z: stopniem zróżnicowania guza [97, 161], indeksem Ki 67 i gęstością naczyń mikrokrążenia [97].

Podsumowując związek pomiędzy ekspresją Egfl7 a czasem przeżycia chorych w różnych nowotworach złośliwych, większość badań pokazuje, że zwiększona ekspresja Egfl7 koreluje z wieloma niekorzystnymi czynnikami kliniczno-patologicznymi, do których przeważnie należą zaawansowanie choroby, przerzuty do węzłów chłonnych oraz niskie zróżnicowanie guza [49, 64, 97, 128, 242, 243].

Przeciwnie do wszystkich dotychczasowych wyników przyniosła publikacja z końca 2014 r., dotycząca raka piersi [63]. Jest to dotychczas jedyne badanie obecności Egfl7 w tym nowotworze, które dowodzi, że ekspresja Egfl7

obecna w komórkach raka piersi koreluje z wysokim stopniem zróżnicowania i lepszym rokowaniem pacjentów [63].

Co więcej, wykazano, że w rakach piersi ekspresja Egfl7 była wyższa w przypadku mniejszych zmian oraz w przypadku raka *in situ* [63]. W przypadkach z wysoką ekspresją Egfl7 odnotowano mniejszą tendencję do przerzutowania do węzłów chłonnych. Ekspresja Egfl7 zatem prawdopodobnie nie zapewnia przewagi wzrostu komórkom nowotworowym, które ją wytwarzają.

Mimo rozbieżnych doniesień, dotyczących związku ekspresji Egfl7 z cechami kliniczno-patologicznymi w przebiegu różnych typów nowotworów, do tej pory nie wykazano, aby ekspresja Egfl7 wpływała na długość przeżycia chorych w raku jajnika, raku okrężnicy, glejaku. Mamy zatem potwierdzone „ochronne” działanie w raku piersi, które z pewnością wymaga weryfikacji w przyszłych, niezależnych badaniach, oraz związek ze skróconym przeżyciem pacjentów w raku wątrobowokomórkowym [242].

Jedyną wspólną cechą odnotowaną podczas badań nad Egfl7 w tkance rakowej, niezależnie od jej typu, jest nieoczekiwana obecność tego biomarkera w komórkach raka (rakowa endogenna deregulacja Egfl7), oraz słaba reprezentacja w komórkach zrębu.

Istnieją nieliczne publikacje, które donoszą o powiązaniu ekspresji Egfl7 z mechanizmem ucieczki nowotworu spod nadzoru immunologicznego. Rakowa ekspresja Egfl7 promuje progresję nowotworu poprzez redukcję ekspresji endotelialnych molekuł adhezyjnych, co ogranicza diapedezę komórek układu odpornościowego w obrębie tkanki rakowej [47].

W niniejszym badaniu analizowaliśmy obecność komórek układu odpornościowego zarówno w surowicy chorych, jak i bezpośrednio w tkance HGSOE. Zmierzyliśmy przedoperacyjną liczbę wszystkich limfocytów krążących we krwi obwodowej oraz liczebność dwóch subpopulacji komórek immunokompetentnych naciekających nowotwór (TILs), takich jak: limfocyty cytotoksyczne CD 8+ oraz limfocyty pomocnicze CD 4+. W celu identyfikacji tych kluczowych efektorów odporności komórkowej, wykonano barwienia immunohistochemiczne, szczegółowo opisane w rozdziale Materiał i metoda.

Poziom ekspresji Egfl7 w każdej z badanych konfiguracji, nie korelował z liczebnością limfocytów CD8+ i CD4+ w gnieździe HGSOE. Jest to pośredni dowód na brak wpływu Egfl7 na diapedezę leukocytów. Egfl7 nie miała również związku z liczebnością limfocytów w krwi obwodowej.

Prowadzone badania przedkliniczne i kliniczne zakładają możliwość anty-angiogennej terapii antynowotworowej, przy użyciu przeciwciał anti-Egfl7

[157]. Są one ukierunkowane na określenie wpływu kombinowanej terapii, złożonej z przeciwciał anti-Egfl7 i bewacyzumabu, na unaczynienia guza i jego wzrost [157]. Oczekuje się, że terapia anti-Egfl 7 w połączeniu z terapią anti-VEGF umożliwi dodatkowe zahamowanie angiogenezy w przypadku większości typów raków.

W mojej ocenie stoimy jednak w punkcie, w którym rakowe Egfl7 może posiadać zupełnie inne funkcje niż proangiogenne Egfl7, obecne w endotelium. Znana jest powszechnie interakcja Egfl7 z molekułami adhezyjnymi. Być może jest to wyłącznie czynnik remodelujący architekturę tkanki rakowej.

Ocena gęstości naczyń w guzie i jej powiązanie z Egfl7, a także badania nad molekułami adhezyjnymi: ICAM oraz VCAM w HGSOc pozwolą w przyszłości sprawdzić czy „endotelialna” funkcja Egfl7 dotyczy tkanki rakowej.

6. WNIOSKI

1. Komórki HGSOc posiadają endogenną ekspresję Egfl 7 i jest to częsta cecha, występująca w 87,5% przypadków. Ma ona charakter błonowo-cytoplazmatyczny, któremu w części przypadków towarzyszy ekspresja jądrowa. Obecność Egfl7 w komórkach zrębu tkanki rakowej jest sporadyczna.
2. Egfl 7 nie koreluje z komórkami efektorowymi układu odpornościowego (CD8+ i CD4+), naciekającymi gniazda komórek rakowych oraz leukocytami krwi obwodowej.
3. Wykazano, że obecność jądrowej ekspresji Egfl7 koreluje z przedoperacyjnym poziomem surowiczego CA 125, oraz jest czynnikiem predykcyjnym gorszej odpowiedzi na chemioterapię adiuwantową.
4. Egfl7 nie ma znaczenia prognostycznego w badanej grupie chorych na HGSOc.

Ponadto, na podstawie analizy cech kliniczno-patologicznych w badanej grupie można stwierdzić:

1. Spadek wagi ciała pomiędzy operacją pierwotną a pierwszym cyklem chemioterapii jest czynnikiem prognostycznym skróconego czasu do wznowy i całkowitego czasu przeżycia pacjentów. Prawdopodobnie jest to związane z odnotowaną gorszą odpowiedzią na chemioterapię adiuwantową w tej grupie chorych.
2. Przedoperacyjna liczba neutrocytów w krwi obwodowej jest negatywnym czynnikiem prognostycznym w grupie chorych na HGSOc.
3. Czas oczekiwania na chemioterapię adiuwantową skraca okres wolny od progresji choroby, wyłącznie w grupie pacjentek zoperowanych nieoptymalnie.

7. PIŚMIENNICTWO

1. Aghajanian C, Blank SV, Goff BA, Judson PL, Teneriello MG, Husain A, Sovak MA, Yi J, Nycum LR: OCEANS: a randomized, double-blind, placebo- controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum – sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. *J. Clin. Oncol.* 2012, Jun 10, 30 (17), 2039 – 45.
2. Aletti GD, Dowdy SC, Gostout BS, Jones MB, Stanhope CR, Wilson TO, Odratz KC, Cliby WA.: Aggressive surgical effort and improved survival in advanced-stage ovarian cancer. *Obstet. Gynecol.* 2006; 107: 77-85.
3. Al-Hussaini M, Stockman A, Foster H, McCluggage WG.: WT-1 assists in distinguishing ovarian from uterine serous carcinoma and in distinguishing between serous and endometrioid ovarian carcinoma. *Histopathology* 2004, 44, 109–15.
4. Alida Klimp H., Hollema H., Kempinga C. et al. , Expression of Cyclooxygenase-2 and Inducible Nitric Oxide Synthase in Human Ovarian Tumors and Tumor-associated Macrophages, *Cancer Res.* 2001, 61, 7305-7309.
5. American College of Obstetricians and Gynecologists; ACOG Committee on Practice Bulletins – Gynecology; ACOG Committee on Genetics; Society of Gynecologic Oncologists. ACOG Practice Bulletin No. 103: Hereditary breast and ovarian cancer syndrome. *Obstet Gynecol* 2009; 113: 957- 966.
6. Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L i wsp.: Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 2006, 354, 34- 43.
7. Ayhan A, Gultekin M, Taskiran C i wsp. Routine appendectomy in epithelial ovarian carcinoma: is it necessary? *Obstet. Gynecol.* 2005, 105, 719.
8. Ayhan A, Kurman RJ, Yemelyanova A, et al. Defining the cut- point between low – and high – grade ovarian serous carcinomas: a clinicopathologic and molecular genetic analysis. *Am. J. Surg. Pathol.* 2009, 33, 1220 – 4.

9. Azab B, Shah N, Radbel J, Tan P, Bhatt V, Vonfrolio S, Habeshy A, Picon A, Bloom S (2013): Pretreatment neutrophil/lymphocyte ratio is superior to platelet/lymphocyte ratio as a predictor of long – term mortality in breast cancer patients. *Med. Oncol.* 30(1), 432.
10. Bachmann C, Kramer B, Brucker SY: Relevance of pelvic and para- aortic node metastases in early- stage ovarian cancer. *Anticancer Res.*, 2014 Nov, 34(11), 6735- 8.
11. Bacolod MD, Barany F.: Molecular profiling of colon tumors: the search for clinically relevant biomarkers of progression, prognosis, therapeutics, and predisposition. *Ann. Surg. Oncol.* 2011, 18, 3694-700.
12. Bamberg ES, Perrett CW.: Angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *J. Clin. Pathol.* 2002, 55, 348- 359.
13. Bast RC Jr, Knapp RC.: Use of the CA 125 antigen in diagnosis and monitoring of ovarian carcinoma. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1995, 129, 354 – 356.
14. Ben- David Y, Chetrit A, Hirsh- Yechezkel G I wsp.: Effect of BRCA mutations on the length of survival in epithelial ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* 2002, 2, 463- 466.
15. Beral V, Million Women Study Collaborators, Bull D, Green J, Reeves G.: Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study, *Lancet* 2007, 369, 1703-1710.
16. Berek JS.: Interval debulking of ovarian cancer – an interim measure. *N. Engl. J. Med.*, 1995, 332, 675- 677.
17. Boris J.N. Winterhoff, Kommoss S., Oberg A.L., et al.: Bevacizumab and improvement of progression – free survival (PFS) for patients with the mesenchymal molecular subtype of ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2014 ASCO Annual Meeting Abstracts Vol 32, No 15 suppl (May 20 Supplement), 2014, 5509.
18. Bourne TH, Campbell S, Steer C, Whitehead MI, Collins WP.: Transvaginal colour flow imaging: a possible new screening technique for ovarian cancer. *BMJ* 1989, 299, 1367 – 1370.
19. Brahimi- Horn C, Poussegur J.: The role of the hypoxia- inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull Cancer* 2006, 93, 73- 80.
20. Brinton LA, Gridley G, Persson I, Baron J, Bergqvist A: Cancer risk after a hospital discharge diagnosis of endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1997, 176, 572 – 9.

-
21. Bristow RE, Eisenhauer EL, Santillan A, Chi DS.: Delaying the primary surgical effort for advanced ovarian cancer: a systematic review of neoadjuvant chemotherapy and interval cytoreduction. *Gynecol. Oncol.* 2007, 104, 480- 490.
 22. Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK i wsp.: Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta- analysis. *J. Clin. Oncol.* 2002, 20, 1248- 1258.
 23. Buda A, Floriani I, Rossi R, et al.: Randomised controlled trial comparing single agent paclitaxel vs epidoxorubicin plus paclitaxel in patients with advanced ovarian cancer in early progression after platinum-based chemotherapy: an Italian Collaborative Study from the Mario Negri Institute, Milan, GONO (Gruppo Oncologico Nord Ovest) group and IOR (Istituto Oncologico Romagnolo) group. *Br. J. Cancer*, 2004, 90 (11), 2112– 2117.
 24. Burger RA, Brady MF, Bookman MA i wsp.: Phase III trial of bevacizumab (BEV) in the primary treatment of advanced epithelial ovarian cancer (EOC), primary peritoneal cancer (PPC), or fallopian tube cancer (FTC): A Gynecologic Oncology Group study. *J. Clin. Oncol.* 2010, 28: 18s (suppl) (abst LBA 1).
 25. Burnet M.: Cancer: a biologic approach. *Br. Med. J.* 1957, 1, 841–847.
 26. Buys SS, Partridge E, Black A, et al.: Effect of screening on ovarian cancer mortality: The Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *JAMA.* 2011, 305 (22), 2295- 2303.
 27. Buys SS, Partridge E, Greene MH, et al.: Ovarian cancer screening in the prostate, lung, colorectal and ovarian (PLCO) cancer screening trial: findings from the initial screen of a randomized trial. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2005, 193, 1630- 1639.
 28. Campagnolo L, Leahy A, Chitnis S, Koschnick S, Fitch MJ, Fallon JT, Loskutoff D, Taubman MB, Stuhlmann H: EGFL7 is a chemoattractant for endothelial cells and is up-regulated in angiogenesis and arterial injury. *Am. J. Pathol.* 2005, 167, 275- 284.
 29. Campagnolo L, Moscatelli I, Pellegrini M, Siracusa G, Stuhlmann H.: Expression of EGFL7 in primordial germcells and in adult ovaries and testes. *Gene Expr. Patterns* 2008, 8, 389- 96.

30. Chang SJ, Bristow RE.: Evolution of surgical treatment paradigms for advanced- stage ovarian cancer: redefining “optimal” residual disease. *Gynecol. Oncol.* 2012 May, 125(2), 483- 92.
31. Chen S, Parmigiani G.: Meta- analysis of BRCA-1 and BRCA 2 penetrance. *J. Clin. Oncol.* 2007, 25, 1329- 1333.
32. Chi DS, Eisenhauer EL, Lang J, Huh J, Haddad L, Abu-Rustum NR, et al.: What is the optimal goal of primary cytoreductive surgery for bulky stage IIIC epithelial ovarian carcinoma (EOC)? *Gynecol. Oncol.* 2006, 103, 559- 64.
33. Chiang AJ, Chen J, Chung YC, Huang HJ, Liou WS, Chang C. A longitudinal analysis with CA 125 to predict overall survival in patients with ovarian cancer. *J. Gynaecol. Oncol.*, 2014, 25 (1), 51- 7.
34. Cho H, Hur HW, Kim SW, Kim SH, Kim JH, Kim YT, Lee K (2009): Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio is elevated in epithelial ovarian cancer and predicts survival after treatment. *Cancer Immunol. Immunother.* 58(1), 15– 23.
35. Cho IR., Park JC., Park CH., Jo JH., Lee HJ., Kim S., Shim CN., Lee H., Shin SK., Lee SK., Lee YC.: Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio as a prognostic marker to predict chemotherapeutic response and survival outcomes in metastatic advanced gastric cancer. *Gastric Cancer*, 2014, 17 (4), 703- 10.
36. Cho Y., Miyamoto M., Kato K., Fukunaga A., Shichinohe T., Kawarada Y., Hida Y., Oshikiri T., Kurokawa T., Suzuoki M., Nakakubo Y., Hiraoka K., Murakami S., Shinohara T., Itoh T., Okushiba S., Kondo S., Katoh H.: T cell cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2003, 63, 1555-9.
37. Choi ES., Kim HS., Han I.: Elevated preoperative systemic inflammatory markers predict poor outcome in localized soft tissue sarcoma. *Ann. Surg. Oncol.* 2014, 21(3),778–785.
38. Cibula D., Widschwendter M., Majek O., Dusek L.: Tubal ligation and the risk of ovarian cancer: review and meta- analysis. *Hum. Reprod. Update*, 2011, 17 (1), 55- 67.
39. Cohen S., Mosig R., Moshier E., Pereira E., Rahaman J., Prasad- Hayes M., Halpert R., Billaud JN., Dottino P., Martignetti JA.: Interferon regulatory factor 1 is an independent predictor of platinum resistance and survival in high- grade serous ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 2014, 134 (3), 591- 8.

-
40. Wang Y., Liu P., Xu Y., Zhang W., Tong L., Guo Z., Ni H.: Preoperative neutrophil- to- lymphocyte ratio predicts response to first- line platinum- based chemotherapy and prognosis in serous ovarian cancer; *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2015, 75, 255- 262.
 41. Colombo N., Parma G., Lapresa MT.: Role of conservative surgery in ovarian cancer: the European experience. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 2005; 15 (Suppl 3), 206- 211.
 42. Connolly DT., Ferrara N., Brown LF. i wsp.: Human vascular permeability factor. Isolation from U 937 cells. *J. Biol. Chem.* 1989, 264, 20017- 20024.
 43. Coussens LM., Werb Z.: Inflammation and cancer. *Nature*, 2002, 420(6917), 860–867.
 44. Crawford SC, Vasey PA., Paul J., Hay A., Davis JA., Kaye SB.: Does aggressive surgery only benefit patients with less advanced ovarian cancer? Results from an international comparison within SCOTROC- 1 Trial. *J. Clin. Oncol.* 2005, 23, 8802- 8811.
 45. Dadabayev AR., Sandel MH., Menon AG., Morreau H., Melief CJ., Offringa R., van der Burg S.H., Janssen-van Rhijn C., Ensink N.G., Tolenaar R.A., van de Velde C.J., Kuppen P.J.: Dendritic cells in colorectal cancer correlate with other tumor infiltrating immune cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 2004, 53, 978-986.
 46. Dean E., El – Helw L., Hasan J.: Targeted therapies in epithelial ovarian cancer. *Cancer*, 2010; 2, 88- 113.
 47. Delfortrie S., Pinte S., Mattot V., et al.: Eglf7 promotes tumor escape from immunity by repressing endothelial cell activation. *Cancer Res.* 2011, 1, 71 (23), 7176- 86.
 48. Diaz R., Silva J., Garcia JM., Lorenzo Y., Garcia V., Pena C., et al.: De-regulated expression of miR-106a predicts survival in human colon cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer*, 2008, 47, 794- 802.
 49. Duffy M.J., Bonfrer J.M., Kulpa J. i wsp: CA 125 in ovarian cancer: European Group on Tumor Markers guidelines for clinical use. *Int. J. Gynecol Cancer* 2005, 15, 679- 691.
 50. Diaz- Padilla I., Razak AR., Minig L., Bernardini MQ., Maria Del Campo J.: Prognostic and predictive value of CA 125 in the primary treatment of epithelial ovarian cancer: potentials and pitfalls. *Clin. Transl. Oncol.* 2012, 14, 15- 20.

51. Dorjgochoo T., Shu X.O., Li H.L., Qian H.Z., Yang G., Cai H., Gao Y.T., Zheng W.: Use of oral contraceptives, intrauterine devices and tubal sterilization and cancer risk in a large prospective study, from 1996 to 2006. *Int. J. Cancer*, 2009; 124 (10), 2442- 2449.
52. Dorothee G., Vergnon I., El Hage F., Le Maux Chansac B., Ferrand V., Lécluse Y., Opolon P., Chouaib S., Bismuth G., Mami-Chouaib F.: In situ Sensory Adaptation of Tumor-Infiltrating T Lymphocytes to Peptide-MHC Levels Elicits Strong Antitumor Reactivity. *J. Immunol.* 2005, 174, 6888-6897.
53. Du Bois A., Quinn M., Thigpen T. i wsp.: 2004 consensus statements on the management of ovarian cancer: final document of the 3rd International Gynecologic Cancer Intergroup Ovarian Cancer Consensus Conference (GCIIG OCCC 2004). *Ann. Oncol.* 2005, 16, (Suppl 8): VIII 7-VIII 12.
54. Du Bois A., Reuss A., Paujude- Lauraine E. i wsp.: Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multi-center trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom(AGO- OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer* 2009, 115, 1234-1244.
55. Dubeau L.: The cell origin of ovarian epithelial tumors in the ovarian surface epithelium dogma: does the emperor have no clothes? *Gynecol Oncol.* 1999, 72, 437-442.
56. Dunn G.P., Koebel C.M., Schreiber R.D.: Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat. Rev. Immunol.* 2006, 6, 836-848.
57. Dunn G.P., Old L.J., Schreiber R.D.: The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004, 21, 137-148.
58. Einhorn N., Trope C., Ridderheim M. i wsp.: A systematic overview of radiation therapy effects in ovarian cancer. *Acta Oncol.* 2003, 42, 562-566.
59. EMA/ 858740/2011.
60. Engels K., Fox S.B., Whitehouse R.M., Gatter K.C. and Harris A.L.: Distinct angiogenic patterns are associated with high- grade in situ ductal carcinomas of the breast. *J. Pathol.* 1997, 181, 207-212.

61. Esteller M., Silva J.M., Dominguez G., et al.: Promoter hypermethylation is a cause of BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000, 92, 564-9.
62. Soncin F. et al.: VE – statin, an endothelial repressor of smooth muscle cell migration, *EMBO J.* 2003, 22, 5700-5711.
63. Fader A.N., Java J., Ueda S., Bristow R.E., Armstrong D.K., Bookman M.A., Gershenson D.M., Gynecologic Oncology Group (GOG): Survival in women with stage 1 serous ovarian carcinoma. *Obstet. Gynecol.* 2013, 22, 225-232.
64. Fan C., Yang L.Y., Wu F., Tao Y.M., Liu L.S., Zhang J.F., et al.: The expression of Egfl7 in human normal tissues and epithelial tumors. *Int. J. Biol. Markers* 2013, 28, 71-83.
65. Finch A., Shaw P., Rosen B., et al.: Clinical and pathological findings of prophylactic salpingo-oophorectomies in 159 BRCA1 and BRCA2 carriers. *Gynecol. Oncol.* 2006, 100, 58-64.
66. Fish J.E., Santoro M.M., Morton S.U., Yu S., Yeh R.F., Wythe J.D., Ivey K.N., Bruneau B.G., Stainier D.Y., Srivastava D.: miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev. Cell* 2008, 15, 272-284.
67. Fitch M.J., Campagnolo L., Kuhnert F., Stuhlmann H.: Egfl7, a novel epidermal growth factor- domain gene expressed in endothelial cells. *Dev. Dyn.* 2004, 230, 316-324.
68. Fox S.B., Gasparini G., Harris A.L.: Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth- factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. *Lancet Oncol.* 2001, 2, 278-289.
69. Fox S.B., Generali D.G. and Harris A.L.: Breast tumour angiogenesis. *Breast Cancer Res.* 2007, 9, 216.
70. Fox S.B., Leek R.D., Bliss J., Mansi J.L., Gusterson B., Gatter K.C. and Harris A.L.: Association of tumor angiogenesis with bone marrow micrometastases in breast cancer patients. *J. Natl. Cancer. Inst.* 1997, 89, 1044-1049.
71. Franceschi S., La Vecchia C., Booth M. i wsp., Pooled analysis of 3 European case- control studies of ovarian cancer II. Age at menarche and menopause. *Int. J. Cancer* 1991, 349, 57-60.
72. Franceschi S., Pazzini F., Negri E., Booth M., La Vecchia C., Beral V., et al.: Pooled analysis of 3 European case- control studies of ovarian cancer: III. Oral contraceptive use. *Int. J. Cancer* 1991, 49, 61-65.

-
73. Gasser S., Raulet D.H.: The DNA damage response arouses the immune system. *Cancer Res.* 2006, 66, 3959-3962.
 74. Geomini P., Kruitwagen R., Bremer G.L., Cnossen J., Mol B.W.: The accuracy of risk scores in predicting ovarian malignancy: a systematic review. *Obstet. Gynecol.*, 2009, 113, 384-394.
 75. Karlsen M.A., Sandhu N., Hogdall C. et al.: Evaluation of HE4, CA 125, risk of ovarian malignancy algorithm (ROMA) and risk of malignancy index (RMI) as diagnostic toolsof epithelial ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gyn. Oncol.* 2014, 127,2, 379- 383.; 113: 384-394.
 76. Gershenson D.M., Sun C.C., Lu K.H., et al.: Clinical behavior of stage II- IV low- grade serous carcinoma of the ovary. *Obstet. Gynecol.* 2006.108, 361-8.
 77. Gershenson D.M.: Fertility- sparing surgery for malignancies in women. *J. Natl. Cancer. Inst. Monogr.* 2005, 34, 43- 47.
 78. Gilks C.B., Prat J.: Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances. *Hum. Pathol.* 2009, 40, 1213-23.
 79. Globocan 2012, <http://globocan.iarc.fr/>
 80. Gordon A.N., Fleagle J.T., Guthrie D. i wsp.: Recurrent epithelial ovarian carcinoma: a randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin versus topotecan. *J. Clin. Oncol.* 2001, 19, 3312-3322.
 81. Górski B., Byrski T., Huzarski T. i wsp.: A high proportion of founder BRCA1 mutations in Polish breast cancer families. *Int. J. Cancer* 2004, 110, 683-686.
 82. Górski B., Lubiński J.: Gen BRCA1. *Genetyka kliniczna nowotworów* 2009. ISBN 9788360637449.
 83. Gourley C., McCavigan A., Perren T., et al. : Molecular subgroup of high- grade ovarian cancer (HGSOC) as a predictor of outcome following bevacizumab. *J. Clin. Oncol.* 2014, 32, 5s, (suppl; abstr 5502) ASCO Annual Meeting Abstracts, Abstract 5502.
 84. Granberg S., Wikland M., Jansson I.: Macroscopic characterization of ovarian tumors and the relation to the histological diagnosis: Criteria to be used for ultrasound evaluation. *GynecolOncol.* 1989, 35, 139-144.
 85. Greenblatt M., Shubick P.: Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J. Natl. Cancer Inst.* 1968, 41, 111-124.

-
86. Gridley G., McLaughlin J.K., Elibom A. i wsp. Incidence of cancer among patients with rheumatoid arthritis. *J. Natl. Cancer Inst.* 1993, 85, 307-311.
 87. Guidi A.J., Fischer L., Harris J.R. and Schnitt S.J.: Microvessel density and distribution in ductal carcinoma in situ of the breast. *J. Natl. Cancer Inst.* 194, 86, 614-619.
 88. Hanahan D., Weinberg R.A.: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011, 144, 646-674.
 89. Harter P., Gnauer K., Hills R. i wsp.: Pattern and clinical predictors of lymph node metastases in epithelial ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2007, 17, 1238.
 90. Heintz A.P.M., Odicino F., Maisonneuve P., Quinn M.A., Benedet J.L., Creasman W.T. et al.: Carcinoma of the ovary. 26th Annual Report of The Results of Treatment in Gynaecological Cancer. *Internat. J. Gynecol. Oncol* 2006, 95 (suppl 1), 161-192.
 91. Hofstetter A., Concin N., Braicu I., Chekarov R., Sehouli J. et al.: The time interval from surgery to start of chemotherapy significantly impacts prognosis in patients with advanced serous ovarian carcinoma- analysis of patient data in the prospective OVCAD study. *Gynecol. Oncol.* 2013, 131 (1), 15- 20.
 92. Hogg R., Friedlander M.: Biology of epithelial ovarian cancer: implications for screening women at high genetic risk. *J. Clin. Oncol.* 2004, 22, 1315-1327.
 93. Hopkins M.L., Fung M.F., Le T., Shorr R.: Ovarian cancer patients and hormone replacement therapy: a systematic review. *Gynecol. Oncol.* 2004, 92, 827-832.
 94. Hoskins W.J., McGuire W.P., Brady M.F., Homesley H.D., Creasman W.T., Berman M., et al.: The effect of diameter of largest residual disease on survival after primacy cytoreductive surgery in patients with suboptimal residual epithelial ovarian carcinoma. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1994, 170, 974- 979.
 95. Hreshchyshyn M., Park R., Blessing J. i wsp.: The role of adjuvant therapy in stage I ovarian cancer. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1980, 138-139.
 96. Huang C.H., Yuan X.R., Wan Y., Liu F., Zhan X., Li X.: VE- statin/ Egfl7 expression in malignant glioma and its relevant molecular network. *Int J Clin Exp Pathol* 2014, 7(3), 1022- 1031.

97. Huang CH, LiXJ, Zhou YZ, Luo Y, Li C, Yuan XR. Expression and clinical significance of Eglf7 in malignant glioma, *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136: 1737- 43.
98. Hunter V.J., Weinberg J.B., Haney A.F. i wsp.: CA 125 in peritoneal fluid and serum from patients with benign gynecologic conditions and ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1990, 36, 161-165.
99. Ibeanu O.A., Bristow R.E.: Predicting the outcome of cytoreductive surgery for advanced ovarian cancer: a review. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2010, 20, Suppl 1, 1- 11.
100. Ikeguchi M., Hirooka Y.: Interleukin-2 gene expression is a new biological prognostic marker in hepatocellular carcinomas. *Onkologie* 2005, 28, 255-9.
101. Jacobs I., Oram D., Fairbanks J. et al.: A risk of malignancy index incorporating CA 125, ultrasound and menopausal status for the accurate preoperative diagnosis of ovarian cancer. *Br. J. Obstet. Gynecol.* 1990, 97, 922-929.
102. Jain R.K.: Taming vessels to treat cancer. *Sci. Am.* 2008, 298, 56- 63.
103. Jain R.K.: Barriers to drug delivery in solid tumors. *Sci. Am.* 1994, 271, 58-65.
104. Jakóbisiak M., Lasek W.: Immunologia nowotworów. W: Gołąb J., Jakóbisiak., Lasek W., Stokłosa T. (red):Immunologia. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008, s 478-495.
105. Jemal A., Siegel R., Murray T., Hao Y., Xu J., Murray T., et al. : Cancer statistics, 2009, *CA Cancer J. Clin.* 2009, 59, 225- 49.
106. Jones S., Wang T.L., Shih Ie M., Mao T.L., Nakayama K., Roden R., Glas R., Slamon D., Diaz L.A., Jr, Vogelstein B., et al.: Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science*, 2010, 330, 228-231.
107. Kang S., Kim T.J., Nam B.H., i wsp.: Preoperative serum CA 125 levels and risk of suboptimal cytoreduction in ovarian cancer: a metanalysis. *J. Surg. Oncol.* 2010, 101, 13-17.
108. Katsumata N., Yasuda M., Takahashi F. i wsp. Dose- dense paclitaxel once a week in combination with carboplatin every 3- weeks for advanced ovarian cancer: a phase 3, open label, randomised controlled trial. *Lancet*, 2009, 374, 1331-1338.
109. Kim J.W., Tsukishiro T., Johnson J.T., Whiteside T.L.: Expression of pro- and antiapoptotic proteins in circulating CD8+ T cells of patients

- with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin. Cancer Res.* 2004, 10, 5101-10.
110. Kim J.W., Wieckowski E., Taylor D.D., Reichert T.E., Watkins S., Whiteside T.L.: Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin. Cancer Res.* 2005, 11, 1010-20.
 111. Kim R., Emi M., Tanabe K., Arihiro K.: Tumor driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res.* 2006, 66, 5527-5536.
 112. Kindelberger D., Lee Y., Miron A., et al. : Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: evidence for causal relationship. *Am. J Surg. Pathol.* 2007, 31, 161-169.
 113. Kipps E., Tan D.S., Kaye S.B.: Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nat.Rev.Cancer* , 2013, 13(4), 273-82.
 114. Kirchhoff C., Habben I., Ivell R., Krull N.: A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein, with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. *Biol. Reprod.* 1991, 45, 350- 357.
 115. Knauff N.D., Domchek S.M., Friebel T.M. i wsp.: Risk- reducing salpingo- oophorectomy for the prevention of BRCA1-and BRCA 2- associated breast and gynecologic cancer: a multicenter, prospective study. *J. Clin. Oncol.* 2008, 26, 1331- 1337.
 116. Köbel M., Kalloger S.E., Boyd N., et al. : Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies. *PLoS Med* 2008;5:e232.
 117. Kolasa I.K., Rembiszewska A., Janiec-Jankowska A., Dansonka-Mieszkowska A., Lewandowska A.M., Konopka B., Kupryjanczyk J.: Pten mutation, expression and loh at its locus in ovarian carcinomas. Relation to tp53, k-ras and BRCA1 mutations. *Gynecol. Oncol.* 2006, 103, 692-697.
 118. Kommoss S., Rochon J., Harter P., Heitz F., Grabowski J.P., Ewald-Reigler N., Habrstroh M., Neunhoeffler T., Barinoff J., Gomez R., Traut A., du Bois A.: Prognostic impact of additional extended surgical procedures in advanced-stage primary ovarian cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 2010, 17(1), 279-86.
 119. Krivak T.C., Darcy K.M., Tian C., et al. : Single nucleotide polymorphisms in ERCC1 are associated with disease progression, and survival

- in patients with advanced stage ovarian and primary peritoneal carcinoma; a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol. Oncol.* 2011,122(1),121-126.
120. Kubba L.A., McCluggage W.G., Liu J., et al. : Thyroid transcription factor-1 expression in ovarian epithelial neoplasms. *Mod. Pathol.* 2008, 21, 485-90.
121. Kurman R.J.: Origin and molecular pathogenesis of ovarian high- grade serous carcinoma. *Ann. Oncol.* 2013, 24, Suppl 10, 16-21.
122. Kurman R.J., Shih I.: The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: A proposed unifying theory. *Am. J. Surg. Pathol.* 2010, 34, 433-443.
123. Kurman R.J., Vang R., Junge J., et al.: Papillary tubal hyperplasia: the putative precursor of ovarian atypical proliferative (borderline) serous tumors, noninvasive implants, and endosalpingiosis. *Am. J. Surg. Pathol.* 2011, 35, 1605–14.
124. Kuss I., Hathaway B., Ferris R.L., Gooding W., Whiteside T.L.: Decreased absolute counts of T lymphocyte subsets and their relation to disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin. Cancer. Res.* 2004, 10, 3755-62.
125. Parker L.H. et al.: The endothelial-cell-derived secreted factor Egfl7 regulates vascular tube formation, *Nature* 2004, 428, 754–758.
126. Lacey J.V. Jr, Greene M.H., Buys S.S., et al.: Ovarian cancer screening in women with a family history of breast or ovarian cancer. *Obstet. Gynecol.* 2006, 108, 5, 1176- 1184.
127. Landrum L.M., Java J., Mathews C.A., Lanneau G.S., Copeland L.J., Armstrong D.K., Walker J.L.: Prognostic factors for stage III epithelial ovarian cancer treated with intraperitoneal chemotherapy: A Gynecologic Oncology Group study, *Gynecol. Oncol.* 2013, 130(1), 12-8.
128. Li J.J., Yang X.M., Wang S.H., Tang Q.L.: Prognostic role of epidermal growth factor- like domain 7 protein expression in laryngeal squamous cell carcinoma, *J. Laryngol. Otol.* 2011, 125, 1152- 7.
129. Papetti M., Herman I.M.: Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2002, 282 (5), 947–970.
130. Schmidt M. et al.: EGFL7 regulates the collective migration of endothelial cells by restricting their spatial distribution. *Development* 2007, 134 (16), 2913- 2923.

131. Schmidt M. et al.: The role of Egfl 7 in vascular morphogenesis. *Novartis Found Symp.* 2007; 283 18- 28; discussion 28-36, 238- 41.
132. MacKie R.M., Reid R., Junor B.: Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *N. Engl. J. Med.* 2003, 348, 567–568.
133. Malaguarnera G., Giordano M., Paladina I., Berretta M., Cappellani A., Malaguarnera M.: Serum markers of hepatocellular carcinoma. *Dig. Dis. Sci.* 2010, 55, 2744-55.
134. Malpica A., Deavers M.T., Lu K., et al.: Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. *Am. J. Surg. Pathol.* 2004, 28, 496–504.
135. Markman M., Federico M., Liu P.Y., Hannigan E., Alberts D.: Significance of early changes in the serum CA 125 antigen level on overall survival in advanced ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 2006, 103, 195- 8.
136. Markman M., Markman J., Webster K. i wsp.: Duration of response to second- line, platinum- based chemotherapy for ovarian cancer: implications for patients management and clinical trial design. *J. Clin. Oncol.* 2004, 22, 3120- 3125.
137. Markman M.: Single- agent carboplatin is the treatment of choice in recurrent, potentially platinum- sensitive epithelial ovarian cancer. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* 2002; 521- 523.
138. Markowska J., Manys G., Kubaszewska M.: Value of CA 125 as a marker of ovarian cancer. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 1992, 13, 360-5.
139. Memarzadeh S., Berek J.: Advances in the management of epithelial ovarian cancer. *J. Reprod. Med.* 2001, 46, 621-630.
140. Memarzadeh S., Lee S.B., Berek J.S., Farias- Eisner R.: CA 125 levels are a weak predictor of optimal cytoreductive surgery in patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2003, 13, 120- 124.
141. Michael J., Worley J., William R., Ross S., Shu- Wing N. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, 14(3), 5367-5379.
142. Ming C., Ying J., Yalan B., Jie Y., Yongxue W., Lingya P.: A survival analysis comparing women with ovarian low- grade serous carcinoma to those with high- grade histology, *Onco Targets Therapy* 2014, 7, 1891- 1899.
143. Montagnana M., Lippi G., Ruzzenente O. i wsp.: The utility of serum human epididymis protein 4 (HE4) in patients with a pelvic mass. *J. Clin. Lab. Anal.* 2009, 23, 331-335.

144. Moore R.G., Brown A.K., Miller M.C., Skates S., Allard W.J., Verch T., et al.: The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol.* 2007, 108, 402-408.
145. Moore R.G., McMeekin D.S., Brown A.K., et al.: A novel multiple marker bioassay utilizing HE 4 and CA 125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol. Oncol.* 2009, 112,(1), 40-46.
146. Morice P., Denschlag D., Rodolakis A. i wsp.: Recommendations of the Fertility Task Force of The European Society of Gynecologic Oncology about the conservative management of ovarian malignant tumors. *Int. J. Gynecol. Oncol. Cancer* 2011, 21, 951-963.
147. Muller A.J., Scherle P.A.: Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small molecule inhibitors. *Nat. Rev. Cancer.* 2006, 6, 613-625.
148. Mutch D.G., Orlando M., Goss T. i wsp.: Randomized Phase III Trial of Gemcitabine Compared With Pegylated Liposomal Doxorubicin in Patients With Platinum- Resistant Ovarian Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2007, 25, 2811-2818.
149. Mutter G.L., Prat J.: Pathology of the female reproductive tract, 3rd edition. New York, Elsevier, 2014, 580.
150. Naito Y., Saito K., Shiiba K., Ohuchi A., Saigenji K., Nagura H., Ohtani H.: CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998, 58, 3491-3494.
151. Nakano O., Sato M., Naito Y., Suzuki K., Orikasa S., Aizawa M.: Proliferative activity of intratumoral CD8+ T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res.* 2001, 61, 5132-5136.
152. National Institute for Health and Clinical Excellence: Ovarian cancer: The recognition and initial management of ovarian cancer. NICE clinical guideline 122. London, NICE; 2011.
153. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology V. 2010, Ovarian cancer including fallopian tube cancer and primary peritoneal cancer, www.nccn.org.
154. Negri E., Franceschi S., Tzonou A. i wsp.: Pooled analysis of 3 European case-control studies: I. Reproductive factors and risk of epithelial ovarian cancer. *Int. J. Cancer.* 1991, 49, 50-56.

155. Ness R.B., Grisso J.A., Cottreau C., Klapper J., Vergona R., Wheeler J.E., Morgan M., Schlesselman J.J.: Factors related to inflammation of the ovarian epithelium and risk of ovarian cancer. *Epidemiology* 2000, 11, 111-7.
156. Nezhat F., Datta M.S., Hanson V., Pejovic T., Nezhat C.: The relationship of endometriosis and ovarian malignancy: a review. *Fertil. Steril.* 2008, 90, 1559-70.
157. Nichol D., Stuhlmann H.: EGFL7: a unique angiogenic signaling factor in vascular development and disease. *Blood* 2012, 119, 1345-52.
158. Nikolic et al.: Egfl7 meets miRNA- 126: an angiogenesis alliance. *Journal of Angiogenesis Research* 2010, 2, 9.
159. Nowak-Markwitz E., Jankowska A., Spaczyński M.: Gonadotropiny a rak jajnika. *Ginekol. Pol.* 2005, 76, 153-162.
160. O'Donnell P.H., Gamazon E., Zhang W. et al.: Population differences in platinum toxicity as a means to identify novel genetic susceptibility variants. *Pharmacogenet. Genomics.* 2010, 20(5), 327–337.
161. Oh J., Park S.H., Lee T.S., Oh H.K., Choi J.H., Choi Y.S.: High expression of epidermal growth factor- like domain 7 is correlated with poor differentiation and poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer. *J. Gynecol. Oncol.* 2014, Vol. 25, No 4: 334- 341.
162. Ohno Y., Nakashima J., Ohori M., Hatano T., Tachibana M.: Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent predictor of recurrence in patients with nonmetastatic renal cell carcinoma. *J. Urol.* 2010, 184(3), 873–878.
163. Orlando L., Renne G., Rocca A., Curigliano G., Colleoni M., Severi G., Peruzzotti G., Cinieri S., Viale G., Sanna G., Goldhirsch A.: Are all high-grade breast cancers with no steroid receptor hormone expression alike? The special case of the medullary phenotype. *Ann. Oncol.* 2005, 16, 1094-9.
164. Palacios J., Gamallo C.: Mutations in the B- Catenin Gene (CTNNB1) in Endometrioid Ovarian Carcinomas. *Cancer Research* 1998, 58, 1344-1347.
165. Moorman P.G., Palmieri R.T., Akushevich L. I wsp.: Ovarian cancer risk factors in African- American and white women. *Am. J. Epidemiol* 2009, 170, 598- 606.
166. Parazzini F., Chatenoud L., Chiantera V., i wsp.: Population attributable risk for ovarian cancer, *Eur J Cancer* 2000; 36: 520-524.

-
167. Park J.Y., Kim D.Y., Suh D.S., Kim J.H., Kim Y.M., Kim Y.T. et al.: Outcomes of fertility sparing surgery for invasive epithelial ovarian cancer: oncologic safety and reproductive outcomes. *Gynecol. Oncol.* 2008, 110, 345-353.
 168. Parker W.H., Broder M.S., Liu Z., Shoupe D., Farquhar C., Berek J.S.: Ovarian conservation at the time of hysterectomy for benign disease. *Obstet. Gynecol.* 2005, 106 (2), 219-226.
 169. Parmar M.K., Ledermann J.A., Colombo N. i wsp.: Paclitaxel plus platinum- based chemotherapy versus conventional platinum- based chemotherapy in women with relapsed ovarian cancer: the ICON 4/ AGO – OVAR -2 trial. *Lancet* 2003, 361, 2099- 2106.
 170. Paulsen T., Marth C., Kaerh J. i wsp.: Effects of paclitaxel on CA 125 serum levels in ovarian cancer patients. *Gynecol. Oncol.* 2000, 76, 326-330.
 171. Pavlik E.J., DePriest P.D., Gallion H.H., Ueland F.R., Reedy M.B., Kryscio R.J., van Nagell J.R.: Ovarian volume related to age. *Gynecol. Oncol.* 2000, 77 410–412.
 172. Perren T., Swart A.C., Pfisterer J. i wsp.: A phase III randomized Gynaecologic Cancer Intergroup trial of concurrent bevacizumab and chemotherapy followed by maintenance bevacizumab, versus chemotherapy alone in women with newly diagnosed epithelial ovarian (EOC), primary peritoneal(PPC). *ESMO* 2010.
 173. Piek J., van Diest P., Zweemer R., et al.: Tubal ligation and risk of ovarian cancer. *Lancet* 2001, 358, 844.
 174. Pignata S., Scambia G., Lauria R.:A randomized multicenter phase III study comparing weekly versus every 3 weeks carboplatin (C) plus paclitaxel (P) in patients with advanced ovarian cancer (AOC): Multicenter Italian Trials in Ovarian Cancer (MITO-7)—European Network of Gynaecological Oncological Trial Groups (ENGOT-ov-10) and Gynecologic Cancer Intergroup (GCIG) trial. *J. Clin. Oncol.* 2013, 31 (suppl; abstr LBA5501).
 175. Plaxe S.C.: Epidemiology of low-grade serous ovarian cancer. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2008;198(4),459, e1–e8.
 176. Poorolajal J. Jenabi E., Masoumi S.Z.: Body mass index effects on risk of ovarian cancer: a meta- analysis. *Asian. Pac. J. Cancer. Prev.*, 2014, 15 (18), 7665- 7671.

-
177. Prat J., Ribe A., Gallardo A.: Hereditary ovarian cancer. *Hum. Pathol.* 2005, 36, 861–870.
 178. Pujade- Lauraine E., Wagner U., Aavall- Lundqvist E. i wsp.: Pegylated liposomal Doxorubicin and Carboplatin compared with Paclitaxel and Carboplatin for patients with platinum- sensitive ovarian cancer in late relapse. *J. Clin. Oncol.* 2010, 28, 3323-3329.
 179. Puls L.E., Duniho T., Hunter J.E. i wsp. : The prognostic implication of ascites an advanced stage ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 1996, 61, 109-112.
 180. Rebbeck T.R., Friebe T., Wagner T. i wsp.: Effect of short- term hormone replacement therapy on breast cancer risk reduction after bilateral prophylactic oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: the PROSE Study Group. *J. Clin. Oncol.* 2005, 23, 7804- 7810.
 181. Rebbeck T.R., Kauff N.D., Domchek S.M.: Meta- analysis of risk reduction estimates associated with risk- reducing salpingo- oophorectomy in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. *J. Natl. Cancer Inst.* 2009, 1, 31-35.
 182. Rekomendacje PTG dotyczące postępowania w guzach niezłośliwych i raku jajnika. *Ginekologia po dyplomie 2008*; wydanie specjalne, 164-169.
 183. Relf M., LeJeune S., Scott P.A., Fox S., Smith K., Leek R., Moghaddam A., Whitehouse R., Bicknell R. and Harris A.L.: Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res.* 1997, 57, 963-969.
 184. Riedinger J.M., Wafflart J., Ricolleau G., Eche N., Larbre H., Basuyau J.P., et al.: CA 125 half-life and CA 125 nadir during induction chemotherapy are independent predictors of epithelial ovarian cancer outcome: results of a French multicentric study. *Ann. Oncol.* 2006, 17, 1234-1238.
 185. Ries L.A.G., Melbert D., Krapcho M., et al.: SEER cancer statistics review, 1975–2004. Bethesda, MD: National Cancer Institute. (http://seer.cancer.gov/csr/1975_2004/). Based on November 2006 SEER data submission, posted to the SEERwebsite, 2007.
 186. Riman T., Dickman P., Nilsson S., Nordlinder H, Magnusson C.M., Persson I.R.: Some life- style factors and the risk of invasive epithelial

- ovarian cancer In Swedish women. *European Journal of Epidemiology* 2004, Vol 19, Issue 11, 1011-1019.
187. Risch H.A., Howe G.R.: Pelvic inflammatory disease and the risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1995, 54, 447-451.
 188. Risch H.A., McLaughlin J.R., Cole D.E., et al. : Population BRCA1 and BRCA2 mutation frequencies and cancer penetrances: a kin-cohort study in Ontario, Canada. *J. Natl. Cancer Inst.* 2006, 98 1694–706.
 189. Rivera C.M., Grossardt B.R., Rhodes D.J. i wsp.: Increased cardiovascular mortality after early bilateral oophorectomy. *Menopause* 2009, 16, 15- 23.
 190. Rose P.G., Blessing J.A., Mayer A.R., Homesley H.D.. Prolonged oral etoposide as second-line therapy for platinum-resistant and platinum-sensitive ovarian carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *J. Clin. Oncol.* 1998, 16(2), 405–410.
 191. Rulin M.C., Preston A.L.: Adnexal masses in postmenopausal women. *Obstet. Gynecol.* 1987, 70, 578-58.
 192. Ruoslahti E., Seppala M.: Alpha-Fetoprotein in cancer and fetal development. *Adv. Cancer Res.* 1979, 29, 275-346.
 193. Rustin G., van den Burg M., Griffin C. i wsp.: Early versus delayed treatment of relapsed ovarian cancer. *Lancet* 2011, 377, 380- 381.
 194. Rustin G., Bast R.C. Jr, Kelloff G.J. i wsp.: Use of CA 125 in clinical trial evaluation of new therapeutic drugs for ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 2004, 10, 3919-3926.
 195. Rustin G.J., Quinn M., Thigpen T. i wsp.: New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors (ovarian cancer). *J. Natl. Cancer. Int.* 2004, 96, 487-488.
 196. Rustin G.J., Marples M., Nelstrop A.E., Mahmoudi M., Meyer T.: Use of CA 125 to define progression of ovarian cancer in patients with persistently elevated levels. *JCO* 2001, Oct 15, 4054- 4057.
 197. Eisenkop S.M., Spirtos N. M., Friedman R.L., Lin W. M., Pisani A. L., and S. Perticucci: Relative influences of tumor volume before surgery and the cytoreductive outcome on survival for patients with advanced ovarian cancer: a prospective study. *Gynecologic Oncology* 2003, 90, 2, 390–396.

198. Salani R., Santillan A., Zahurak M.L. i wsp.: Secondary cytoreductive surgery for localized, recurrent epithelial ovarian cancer: analysis of prognostic factors and survival outcome. *Cancer* 2007, 109, 685.
199. Santillan A., Garg R., Zahurak M.L. i wsp.: Risk of epithelial ovarian cancer recurrence in patients with rising serum CA 125 levels within the normal range. *J. Clin. Oncol.* 2005, 23, 9338-9343.
200. Schmidt M.H.H., Bicker F., Nikolic I., Meister J., Babuke T., Picuric S., Muller W., Plate K.H., Dikic I.: Epidermal growth factor-like domain 7 (EGFL7) modulates Notch signalling and affects neural stem cell renewal. *Nat. Cell Biol.* 2009, 11, 873-880.
201. Schoell W.M., Pieber D., Reich O. i wsp.: Tumor angiogenesis as a prognostic factor in ovarian carcinoma. Quantification of endothelial immunoreactivity by image analysis. *Cancer* 1997, 80, 2257- 2262.
202. Schorge J.O., Modesitt S.C., Coleman R.L., et al. SGO White Paper on ovarian cancer: etiology, screening and surveillance. *Gynecol. Oncol.* 2010, 119 (1), 7-17.
203. Schumacher K., Haensch W., Roefzaad C., Schlag P.M.: Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res.* 2001, 61, 3932-3936.
204. Schwarz P.E., Rutherford T.J., Chambers J.T., Kohorn E.L., Thiel R.P.: Neoadjuvant chemotherapy for advanced ovarian cancer: long- term survival. *Gynecol. Oncol.* 1999, 72, 93-99.
205. Scully R.E., Young R.H., Clement P.B.: Tumors of the ovary, maldeveloped gonads, fallopian tube, and broad ligament. In: *Atlas of tumor pathology* , 3rd series, Fascicle 23, Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1998: 1-168.
206. Se I.K., Hee S.K., Tae H.K.: Impact of underweight after treatment on prognosis of advanced- stage ovarian cancer. *Journal of Immunology Research*, 2014, Art ID 349546.
207. Sharaiha R.Z., Halazun K.J., Mirza F., Port J.L., Lee P.C., Neugut A.I., Altorki N.K., Abrams J.A.: Elevated preoperative neutrophil:lymphocyte ratio as a predictor of postoperative disease recurrence in esophageal cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 2011, 18(12), 3362–3369.
208. Shibata K., Kikkawa F., Mika M., Suzuki Y., Kajiyama H., Ino K., Mizutani S.: Neoadjuvant chemotherapy for FIGO stage III or IV ovarian cancer: survival benefit and prognostic factors. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2003. 13. 587- 592.

209. Shih I., Kurman R.: Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am. J. Pathol.* 2004, 164, 1511-1518.
210. Shih I.M., Davidson B.: Pathogenesis of ovarian cancer: clues from selected overexpressed genes. *Future Oncol.* 2009, 5, 1641-1657.
211. Singer G., Oldt R., Cohen Y., et al.: Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 2003, 95, 484-6.
212. Singer G., Stöhr R., Cope L., et al.: Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis. A mutational analysis with immunohistochemical correlation. *Am. J. Surg. Pathol.* 2005, 29, 218-24.
213. Skaznik-Wikiel M.E., Sukumvanich P., Beriwal S. i wsp.: Possible use of CA 125 level normalization after third chemotherapy cycle in deciding on chemotherapy regimen in patients with epithelial ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2011, 21, 1013-1017.
214. Soncin F., Mattot V., Lionneton F., Spruyt N.: VE statin, an endothelial repressor of smooth muscle cell migration. *EMBO J* 2003, 22, 5700-5711.
215. Sun Y., Bai Y., Zhang F., Wang Y., Guo Y., Guo L.: miR-126 inhibits non-small cell lung cancer cells proliferation by targeting Egfr. *Biochemical and Biophysical Res Comm* 2010, 391, 3, 1483-1489.
216. Stuart G.C.E., Kitchener H., Bacon M. i wsp.: Gynecologic Cancer Inter Group (GCIG) Consensus Statement on Clinical Trials in Ovarian Cancer Report From the Fourth Ovarian Cancer Consensus Conference (GCIG OCCC 2004). *Ann. Oncol.* 2005, 16 Suppl 8, viii7-viii12.
217. Sznurkowski J.J. Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in gynecologic cancers. *Current Gynecologic Oncology*. 2012, 10, 150-156.
218. Timmerman D., Testa A.C., Bourne T., Ameye L., Jurkovic D., Van Holsbeke C., Paladini D., Van Calster B., Vergote I., Van Huffel S., Valentin L.: Simple ultrasound-based rules for the diagnosis of ovarian cancer. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 2008, 31, 681-690.
219. Timmerman D., Ameye L., Fischerova D., Epstein E., Melis G.B., Guerriero S., et al.: Simple ultrasound rules to distinguish between benign

- and malignant adnexal masses before surgery: prospective validation by IOTA group. *BMJ* 2010, 341, c6839.
220. Tixier H., Fraisse J., Chauflert F., Causeret S., Loustalot C., et al. Evaluation of pelvic posterior exenteration in the management of advanced-stage ovarian cancer. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2010, 28, 505-510.
221. Ueland F.R., DePriest P.D., Pavlik E.J., Kryscio R.J., and van Nagell J.R. Jr. Preoperative differentiation of malignant from benign ovarian tumors: the efficacy of morphology indexing and Doppler flow sonography. *Gynecologic Oncology* 2003, 91, 46-50.
222. Salem S., White L.M., Lai J.: Doppler sonography of adnexal masses: the predictive value of the pulsatility index in benign and malignant disease. *AIR* 1994, 163, 1147-50.
223. Uzzan B., Nicolas P., Cucherat M. and Perret G.Y.: Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res* 2004, 64, 2941-2955.
224. van Herpen C.M., van der Laak J.A., de Vries I.J., van Krieken J.H., de Wilde P.C., Balvers M.G., Adema G.J., De Mulder P.H.: Intratumoral recombinant human interleukin-12 administration in head and neck squamous cell carcinoma patients modifies locoregional lymph node architecture and induces natural killer cell infiltration in the primary tumor. *Clin. Cancer Res.* 2005, 11, 1899-909.
225. van Nagell J.R. Jr, Higgins R.V., Donaldson E.S., Gallion H.H., Powell D.E., Pavlik E.J., et al.: Transvaginal sonography as a screening method for ovarian cancer: a report of the first 1000 cases screened. *Cancer* 1990, 65, 573-577.
226. van Nagell J.R., DePriest P.D., Reedy M.B., Gallion H.H., Ueland F.R., Pavlik E.J., Kryscio R.J.. The efficacy of transvaginal sonographic screening in asymptomatic women at risk for ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 2000, 77, 350-6.
227. Sato S., Yokohama Y., Sakamoto T., Masayuki F.: Usefulness of mass screening for ovarian carcinoma using transvaginal ultrasonography, *Cancer* 2000, 89, 3, 582- 588.
228. van Solingen C., Seghers L., Bijkerk R., Duijs J.M., Roeten M.K., van Oeveren- Rietdijk A.M., Baelde H.J., Monge M., Vos J.B., de Boer H.C., Quax P.H., Rabelink T.J., van Zonneveld A.J.: Antagomir-mediated silencing of endothelial cell specific microRNA-126 impairs ischemia-induced angiogenesis. *J. Cell.Mol. Med.* 2009, 13,1577-1585.

-
229. Venn A., Watson L., Lumley J. i wsp.: Breast and ovarian cancer incidence after fertility and in vitro fertilization. *Lancet* 1995, 346, 99-100.
 230. Vergote I., Amant F., leunen K. i wsp.: Intraperitoneal chemotherapy in patients with advanced ovarian cancer: the con view. *Oncologist* 2008, 13, 410-414.
 231. Vergote I., De Brabanter J., Fyles A., Bertelsen K., Einhorn N., Sevela P., et al.: Prognostic importance of degree of differentiation and cyst rupture in stage I epithelial ovarian carcinoma. *Lancet* 2001, 357, 176-182.
 232. Vergote I., Trope C.G., Amant F. i wsp.: Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIC or IV ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 2010, 363, 943- 953.
 233. Risau W.: Mechanisms of angiogenesis, *Nature* 1997,386 (6626), 671–674.
 234. Walsh S.R., Cook E.J., Goulder F., Justin T.A., Keeling N.J.: Neutrophil-lymphocyte ratio as a prognostic factor in colorectal cancer. *J. Surg. Oncol.* 2005, 91(3),181–184.
 235. Weidner N., Folkman J., Pozza F., Bevilacqua P., Allred E.N., Moore D.H., Meli S. and Gasparini G.: Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J. Natl. Cancer. Inst.* 1992, 84, 1875-1887.
 236. Weidner N., Semple J.P., Welch W.R. and Folkman J.: Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 1991, 324, 1-8.
 237. Wiegand K.C., Shah S.P., Al- Agha O.M. i wsp.: ARID 1A mutations in endometriosis- associated ovarian carcinomas. *N. Engl. J. Med.* 2010, 363, 1532-1543.
 238. Willett C.G., Boucher Y., di Tomaso E. i wsp.: Direct evidence that the VEGF- specific antibody bevacizumab has antivasculature effects in human rectal cancer. *Nat. Med.* 2004, 10, 145- 147.
 239. Williams K.A., Labidi-Galy S.I., Terry K.L., Vitonis A.F., Welch W.R., Goodman A., Cramer D.W.: Prognostic significance and predictors of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2014, 132(3), 542-550.
 240. Winter W.E. 3rd, Maxwell G.L., Tian C. i wsp.: Prognostic factors for stage III epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study, *J. Clin. Oncol.* 2007, 25, 3621.

-
241. Wojciechowska U., Didkowska J., Zatoński W.: Nowotwory złośliwe w Polsce w 2008 roku. Centrum Onkologii- Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Warszawa 2010.
 242. Wu F., Yang L.Y., Li Y.F., Ou D.P., Chen D.P., Fan C.: Novel role for epidermal growth factor like domain 7 in metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009, 50, 1839-50.
 243. Wang W., Wu F., Fang F., Tao Y.M.: RhoC is essential for angiogenesis induced by hepatocellular carcinoma cells via regulation of endothelial cell organization. *Cancer Sci.* 2008, 99, 2012- 2018.
 244. Xue P., Kanai M., Mori Y., Nishimura T., Uza N., Kodama Y., Kawaguchi Y., Takaori K., Matsumoto S., Uemoto S., Chiba T.: Neutrophil-to-lymphocyte ratio for predicting palliative chemotherapy outcomes in advanced pancreatic cancer patients. *Cancer Med.* 2014, 3, 2, 406-415.
 245. Young R.C., Decker D.G., Wharton J.T., Piver M.S., Sindelar W.F., Edwards BK, et al.: Staging laparotomy in early ovarian cancer. *JAMA* 1983, 250, 3072- 3076.
 246. Zou W.: Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat. Rev. Cancer.* 2005, 5, 263–274.

8. STRESZCZENIE

Tytuł: Immunohistochemiczna ocena ekspresji Egfl7 w tkance surowiczego raka jajnika.

Wstęp

Rak jajnika cechuje się najwyższą śmiertelnością spośród wszystkich nowotworów złośliwych żeńskiego układu rozrodczego. Najczęstszym w heterogennej grupie raków jest typ surowiczy o niskim stopniu zróżnicowania (*High Grade Serous Ovarian Carcinoma* – HGSOC). Oprócz uznanych metod leczenia trwają poszukiwania nowych terapii, zwiększających szanse przeżycia chorych.

Czynnik podobny do czynnika wzrostu naskórka z domeną 7 (Egfl7) to ważny regulator angiogenezy w warunkach fizjologicznych i procesach patologicznych. Potwierdzono ekspresję Egfl7 w komórkach niektórych nowotworów złośliwych. W kilku z nich odnotowano korelację z cechami złośliwości raka oraz negatywne znaczenie prognostyczne. Pojawiły się doniesienia sugerujące, że rakowe Egfl7 może promować ucieczkę nowotworu spod nadzoru immunologicznego poprzez negatywny wpływ na diapedezę leukocytów. Obecność tego biomarkera nie była dotychczas oceniana w HGSOC.

Cel

Celem pracy było zbadanie, czy tkanka niskozróżnicowanego surowiczego raka jajnika (HGSOC) wykazuje endogenną ekspresję Egfl7 oraz czy jej poziom koreluje z liczbą komórek efektorowych układu odpornościowego (CD4+ i CD8+) naciekających gniazda komórek rakowych, a także określenie związku ekspresji Egfl7 z wybranymi cechami kliniczno-patologicznymi chorych wraz ze zbadaniem znaczenia prognostycznego.

Materiał i metoda

Badaniem objęto tkanki HGSOC pobrane od 73 pacjentek leczonych operacyjnie w Oddziale Ginekologii Onkologicznej Gdyńskiego Centrum Onkologii w latach 2007-2012 z powodu pierwotnego raka jajnika. Żadna z pacjentek nie otrzymywała chemioterapii neoadiuwantowej. Koniec obserwacji ustalono na 30.06.2014r.

W pierwszym etapie projektu oceniono strukturę badanej grupy oraz wybrane cechy kliniczno-patologiczne pod kątem znaczenia ich prognostycznego oraz wzajemnych korelacji.

Egfl7 oceniano za pomocą immunohistochemii w pełnych preparatach, uzyskanych po skrojeniu archiwalnych blozków parafinowych. Przed oznaczeniami materiał tkankowy był zweryfikowany przez dwóch niezależnych pato-

morfologów, nie posiadających wiedzy klinicznej o pacjentach, w celu potwierdzenia HGSOc.

Do oceny stopnia ekspresji posłużono się metodą półilościową (HSCORE).

Zbadano, jaki jest rozkład ekspresji *Egfl7* w tkance rakowej i czy komórki HGSOc posiadają własną endogenną ekspresję. Ekspresja była też oceniana pod kątem lokalizacji w komórce, tzn. czy ma charakter błonowy, cytoplazmatyczny czy jądrowy.

Za pomocą oznaczeń immunohistochemicznych zidentyfikowano komórki efektorowe układu odpornościowego, naciekające gniazda rakowe: limfocyty pomocnicze CD4+ oraz cytotoksyczne CD8+. Do oceny intensywności naciekania wykorzystano metodę ilościową.

Do określenia różnicy pomiędzy zmiennymi ilościowymi w różnych podgrupach nowotworu wykorzystano *test U-Manna-Whitneya*, natomiast pomiędzy zmiennymi jakościowymi – testy Fishera. Korelację oceniano za pomocą współczynnika korelacji rang Spearmana z oceną wiarygodności.

Analizę znaczenia prognostycznego poszczególnych czynników klinicznych przeprowadzono, wykorzystując metodę Kaplana-Mayera z testem F-Coxa dla zbadania wiarygodności. Dla zmiennych, znamienne wpływających na przeżycie, obliczono jednoczynnikowe modele regresji proporcjonalnego ryzyka Coxa. Dla wszystkich zastosowanych testów przyjęto obustronny poziom istotności $p < 0,05$.

Wyniki

Mediana czasu obserwacji chorych wynosiła 47,25 miesiąca. W badanej grupie mediana czasu wolnego od progresji choroby (PFS) oraz mediana czasu całkowitego przeżycia pacjentów (OS) wyniosły odpowiednio 10,23 i 26,75 miesiąca.

Analiza cech kliniczno-patologicznych wykazała, że wyselekcjonowana do badań populacja chorych z HGSOc odpowiada pod względem struktury innym kohortom, opisywanym wcześniej w literaturze medycznej.

Wykazano, że komórki HGSOc posiadają endogenną ekspresję *Egfl7*. Stwierdzono występowanie ekspresji: błonowo-cytoplazmatycznej, która była obecna w 63 z 73 guzów pierwotnych HGSOc (86,3%). Osobną podgrupę (13/63, 20,6%) stanowiły guzy z dodatkowym odczyn jądrowym.

Przeprowadzona analiza ujawniła, że poziom ekspresji *Egfl7* nie korelował z liczebnością limfocytów CD8+ i CD4+ naciekających gniazda HGSOc.

Porównanie cech kliniczno-patologicznych pacjentów, mających guzy z wysoką i niską ekspresją *Egfl7* nie wykazało żadnych istotnych różnic. Pacjentki z obu grup nie różniły się także czasem PFS ani OS. Ekspresja cytopla-

zmatyczna badanego biomarkera nie posiadał znaczenia prognostycznego w HGSOC w badanej grupie chorych.

Pacjentki, u których komórki HGSOC wykazywały jądrową ekspresję Egfl7, miały znamienne rzadziej wodobrzusze w porównaniu z kobietami nie posiadającymi w ogóle ekspresji Egfl7 (zarówno cytoplazmatycznej jak i jądrowej) ($p=0,04$).

Pacjentki, których tkanka raka posiadała ekspresję jądrową Egfl7, miały znamienne wyższe przedoperacyjne poziomy CA 125 ($p=0,04$), oraz częściej były odporne na platynę w porównaniu z grupą kobiet, których komórki raka wykazywały wyłącznie ekspresję cytoplazmatyczną ($p=0,04$) oraz w porównaniu do wszystkich pozostałych niezależnie od obecności odczynu cytoplazmatycznego ($p=0,04$).

Nie wykazano, aby obecność jądrowej ekspresji w tkance HGSOC korelowała z czasem PFS i OS.

Podsumowanie

Komórki HGSOC posiadają endogenną ekspresję Egfl7 i jest ona częstą cechą. Ma charakter błonowo-cytoplazmatyczny, któremu w części przypadków towarzyszy odczyn jądrowy. Obecność jądrowej ekspresji Egfl7 koreluje z przedoperacyjnym poziomem CA 125 w surowicy oraz jest czynnikiem predyktoryjnym gorszej odpowiedzi na chemioterapię adiuwantową. Egfl7 nie koreluje z liczebnością komórek efektorowych układu odpornościowego (CD8+ i CD 4+) naciekających gniazda komórek rakowych. Nie wykazano znaczenia prognostycznego Egfl 7 w badanej grupie chorych na HGSOC.

9. SUMMARY

Title: Immunohistochemical expression of Egfl7 within high grade serous ovarian cancer (HGSOC) tissue.

Background

Ovarian cancer is the most lethal tumor among the gynecological malignancies. Besides improvements in treatment strategies such as surgery, combination chemotherapy, intraperitoneal chemotherapy and targeted molecular therapy, in the past decade, research has increasingly focused on the role of immunological mechanisms in ovarian cancer. More insight in the interaction between ovarian cancer and the immune system is needed to develop more effective anti-tumor immunotherapy.

Epidermal growth factor like domain 7 (Egfl7) is a secreted protein specifically expressed by endothelial cells in normal tissues and by malignant cells in various human tumors. It's expression has not yet been analyzed in human high grade serous ovarian cancer (HGSOC) tissue. Data from several studies indicated the correlation between Egfl7 and poor prognosis, It has been concluded that cancer Egfl7 promotes tumor escape from immunity by a novel mechanism based on repressing endothelial cell activation.

Aim

The aim of this study is to analyze expression of Egfl7 in high grade serous ovarian cancer tissue and it's impact on the number of immune cells (effectors: CD8+, CD4+) infiltrating cancer nests. If Egfl7 turned out to be expressed by ovarian cancer cells and decrease the number of tumor infiltrating lymphocytes (TILs), it could constitute a new target for interfering with this immune escape. The secondary aim was to evaluate the prognostic significance of Egfl7 and it's potential correlation with clinico-pathological features of HGSOC.

Methods

Patients and specimens

We studied 73 patients with primary HGSOC who had been treated at the Department of Gynaecological Oncology, Cancer Center, Red Cross Hospital in Gdynia between December 2007 and December 2012. All patients were treated primarily with surgery, and most of them received adjuvant chemotherapy

Clinical data were obtained from the medical records and from the questionnaires designed specifically for this study and completed personally by the

patients or by their relatives. Histopathological data were obtained by a blind review of all samples retrieved from the archives for the purpose of the study.

The histological analyses and immunohistochemical staining were performed on formalin fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue samples consisting of 73 primary tumours

Antibodies

Mouse anti-human monoclonal antibody against Egfl7, CD8 and CD4 were used.

Immunohistochemistry

The immunohistochemical staining for biomarkers was performed

The results of immunohistochemistry were evaluated by two independent pathologists who did not have access to the clinical data.

Egfl7 expressing tumors were classified qualitatively in accordance to intensity of staining (HSCORE). The number of CD8+ and CD4+ cells was counted exclusively within primary tumor cancer cell nest. For each case the mean index of CD8+ and CD4+ cells per single high power field was counted and then statistically analyzed.

The statistical analysis was performed using chi-square test or Fisher's exact probability test, Kruskal-Wallis test. Correlations and differences between variables were assessed using the Spearman's rank correlation coefficient. Overall survival curves were estimated by the Kaplan-Meier method and compared by the two-sided log-rank test. P-values of <0.05 were regarded as significant in all of the analysis. All analyses were performed with the statistical software Statistica 10 (Stat Soft Inc.).

Research plan

Egfl7 expression was analyzed in human serous ovarian cancer tissue (paraffin embed). Infiltration of TILs (CD8+, CD4+) was counted exclusively within serous ovarian cancer nests (paraffin embeded). Egfl7 expression (cancer/cancer endothelial cells) was addressed with the number of particular subtypes of TILs: CD4+, CD8+. The correlation between Egfl7 and clinico-pathological features was evaluated as well as prognostic significance was assessed.

Results

Egfl7 is expressed by the cancer cells within HGSOC tissue. Endothelial expression of this biomarker was sporadic. Cancer cell presented two patterns of staining: cytoplasmic only in 63/73 cases (86,3%) and in 13 cases with cytoplasmic pattern additional nuclear expression was notified.

Cytoplasmic expression of Egfl7 was not correlated with any of clinic-pathological features as well as with prognosis.

The presence of cytoplasmic/nuclear staining within HGSOC predicts worse response for chemotherapy and correlates with increased serum levels of CA125.

We analyzed infiltration of immune cells within cancer nests (intraepithelial infiltration). Egfl7 expression was not correlated with the intensity of intraepithelial (ITE) CD8+ and CD4+ cells within cancer nests

Conclusion:

Egfl7 in HGSOC is frequently observed and is mainly expressed by the cancer cells rather than cells of the stroma.

The impact of cancer endogenous Egfl7 expression on diaporesis seems to be questionable as it was not correlated with number of adaptive immune effectors (CD8+ and CD4+ lymphocytes) within cancer nests.

Cancer nuclear staining of Egfl7 predicts worse response for adjuvant chemotherapy and is correlated with increased levels of CA 125.