

Tomasz Milczek

Ocena przydatności oznaczenia ploidi DNA oraz odsetka komórek w fazie S przy użyciu cytometrii przepływowej jako czynnika prognostycznego u chorych leczonych z powodu raka jajnika.

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem

Prof. dr hab. med. Janusza Emericha

*W Klinice Ginekologii Instytutu Położnictwa i Chorób Kobięcych
Akademii Medycznej w Gdańsku*

Gdańsk 2005

SPIS TREŚCI

1. Wstęp	4-25
1.1 Rak jajnika	5-15
1.1.1 Klasyfikacja guzów złośliwych jajnika pochodzenia nabłonkowego według WHO oraz częstość występowania	5
1.1.2 Patogeneza	5-6
1.1.3 Epidemiologia	6-7
1.1.4 Objawy kliniczne	8
1.1.5 Badania diagnostyczne	8-9
1.1.6 Leczenie	10-11
1.1.7 Czynniki prognostyczne	11-15
1.2 Podstawy cytometrii przepływowej	16-19
1.2.1 Rys historyczny	16
1.2.2 Zasada działania cytometru przepływowego	17-18
1.2.3 Zastosowanie cytometrii przepływowej.....	18-20
1.3 Znaczenie ploidii DNA w nowotworach ludzkich	20-25
1.3.1 Cykl komórkowy i ocena DNA w cytometrze przepływowym	20-22
1.3.2 Ploidia DNA w litych nowotworach ludzkich	23-25
2. Cel pracy	26
3. Materiał i metody	27-36
3.1 Charakterystyka chorych	27-33
3.2.1 Przechowywanie materiału tkankowego	34
3.2.2 Przygotowanie materiału do analizy w cytometrze przepływowym	34
3.2.3 Opis metody	34-35

3.2.4	Oznaczanie ploidi DNA i odsetka komórek w fazie S przy użyciu cytometru przepływowego	35
3.2.5	Interpretacja wyników badania.....	35
3.2.6	Metody statystyczne	36
4.	Wyniki	37-60
4.1.1	Ploidia DNA, odsetek komórek w fazie S a wiek badanych	38
4.1.2	Ploidia DNA, odsetek komórek w fazie S a typ histologiczny raka jajnika...	38
4.1.3	Ploidia DNA, odsetek komórek w fazie S a stopień zróżnicowania histopatologicznego.....	39
4.1.4	Ploidia DNA, odsetek komórek w fazie S a stopień zaawansowania klinicznego nowotworu.....	39-40
4.1.5	Ploidia DNA, odsetek komórek w fazie S a doszczętność pierwotnej operacji cytoredukcyjnej	40-41
4.1.6	Ploidia DNA, odsetek komórek w fazie S a wynik operacji sprawdzającej....	42
4.1.7	Ploidia DNA, odsetek komórek w fazie S a odpowiedź na chemioterapię pierwszego rzutu.....	43
4.2	Analiza czynników ryzyka	44-46
4.3	Analiza przeżycia	47-64
5.	Dyskusja	65-72
5.1	Odsetek nowotworów aneuploidalnych	65-67
5.2	Wiek jako czynnik rokowniczy, występowanie nowotworów z aneuploidalną populacją komórek w zależności od wieku	67-68
5.3	Stopień zaawansowania nowotworu według FIGO jako czynnik rokowniczy. Występowanie nowotworów z aneuploidalną zawartością komórek w poszczególnych stopniach zaawansowania oraz wpływ ploidi na rokowanie.....	68-69

5.4	Stopień zróżnicowania histopatologicznego nowotworu jako czynnik rokowniczy. Wpływ ploiddii DNA na rokowanie w poszczególnych stopniach zróżnicowania histopatologicznego.....	69-70
5.5	Typ histologiczny jako czynnik rokowniczy. Wpływ ploiddii DNA na rokowanie w poszczególnych typach histologicznych.....	70-71
5.6	Ploidia DNA jako niezależny czynnik rokowniczy. Wpływ ploiddii DNA na przeżycia chorych w zależności od doszczętności pierwotnej operacji cytoredukcyjnej. Wpływ ploiddii DNA na wynik operacji sprawdzającej typu SLO.....	71
	Odpowiedź na chemioterapię I rzutu jako niezależny czynnik rokowniczy. Wpływ ploiddii DNA na przeżycia chorych w zależności od odpowiedzi na chemioterapię I rzutu.....	71-72
5.8	Faza S	72
6.	Wnioski	73
7.	Streszczenie	74-77
8.	Piśmiennictwo	78-88
9.	Wykaz używanych w tekście skrótów.....	89-90

1. WSTĘP

Rak jajnika jest szóstym pod względem częstości występowania a jednocześnie jednym z nowotworów powodujących największą śmiertelność u kobiet w Polsce. Zgodnie z danymi statystycznymi występuje stały wzrost zachorowalności na nowotwory jajnika (29). Choroba ma jednak zróżnicowaną częstość występowania u różnych ras i na różnych kontynentach (82). Standaryzowany współczynnik zachorowalności wahał się na świecie w latach 1988-1992 od 0,7 w Mali (Bamako) do 19,9 w Kanadzie (Yukon). Polska pod względem zachorowalności zajmuje pośrednie miejsce w świecie, ze standaryzowanym współczynnikiem zachorowalności 10,1 w roku 2000, co w liczbach bezwzględnych wyniosło 2859 nowych zachorowań na rok (29, 82, 100). Umieralność z powodu jajnika w Polsce stale wzrasta. Wzrost ten jest różny w poszczególnych dekadach, jednak jest wolniejszy, niż wzrost zachorowalności (29, 153). Pomimo poprawy przeżywalności w latach osiemdziesiątych, Polska z wynikiem 24,5% jest krajem o najniższym odsetku 5-letnich przeżyć spośród szesnastu krajów europejskich biorących udział w badaniu Eurocare. W badaniu tym średnia europejska 5-letnich przeżyć wyniosła 32,9% (7, 82, 147). Pomimo wprowadzania coraz nowszych sposobów leczenia, uzyskiwane na świecie wyniki są w dalszym ciągu niezadowolające. Pięcioletnie przeżycie chorych na raka jajnika w latach 1993-1995 wyniosło 48,4%, natomiast w latach 1996-1998 spadło do 46,4% (10, 102). Obliczono, że w USA (Stany Zjednoczone Ameryki Północnej) z powodu tego nowotworu zachoruje 1 na 55 kobiet, a co setna umrze (18). Dlatego, prócz poszukiwania optymalnych sposobów leczenia, prowadzone są badania nad lepszym wykorzystaniem klasycznych i wykryciem nowych czynników prognostycznych (82). Podczas jedenastego spotkania ESGO (European Society of Gynaecological Oncology) podjęto próbę usystematyzowania wiedzy na temat czynników rokowniczych w raku jajnika i podkreślono konieczność prowadzenia dalszych badań tego zagadnienia (9).

1.1 RAK JAJNIKA

Duża różnorodność komórek tworzących jajnik warunkuje ogromne zróżnicowanie typów nowotworów powstających w obrębie tego narządu. Nowotwory wywodzące się z nabłonka pokrywającego jajnik i podścieliska są najliczniejszą grupą pierwotnych nowotworów jajnika. Stanowią one 60% wszystkich guzów jajnika i około 80-90% złośliwych nowotworów jajnika (15, 30).

1.1.1 Klasyfikacja guzów złośliwych jajnika pochodzenia nabłonkowego według WHO (1971) oraz częstość występowania

Rak surowiczy - 49,7%

Rak endometrialny -17,3%

Rak niezróżnicowany -14,7%

Rak śluzowy -13,3%

Rak jasnokomórkowy -5,0%

Raki z komórek przejściowych, płaskonabłonkowe, niesklasyfikowane, nabłonkowe mieszane stanowią łącznie ułamek procenta (15, 122).

1.1.2 Patogeneza

Wśród hipotez dotyczących powstania raka jajnika wymienia się przyczyny hormonalne, dietetyczne, konstytucjonalne, otyłość, wiek, czynniki środowiskowe, wiek rodzenia i czynniki rodzinne. Obecnie najbardziej prawdopodobną teorią powstania raka jajnika jest koncepcja „bezustannej owulacji” przedstawiona w roku 1971 przez Fathala (40, 41, 111). Zakłada ona, że przez wielokrotne owulacje i wielokrotne obmywanie nabłonka pokrywającego jajnik płynem pęcherzykowym bogatym w estrogeny, dochodzi w wyniku kumulacji urazów do proliferacji nabłonka i transformacji nowotworowej. Dodatkowo wysokie poziomy gonadotropin w okresie okołomenopauzalnym mają zwiększać ryzyko powstania raka jajnika (21). Inna hipoteza o mutagennym wpływie owulacji zakłada, że po owulacji tworzy się torbielka inkluzyjna, powstająca w wyniku naprawy pękniętego nabłonka przez komórki otaczające. W torbielce inkluzyjnej zostają uwięzione komórki nabłonka, a w tych komórkach pod wpływem niekorzystnych czynników środowiska może być inicjowany proces karcinogenezy (3). Inni autorzy podejrzewali związek pomiędzy

owulacjami a mutacją genu supresorowego p53, lecz nie udało się potwierdzić tej zależności (82). Dotychczasowe obserwacje potwierdzają, że ilość owulacji ma statystycznie znamienne wpływy na ryzyko zachorowania na nowotwór nabłonkowy jajnika. Zaobserwowano zwiększoną częstość występowania raka jajnika u kobiet, które miały wczesnie menarche i późno menopauzę oraz u nieródek (2, 42). Również laktacja poprzez hamowanie owulacji wywiera działanie ochronne (2). Innym czynnikiem, mającym wpływ na obniżenie częstości występowania raka jajnika, jest stosowanie doustnej antykoncepcji hormonalnej. Jej działanie z jednej strony ma polegać na hamowaniu owulacji, a z drugiej na blokowaniu wydzielania gonadotropin przysadkowych: FSH (folitropiny) i LH (lutropiny). Wysoki poziom tych gonadotropin może wiązać się ze wzrostem zapadalności na raka jajnika (2, 58). Ochronny wpływ pojawia się po 6 miesiącach stosowania antykoncepcji hormonalnej, a utrzymuje się przez 10 lat po jej zakończeniu i jest obserwowany u wszystkich ras niezależnie od szerokości geograficznej (82). Podnoszona jest również teoria o wpływie zapaleń w obrębie miednicy na proces onkogenezy - „teoria zapalna” (93). Znalazła ona pośrednie potwierdzenie przez odnotowanie spadku zapadalności na raka jajnika u kobiet leczonych przewlekłe aspiryną z różnych powodów. Innym pośrednim dowodem jest spadek zachorowalności na raka jajnika w grupie pacjentek, u których wykonano operacyjne podwiązanie jajowodów, jednostronne usunięcie przydatków, lub wycięcie macicy bez przydatków, zmniejszając w ten sposób ekspozycję jajników na czynniki zapalne (82, 93). Rodzinne występowanie raka jajnika jest jednym z najważniejszych czynników etiologicznych. Chorobę można dziedziczyć jako: rodzinne występowanie raka jajnika, zespół raka sutka i raka jajnika i jako zespół Lynch II. Wyniki rodowodów rodzin z rodzinnie występującym rakiem jajnika wskazują na dziedziczenie autosomalne dominujące (108). Według Houlstona, który przebadał 462 rodowody kobiet za pomocą analizy segregacyjnej, 74-79 % kobiet dziedziczących skłonność do raka jajnika rozwinię chorobę w przeciągu swojego życia (58). Wykazano, że rak jajnika wywodzi się z pojedynczego klonu komórkowego, co uzasadnia profilaktyczne usunięcie narządu rodowego po ukończonym rozrodzie w grupie pacjentek z rodzinnym występowaniem raka jajnika obciążonych genetycznie (62, 114).

1.1.3 Epidemiologia

Zachorowalność na raka jajnika stale wzrasta w świecie, jest różna w poszczególnych regionach geograficznych i dla różnych grup etnicznych (80). Najwyższą zachorowalność na raka jajnika stwierdzono w Ameryce Północnej i Europie Południowej, najniższą w Azji.

Najwyższy standaryzowany współczynnik zachorowalności stwierdzono w Yukon w Kanadzie -19,9, najniższy w Mali w Afryce - 0,7. W Europie wysoką zachorowalność stwierdzono w Austrii - 15,1, krajach skandynawskich około -14, na Litwie- 13,4 oraz w Anglii -12,4. Najniższą w niektórych rejonach Hiszpanii- 6,5. Polska należy do państw o średnim standaryzowanym współczynniku zachorowalności – 10,1 w 2000 roku. Wzrósł on w porównaniu z rokiem 1963, kiedy to wynosił - 5,9. Region gdański jest jednym z najbardziej zagrożonych w Polsce. Wskaźnik zachorowalności w tym regionie w 1994 roku osiągnął 16,4 (152). W Polsce w roku 2000 rak jajnika zajmował szóste miejsce wśród nowotworów złośliwych po raku sutka, jelita grubego, płuca, szyjki i trzonu macicy i stanowił 5,4% wszystkich zachorowań na nowotwory złośliwe u kobiet (29). Podobnie w USA znajduje się na szóstym miejscu i stanowi 4 % nowotworów złośliwych (108). Współczynnik umieralności na raka jajnika w Polsce stale rośnie. W latach 1963-2000 wzrósł od 3,2 do 6,7, wzrost ten jest jednak wolniejszy od wzrostu współczynnika zachorowalności. Odsetek 5-letnich przeżyć u pacjentek chorych na raka jajnika wzrastał stopniowo od 1963 roku - 29,4%, 1981 - 37,3%, by w latach osiemdziesiątych nieco się obniżyć 1988 - 34,7% (148). Polska w latach 1985-1989 według Eurocare osiągnęła ostatnie miejsce spośród państw biorących udział w badaniu z odsetkiem 5-letnich przeżyć 24,5%. Średnia w Europie wyniosła w tym czasie 32,9%. Współczynnik 5-letnich przeżyć we wszystkich stopniach zaawansowania klinicznego według Międzynarodowej Federacji Ginekologów i Położników (FIGO) w latach 1993-1995 wyniósł 48,4% i wykazuje stałą tendencję wzrostową od lat 1958-1962, kiedy wyniósł tylko 26,8 % (10). Współczynnik umieralności, tak jak ryzyko zachorowania na raka jajnika w Polsce, rośnie wraz z wiekiem (147). Według National Cancer Institute częstość występowania raka jajnika rośnie po 40 roku życia, by osiągnąć swój szczyt pomiędzy 75. a 79. rokiem życia. Średni wiek w chwili wykrycia choroby wynosi 61 lat w USA, a na świecie 53 lata (104, 108). Kobiety najbardziej narażone na wystąpienie raka jajnika to te (82, 108):

- u których choroba wystąpiła już w rodzinie,
- mieszkające w krajach wysoko uprzemysłowionych,
- będące w wieku powyżej 40 lat,
- żyjące w dobrych warunkach socjoekonomicznych,
- nieródki,
- które nie stosowały środków antykoncepcyjnych,
- miały trudności z zajściem w ciążę,

- prawdopodobnie te, które stosowały środki stymulujące jajczkowanie.

1.1.4 Objawy kliniczne

Jedną z głównych przyczyn dużej śmiertelności w raku jajnika jest fakt braku wczesnych objawów tej choroby. W 1983 roku Sigurdson nazwał raka jajnika „cichym zabójcą”. 70% pacjentek zgłasza się do lekarza w III lub IV stopniu zaawansowania klinicznego choroby według FIGO. Przebieg choroby długo pozostaje bezobjawowy, a niespecyficzne skargi dotyczą głównie dolegliwości w obrębie przewodu pokarmowego. Chore lekceważą niewielki dyskomfort w jamie brzusznej lub szukają pomocy u lekarzy innych specjalności (31, 46, 47). W miarę postępu choroby dochodzi do powiększenia obwodu brzucha z powodu narastania wysięku otrzewnowego wypełniającego całą jamę brzuszną, lub wzrostu guza. Na tym etapie choroby pojawia się silny ból brzucha spowodowany rozciąganiem powłok przez płyn wysiękowy lub guz. Do obrazu klinicznego dołącza się duszność i coraz silniejsze objawy dyspeptyczne. W tym czasie kobiety świadomie ograniczają spożycie pokarmów, co powoduje większe wyniszczenie organizmu. W tym okresie choroby około 70% pacjentek trafia do oddziałów chirurgicznych (35).

1.1.5 Badania diagnostyczne

W diagnostyce guzów jajnika duże znaczenie ma badanie ultrasonograficzne. Stwierdzenie w badaniu wykonanym sondą dopochwową wielokomorowej torbieli o nieregularnej grubości ściany, z licznymi wewnętrznymi wyrostkami, nasuwa podejrzenie zmiany złośliwej (13). Ważnych informacji o hemodynamice guza jajnika dostarcza badanie ultrasonograficzne z wykorzystaniem efektu Dopplera. Wykazano wyższą wartość średniego współczynnika oporu naczyniowego (RI) w łagodnych guzach jajnika ($RI=0,818$) w porównaniu z nowotworami jajnika o granicznej złośliwości i nowotworami złośliwymi ($RI=0,418$) (51). Ocena ultrasonograficzna cech morfologicznych, połączona z oceną hemodynamiki guza jajnika, zwiększa wykrywalność raków jajnika (36). Tomografia komputerowa jest uzupełnieniem badań ultrasonograficznych. Pozwala ona, nawet u osób otyłych, wykryć zmiany o średnicy około 1 cm oraz pozwala na odróżnienie części składowych guza (119). Magnetyczny rezonans jądrowy (MRI) jest metodą o bardzo dużej czułości, jednak w badaniu pierwotnych nowotworów jajnika nie charakteryzuje się większą czułością ani specyficznością od tomografii komputerowej. MRI z powodu możliwości wykonywania

badania w różnych sekwencjach jest bardzo przydatny w diagnozowaniu nawrotów procesu nowotworowego (119). Nowszym sposobem obrazowania, opartym na właściwościach metabolicznych a nie morfologicznych, jest positron emission tomography (PET). Metoda ta bazuje na zwiększonym wychwytywaniu izomeru glukozy znakowanego izotopami emitującymi pozytony przez tkanki o podwyższonym metabolizmie glukozy np. tkanki nowotworowe. Izomer glukozy nie może być metabolizowany w tkance docelowej ani nie jest przepuszczany przez błony komórkowe. Izotopy ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , wchodzące w skład izomeru, emitują pozytony. Po zderzeniu pozytonu z elektronem, emitowane są dwa fotony. Fotony te są wychwytywane przez detektory umieszczone wokół badanego. PET całego ciała jest w stanie wykazać zmiany o średnicy nie mniejszej od 1 cm (59). Podjęto próby wprowadzenia PET jako metody wykrywania wczesnych zmian nowotworowych i różnicowania zmian łagodnych od złośliwych w miednicy małej. Metoda ta wydaje się być jednak zbyt mało czuła i mało specyficzna w porównaniu do tomografii komputerowej, magnetycznego rezonansu jądrowego i ultrasonografii (48). Obrazowanie przy wykorzystaniu PET może służyć do wykrywania zmian nawrotowych lub przetrwałych w raku jajnika, szczególnie u chorych z podwyższonym stężeniem antygenu CA 125 (154). Przydatność tej metody jest jednak kwestionowana przez innych autorów (78). Obecnie wykonano zbyt mało badań na dużych grupach pacjentek, aby móc postawić jednoznaczne wnioski (48, 79).

W związku z wysokimi kosztami, brakiem możliwości powszechnego wykorzystania oraz niewielką czułością i specyficznością diagnostyki obrazowej, poszukuje się bardziej czułych, swoistych i tańszych testów, wykorzystując inne dziedziny nauki. Od czasu, kiedy stworzono możliwość produkcji przeciwciał monoklonalnych, poszukuje się swoistych antygenów nowotworowych (73). Fakt, że do tej pory ich nie wykryto, wynika według Kirchnera z tego, że guzy silnie immunogenne są we wczesnym stadium eliminowane przez układ odpornościowy (72). Dlatego wszystkie poznane do tej pory substancje, oznaczane w surowicy krwi, są to tak zwane antygeny towarzyszące guzom. Wraz z innymi substancjami biochemicznymi: hormonami, białkami, enzymami, produkowanymi przez komórki nowotworowe lub przez tkanki w odpowiedzi na inwazję guza, noszą wspólną nazwę: markerów nowotworowych. Wydzielane są one do płynów tkankowych i krwioobiegu w następstwie rozpadu komórek lub złuszczenia błon komórkowych. Opisano wiele różnych markerów charakterystycznych dla raka jajnika, między innymi: CA 19-9, COX1, CASA, CA72, 4, TPS, TPA; żaden z nich jednak nie spełnia kryteriów idealnego markera. Część dlatego, że nie są wystarczająco swoiste i czułe, inne - ponieważ ich przydatność nie została

wystarczająco udokumentowana. Jedynym markerem o wysokiej czułości 80-100% i swoistości 75-95% jest antygen CA 125 (16, 95). Obecnie CA 125 jest uznawany za najlepszy marker raków jajnika, z wyłączeniem raka śluzowego (31, 96). Stężenie CA 125 w I stopniu zaawansowania zazwyczaj pozostaje w granicach normy, dlatego marker uznany jest za mało przydatny w diagnostyce przedoperacyjnej. Jego wartość jest znacznie większa w kontroli wyników leczenia i wczesnej diagnostyce nawrotu choroby (81, 91, 92). Dołączenie innych markerów nowotworowych do oznaczenia CA 125 zwiększa czułość i swoistość badań (81).

1.1.6 Leczenie

Leczenie raka jajnika jest postępowaniem wieloetapowym. Jedynie raki o stopniu zaawansowania Ia, Ib i stopniach zróżnicowania G1, G2, z wyłączeniem raka jasnokomórkowego, pod warunkiem dokonania poprawnego stagingu, mogą być leczone wyłącznie chirurgicznie. W takich przypadkach nie ma konieczności stosowania chemioterapii jako leczenia uzupełniającego (6, 9, 133, 137). Podstawowym zabiegiem we wczesnej postaci raka jajnika jest proste wycięcie macicy z przydatkami, wycięcie sieci większej oraz wyrostka robaczkowego, pobranie wycinków z wszystkich miejsc podejrzanych, wymazów i popłuczyn z jamy brzusznej (5, 128). W wyjątkowych wypadkach, u pacjentek młodych, które chcą zachować płodność, przy niektórych rodzajach raka, (szczególnie w raku śluzowym), stosuje się zabieg oszczędzający. Leczenie oszczędzające polega na pozostawieniu drugiego niezmiennego jajnika i macicy przynajmniej do czasu ukończenia rozrodu. Postępowanie takie wymaga pobrania wycinków z pozostawianego jajnika (108, 128, 149). Leczenie zaawansowanego raka jajnika wymaga współdziałania lekarzy różnych specjalności. Podstawowym postępowaniem jest pierwotna operacja cytoredukcyjna (primary cytoreductive surgery), mająca na celu zmniejszenie masy guza. Za optymalną operację przyjmuje się taką, po której średnica zmian nie przekracza 20 mm (23). Udaje się to osiągnąć tylko u 33% leczonych w III stopniu zaawansowania klinicznego według FIGO. Po operacji pierwotnej stosuje się chemioterapię opartą na taksanach i pochodnych platyny (5, 83, 104). Jeżeli z jakichś względów wykonanie pierwotnej operacji cytoredukcyjnej nie jest możliwe, stosuje się chemioterapię indukcyjną: 2-3 cykle, a następnie wykonuje się operację cytoredukcyjną I (ICS -interval cytoreductive surgery I) (139). Po zakończeniu wielolekowej chemioterapii systemowej, pacjentki dla potrzeb klinicznych dzieli

się na dwie grupy (149). Pierwszą stanowią kobiety, u których po zastosowanej chemioterapii stwierdzono objawy choroby (bez okresu wolnego), druga to pacjentki, u których następuje nawrót choroby po okresie regresji (bez objawów choroby). W obu tych grupach, w zależności od oceny przedoperacyjnej czynników predykcyjnych przeprowadza się wtórną operację cytoredukcyjną II (secondary cytoreductive surgery SCS) (33, 149). Po uzyskaniu świadomej zgody pacjenta, po ukończeniu chemioterapii przeprowadza się operację sprawdzającą typu „second look” (SLO) (1). Obecnie jednak stwierdza się coraz rzadsze jej wykonywanie poza ośrodkami prowadzącymi badania kliniczne (10, 101). Bezpośrednią konsekwencją operacji SLO może być wtórna operacja cytoredukcyjna II (secondary cytoreductive surgery SCS). Stosowanie wtórnej cytoredukcji, pomimo że wartość jej wydaje się udowodniona, nie jest wszędzie uznawane (33, 57). Innym problemem jest operacja paliatywna. Wykonuje się ją u pacjentek, którym można w ten sposób poprawić jakość życia (6, 34). Laparoscopia w raku jajnika nie stanowi standardowej metody leczenia i jest dopuszczalna jedynie w programach naukowych, a ośrodki, które ją stosują, dysponują możliwością rozszerzenia zabiegu i wykonania operacji cytoredukcyjnej (149). Po wykonaniu operacji cytoredukcyjnej i chemioterapii pierwszego rzutu, w przypadku przetrwałej choroby nowotworowej stosuje się chemioterapię drugiego rzutu (2nd line). Istnieją alternatywne metody podawania chemioterapii drugiego rzutu: chemioterapia systemowa, dootrzewnowa (78, 88, 142). Do chemioterapii drugiego rzutu u pacjentek, u których nastąpiła wznowa procesu nowotworowego w okresie krótszym niż 6 miesięcy od leczenia pierwotnego i u tych, u których wystąpiła przetrwała choroba nowotworowa, stosuje się inny schemat leczenia niż zastosowany w leczeniu pierwszego rzutu (80). Radioterapia w raku jajnika jest coraz rzadziej stosowana (10, 102). Inne sposoby leczenia, jak: chemioterapia dużymi dawkami leków, hipertermiczna przepływowa chemioterapia dootrzewnowa, leczenie hormonalne, wspomaganie leczenia za pomocą interferonu, leków hamujących neoangiogenezę, są na etapie badań klinicznych (33, 149).

1.1.7 Czynniki prognostyczne

Poznanie czynników ryzyka daje możliwość wyodrębnienia, spośród chorych kwalifikowanych do leczenia uzupełniającego, grupy z niekorzystnymi czynnikami prognostycznymi. W grupie tej będą wskazania do bardziej agresywnej chemioterapii

z zastosowaniem nowych programów leczenia. Pozostali chorzy nie muszą być poddawani tak agresywnemu leczeniu (56, 105, 126).

Czynniki prognostyczne w raku jajnika, takie jak: stopień zaawansowania klinicznego według FIGO, stopień zróżnicowania histopatologicznego, wiek chorych, doszczętność pierwszej operacji cytoredukcyjnej, są czynnikami powszechnie uznanymi. Na ich podstawie podejmowana jest decyzja o sposobie postępowania. Prowadzone są również dalsze badania, mające na celu określenie dodatkowych czynników prognostycznych (9, 77, 130).

Stopień zaawansowania klinicznego według FIGO

Uważany jest on obecnie za podstawowy czynnik prognostyczny. Procent 5-letnich przeżyć w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego w latach 1993-1995 wyniósł na świecie: Ia – 89,9, Ib-84,7, Ic- 80,0, IIa- 69,9, IIb-63,7, IIc-66,5, IIIa- 58,5, IIIb- 39,9, IIIc-28,7 IV- 16,8 (10). Podział FIGO w raku jajnika został zaproponowany w roku 1964, a po raz ostatni zmodyfikowany w Rio de Janeiro w roku 1988. Ustalany jest na podstawie badania klinicznego, obrazu jamy brzusznej stwierdzonego podczas zabiegu operacyjnego, ostatecznego rozpoznania histopatologicznego. Celem właściwego określenia stopnia zaawansowania klinicznego zaleca się: przeprowadzenie wymazów cytologicznych z wielu miejsc otrzewnej, pobranie wycinków z otrzewnej krezki jelit, otrzewnej przepony, jak też wycięcie pojedynczych niezmiennych węzłów chłonnych z miednicy mniejszej oraz węzłów okołoaortalnych. Integralną częścią stagingu jest zdjęcie radiologiczne klatki piersiowej (9, 10, 77, 102).

Słabą stroną podziału według FIGO jest konieczność rygorystycznego przestrzegania zasad stagingu. Pomimo wielu publikacji na temat sposobów ustalania stopnia zaawansowania klinicznego stwierdzono, że poprawny staging jest wykonywany u 97% operowanych przez ginekologów onkologów, u 52% operowanych przez ginekologów (nie ginekologów onkologów) i tylko u 35% operowanych przez chirurgów (125). Prawidłowo wykonany staging chirurgiczny pozwala na zastosowanie odpowiedniego leczenia i uniknięcie leczenia uzupełniającego u tych chorych, u których nie jest ono konieczne (99, 104, 105).

Zróżnicowanie histopatologiczne

Dzieli się ono na 4 grupy: Gx - kiedy stopień zróżnicowania nie może być ustalony, G1 - nowotwór dobrze zróżnicowany (komórki niezróżnicowane poniżej 5%), G2 - średnio zróżnicowany (komórki niezróżnicowane poniżej 50%), G3 - nowotwór niezróżnicowany

(komórki niezróżnicowane ponad 50%). Uważa się, że chore z dobrze zróżnicowanym rakiem mają znamienne dłuższe przeżycia (32, 76, 124). Jak wykazały badania randomizowane, stopień zróżnicowania ma szczególne znaczenie w I^o zaawansowania według FIGO, gdzie ma on wpływ na wdrożenie lub zaniechanie leczenia uzupełniającego (150). Pomimo dużej liczby publikacji opisujących wartość tego czynnika prognostycznego, do tej pory nie został całkowicie zaakceptowany jednolity system stopniowania (9, 123). Obecnie najpowszechniej używane są: system Broders'a, system oparty na stopniu atypii jąder komórkowych, na stopniowaniu różnic w architekturze komórek oraz systemy oparte na kombinacji cech architektury komórek i atypii jąder komórkowych (9). Jak wykazują badania, wszystkie opisane systemy stopniowania są subiektywne i w znacznym stopniu zależne od oceny badającego (9, 104). Ponadto, według literatury, nie ma zgodności co do tego, czy taki sam system stopniowania można zastosować do każdego typu histologicznego nowotworu (9). Z powyższych powodów podejmuje się próby stworzenia bardziej powtarzalnego i obiektywnego systemu jak morfometria i cytometria (104).

Doszczędność pierwotnego zabiegu cytoredukcyjnego, choroba resztkowa. Chirurg jako czynnik ryzyka.

Stwierdzono na podstawie licznych badań klinicznych, że radykalność pierwotnej operacji cytoredukcyjnej jest niezależnym czynnikiem ryzyka, a niepozostawienie zmian większych niż 20 mm znacznie przedłuża okres wolny od progresji oraz przeżycie chorych. Obecnie jednak wielu autorów zaleca przyjęcie za doszczętną operacji cytoredukcyjnej, ukończoną bez pozostawienia zmian makroskopowych (32, 50, 89, 139). Stwierdzono w wielu retrospektywnych badaniach, że zabiegi cytoredukcyjne muszą być wykonywane przez doświadczony zespół, w ośrodkach wykonujących zabiegi z zakresu ginekologii onkologicznej (9). W takich miejscach operacja jest nieodpowiednio wykonana tylko u 3 procent operowanych. Dla porównania, gdy operuje ginekolog - u 48 procent, a gdy operuje chirurg - u 65 procent leczonych. Jeśli zabieg pierwotny był wykonany w innym ośrodku niż referencyjny, to pacjentka powinna być skierowana do ośrodka referencyjnego celem ustalenia odpowiedniego postępowania (99).

Wiek

Na podstawie wielu badań, między innymi Gynaecologic Oncology Group (GOG), na 2000

pacjentek stwierdzono, że wiek jest czynnikiem prognostycznym, a pacjentki młodsze mają dłuższy czas przeżycia w porównaniu od tych w wieku powyżej 69 lat (10, 32, 102, 132.).

Czynniki, których wartość jako czynników prognostycznych nie jest ostatecznie potwierdzona

Typ histologiczny

Pomimo iż część badaczy dowodzi, że rak surowiczy jest najbardziej agresywny a endometrialny i śluzowy są lepiej rokujące, to zgodnie z obecną wiedzą, na podstawie licznych badań klinicznych, typ histologiczny nie jest potwierdzonym czynnikiem ryzyka i nie wpływa na sposób postępowania. W odrębny sposób traktowany jest rak jasnokomórkowy, w przypadku którego zalecane jest bardziej agresywne postępowanie (9, 104).

Wartość prognostyczna operacji sprawdzającej typu „second look” (SLO)

Wartość prognostyczna operacji sprawdzającej była długo dyskutowana. Obecnie SLO jest rzadziej wykonywana poza ośrodkami, w których prowadzone są badania naukowe (10, 102, 104). Liczni autorzy donoszą, że osiągnięcie całkowitej remisji patologicznej, stwierdzonej w SLO, koreluje z poprawą przeżywalności (109). Całkowitą remisję kliniczną w wysokich stopniach zaawansowania po leczeniu chirurgicznym i chemioterapii wielolekowej osiąga 67% chorych, a całkowitą remisję patologiczną (CRP) stwierdza się u 33-45% chorych (22). Przeprowadzono serię badań na 71 grupach pacjentek, których ogólna liczba wyniosła 5190 i stwierdzono chorobę resztkową u 53% pacjentek zaliczonych do grupy z całkowitą remisją kliniczną (111). Na podstawie wielu badań klinicznych SLO jest najbardziej czułą metodą wykrywania przetrwałych bądź nawrotowych zmian nowotworowych. Ma ona jednak wartość prognostyczną zależną wyłącznie od znalezionych zmian. Pomimo wprowadzania takich procedur jak wtórna cytoredukcja czy konsolidacja leczenia przy niewielkiej chorobie resztkowej, jak do tej pory nie ma dowodów na poprawę 5-letnich przeżyć w grupie chorych, u których przeprowadzono SLO (9, 84, 118).

Obecność wysięku otrzewnowego

Stwierdzono, że u pacjentek, u których wystąpił wysięk w III i IV stopniu zaawansowania według FIGO, 5-letnie przeżycia osiągnęło 5%, a w grupie bez wysięku 45% leczonych.

(110). Ponadto metaanalizy badań klinicznych sugerują, że pęknięcie guza podczas pierwotnej operacji cytoredukcyjnej jest bardzo złym czynnikiem prognostycznym (140).

Stężenie markera CA 125 w surowicy krwi obwodowej

Stężenie markera nowotworowego CA 125 jest podwyższone u 75-90% chorych na raka jajnika. Zgodnie z wynikami badań klinicznych i doświadczalnych, stwierdzenie stężenia CA 125 powyżej 65 U/ml w I° zaawansowania klinicznego jest silnym niezależnym czynnikiem prognostycznym (9). Przedoperacyjne stężenie CA 125 u pacjentek z zaawansowanym rakiem nie wykazuje natomiast silnej korelacji z wynikiem 5-letnich przeżyć (77). Stwierdzono podwyższenie stężenia CA 125 na 3-5 miesięcy przed pierwszymi objawami nawrotu choroby (84). Jak donoszą liczni autorzy, ważny jest, jako czynnik prognostyczny, czas w którym po operacji cytoredukcyjnej normalizuje się stężenie CA 125 (32, 104).

Istnieje jeszcze grupa czynników prognostycznych będących w fazie badań klinicznych. Wykrywanie nowych czynników prognostycznych z grupy markerów biologicznych wynika z coraz lepszego zrozumienia molekularnych podstaw rozwoju i rozprzestrzeniania się nowotworów. Obecnie prowadzone są intensywne badania nad czynnikami morfologicznymi, białkami odpowiedzialnymi za oporność na cytostatyki, zmianami genetycznymi w raku jajnika, nadekspresją onkogenów i innych genów związanych z cyklem komórkowym, genami związanymi z inwazyjnością i zdolnością do wytwarzania przerzutów, innymi nowymi czynnikami które można oznaczać w surowicy krwi chorej oraz z fragmentów tkankowych. Udowodnienie ich przydatności jako czynników ryzyka wymaga jeszcze wielu badań (9, 49, 77).

Ploidia DNA i odsetek komórek w fazie S jako czynnik prognostyczny u chorych na raka jajnika

Od czasu wynalezienia cytometru przepływowego i stworzenia możliwości użycia go w badaniu nowotworów litych, prowadzono prace nad ploidią DNA w raku jajnika. Badano materiał archiwalny z bloków parafinowych, jak i z tkanek świeżych (43, 45, 116). Stwierdzono, że aneuploidia jest negatywnym, niezależnym czynnikiem rokowniczym we wczesnych stopniach zaawansowania raka jajnika i występuje w 45 % takich guzów (9, 134). Inne dane otrzymano u chorych z wyższym stopniem zaawansowania klinicznego choroby, gdzie publikowane były rozbieżne wyniki, a aneuploidię stwierdzano aż w 75% guzów (45,

97). Dowiedziono, że aneuploidia koreluje z guzami surowiczymi, jasnokomórkowymi, z zaawansowanym stanem klinicznym, większą średnicą guzów znajdujących w czasie laparotomii, obecnością choroby resztkowej i przerzutami do pozaotrzewnowych węzłów chłonnych. W niektórych badaniach aneuploidia koreluje również ze stopniem zróżnicowania histologicznego i z mutacją genu p53 (29, 115). Jak stwierdzono na podstawie licznych badań klinicznych, w zaawansowanych rakach jajnika szczególne znaczenie ploidii DNA polega na przewidywaniu przebiegu choroby u pacjentek, u których udało się wykonać optymalny zabieg pierwotny (77, 69). W grupie ze stwierdzonymi guzami diploidalnymi przeżycia są 4 razy dłuższe niż u pacjentek, których guzy były aneuploidalne (69). U pacjentek z nowotworami o granicznej złośliwości, wartość badania ploidii DNA jest niepotwierdzona (9). Jak do tej pory nie udało się wykazać związku pomiędzy ploidią DNA a opornością na cytostatyki (69). Oznaczanie odsetka komórek fazy S za pomocą cytometrii przepływowej, obok oznaczania indeksu mitotycznego, antygenów proliferacyjnych PCNA i Ki67, jest jednym ze sposobów badania proliferacji komórkowej (9, 77). Zwiększony odsetek komórek fazy S częściej koreluje z guzami aneuploidalnymi o większej złośliwości (71). Jednakże znaczenie odsetka komórek fazy S jako czynnika ryzyka jest niepotwierdzone i wymaga dalszych badań (9, 71).

1.2 PODSTAWY CYTOMETRII PRZEPLYWOWEJ

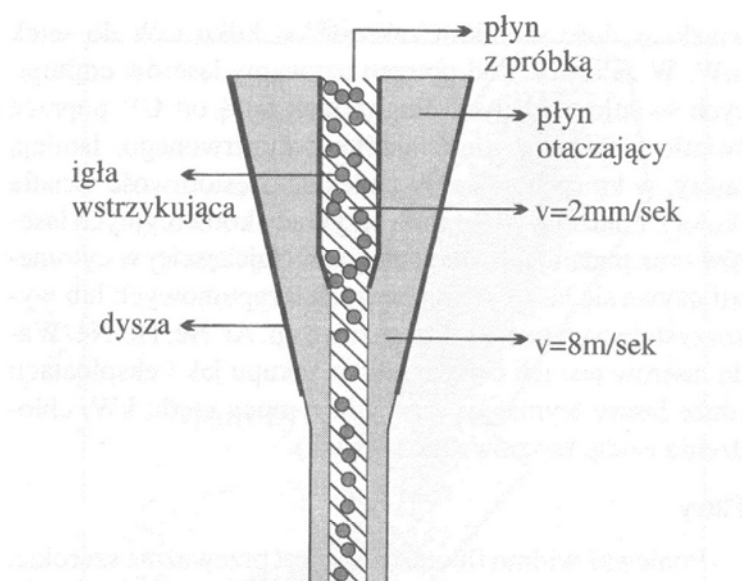
1.2.1 Rys historyczny

Cytometria przepływowa rozwija się od ponad 30 lat (67). Początkowo miała służyć do liczenia komórek, ale z czasem stała się metodą oceny parametrów biofizycznych i biochemicznych komórek i ich składników. W roku 1934 Maldven skonstruował aparat do liczenia krwinek czerwonych z detektorem fotoelektrycznym. Z powodu trudności ze stabilizacją obrazu i blokowaniem kapilar przez badane krwinki nie rozwijał swojej metody. Jednak w 1941 opatentowano pomysł na jego aparat. W 1949 Wallace Coulter ogłosił sposób na liczenie komórek zawieszonych w cieczy. W roku 1953 skonstruowano komorę do optycznego liczenia erytrocytów. Wprowadzenie metody wolnego wstrzykiwania wodnej zawiesiny komórek do szybko płynącego strumienia cieczy dokonało istotnego postępu w rozwoju cytometrii przepływowej (FC) (67, 76). Sposób ten jest wykorzystywany w cytometrii przepływowej do chwili obecnej. W 1960 patomorfolog Herbert Derman i pracownik International Business Machines Corporation (IBM) John Hoffer zaplanowali

budowę automatycznego analizatora komórkowego, wykorzystującego zaobserwowane przez Casperssona zjawisko fluorescencji kwasów nukleinowych. Aparat ten miał służyć do automatycznej oceny rozmazów cytologicznych z części pochwowej szyjki macicy. Budowę powierzono Kamerskyemu, który w 1965 wprowadził nowe koncepcje do cytometrii przepływowej: użył spektrofotometrii, zastosował jednoczesne pomiary różnych cech komórki oraz analizował wyniki w dwóch wymiarach. Fulwyler w roku 1965 opisał urządzenia do sortowania komórek. Rok 1966 przyniósł pomysł na zastosowanie sygnałów o różnej częstotliwości do określania więcej niż jednej cechy fizycznej, a w roku 1969 Van Dilla zbudował urządzenie o prostopadle ustawionych kierunkach przepływu oraz po raz pierwszy użył lasera argonowego, jednocześnie konstruując nową komorę pomiarową z laminarnym przepływem próbki. W 1972 roku uproszczono metodę sortowania komórek, a pracownicy firmy Becton-Dickinson, stosując nową metodę, zbudowali pierwszy cytometr przepływowy serii Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS). W następnych latach nastąpił gwałtowny rozwój aparatury, produkowanej przez kilka firm oraz oprogramowań i aplikacji (67, 76). Jedną z największych zalet FC jest szybkość pomiaru. W ciągu kilku minut można ocenić różne parametry wielu tysięcy komórek, co pozwala na wykrywanie subpopulacji o rzadko występujących cechach.

1.2.2 Zasada działania cytometru przepływowego

W badaniach cytometrycznych używa się komórek barwionych odpowiednim fluorochromem, w zależności od parametru lub parametrów, które mają być analizowane.



Schemat wyjaśniający zasadę ogniskowania hydrodynamicznego. Płynąca wolno zawiesina komórek zostaje w dyszy porwana przez płynącą szybko ciecz ogniskującą (otaczającą). Komórki płyną laminarnie w wąskim strumieniu ułożone jedna za drugą.

Obecnie do barwienia wykorzystywane są gotowe zestawy odczynników laboratoryjnych, produkowane przez wyspecjalizowane firmy (67, 76, 101). Zabarwione komórki pompowane są do strefy pomiarowej pod niewielkim ciśnieniem. Za prawidłowe funkcjonowanie tego etapu pomiaru odpowiedzialny jest „układ cieczy”, powiązany z „układem powietrznym”. Oba te układy doprowadzają ciecz do dyszy ogniskującej, gdzie jest wprowadzana zabarwiona próbka. Wykorzystuje się tu efekt tak zwanego ogniskowania hydrodynamicznego - komórka zostaje porwana przez ciecz ogniskującą.

Rycina 1. za Kantorski J. (67)

Za następny etap pomiaru odpowiada układ optyczny, składający się ze źródła światła laserowego, układu kształtującego i ogniskującego wiązkę laserową na badanej komórce oraz optyki zbiorczej. Zadaniem światła laserowego jest wzbudzenie elektronów fluorochromu. Światło laserowe jest monochromatyczne spolaryzowane, o wystarczającej energii i o małej średnicy wiązki. Zaletą lasera jest możliwość dostosowania długości fali i energii do potrzeb pomiaru (67). Następnie optyka zbiorcza wychwytuje w różnych płaszczyznach odbite przez komórkę światło oraz widmo wysyłane przez wzbudzone elektrony fluorochromu, odfiltrowuje poszczególne długości fal i ogniskuje je na fotokatodzie detektorów (67, 101). Zebrane impulsy przetwarzane są przez złożony z detektorów, fotopowielaczy i przetworników układ elektroniczny, pozwalający na odpowiednią modyfikację zebranych impulsów. Niezbędną częścią każdego aparatu jest układ komputerowy z oprogramowaniem. Programy podzielone są na część do zbierania danych oraz część do analizy próbki. Do zobrazowania danych stosuje się kilka typów wykresów: jednowymiarowy, dwuwymiarowy, wykresy perspektywiczne (67). Podczas analizy możliwe jest „bramkowanie”, czyli odcinanie zbędnych wyników oraz ilościowa ocena komórek w wydzielonych regionach. Oprogramowanie daje też możliwość wyliczenia podstawowych wielkości statystycznych (67, 85).

1.2.3 Zastosowanie cytometrii przepływowej.

Najpowszechniejszym, jak do tej pory, zastosowaniem cytometrii przepływowej jest przyspieszona i bardziej wiarygodna statystycznie, w stosunku do metod mikroskopowych, analiza fenotypu powierzchni badanych komórek, chociaż pierwsze cytometry służyły do automatycznego badania wielkości komórek i zawartości DNA dla potrzeb onkologii (124,

146). Cytometria jest coraz szerzej wykorzystywana do badań diagnostycznych i klinicznych. Wykorzystanie FC w badaniach klinicznych musi być kontrolowane, a stosowane metody badawcze i statystyczne - standaryzowane (129, 138). Organizacją stojącą na straży poprawności badań klinicznych przy użyciu FC jest powołany w początku lat dziewięćdziesiątych Clinical Cytometry Division przy International Society for Analytical Cytology (68). Dobra kontrola jakości badań powinna ułatwić standaryzację stosowanych metod cytometrycznych w jednostkach zajmujących się badaniami klinicznymi (129, 138). Cytometria przepływowa, spośród dziedzin klinicznych, jest najszerszej stosowana w hematologii, jako obiektywna i powtarzalna metoda diagnozowania i kontroli przebiegu leczenia w schorzeniach układu krwiotwórczego. Programy komputerowe ułatwiają rutynową diagnozę białaczek i chłoniaków oraz ich różnicowanie, a wyniki są wolne od subiektywnych interpretacji, dokonywanych przez kolejnych patologów (131). Jak zalecają badacze, aby wykorzystać cytometrię przepływową do badań klinicznych, konieczne jest rygorystyczne przestrzeganie procedur pobierania i przechowywania tkanek do badań oraz przestrzeganie reżimu metodycznego. Reżim ten dotyczy: od strony klinicznej rejestrowania ścisłych danych pacjenta, od strony badań DNA i cytometrycznych – rejestrowania danych związanych z materiałem komórkowym, skierowanym do pomiarów. Poza tym wymagane są dane związane z rodzajem cytometru. Consensus w tej sprawie został osiągnięty na konferencji poświęconej DNA cytometrii w roku 1993 (52, 68). Diagnoza cyklu mitotycznego celem potwierdzenia lub odnalezienia guzów litych i przerzutów nowotworowych w onkologii wymaga zawiesiny komórek, którą trzeba wykonać, rozdrabniając tkankę mechanicznie i enzymatycznie. Jak wykazały liczne badania kliniczne, duże znaczenie ma tu czystość odczynników i czas od pobrania tkanki do jej wykorzystania. Czas ten nie powinien być dłuższy niż 6 godzin, ponieważ może to spowodować powstanie skośnego rozkładu DNA fazy G1 oraz dodatkowy szczyt (rozkład bimodalny) w wyniku autolizy (68, 75). Stosując cytometrię przepływową w guzach litych, można zbadać ploidię DNA, aktywność proliferacyjną i wrażliwość komórek nowotworowych na leki. Fragmenty pobranych tkanek mogą jednak wykazywać dużą heterogenność komórkową, co może wpływać na wynik badania cyklu komórkowego. Za przykład może tu posłużyć rak jelita grubego. Próbkę tego raka zawierają niespełna 30% komórek nowotworowych. Reszta to komórki podścieliska i komórki odczynu zapalnego (24, 68). Heterogenność pod względem: ploiddii DNA, aktywności proliferacyjnej, wrażliwości na leki dotyczy również samych komórek

nowotworowych. Z tych powodów niektórzy autorzy zalecają pobieranie kilku fragmentów guza do badania (68, 75).

Wykorzystując odpowiednie przeciwciała i metody barwienia, ocenia się parametry pobudzenia układu odpornościowego, czy cyklu mitotycznego komórek przewlekłej białaczki szpikowej z jednoczesnym badaniem obecności chromosomu Philadelphia. W badaniach nad guzami litymi cytometria przepływowa pozwala na przykład na wczesne wykrycie zmian genetycznych, prowadzących do raka u chorych z przełykiem Barretta, poprzez jednoczesowe, dwuparametrowe badanie: ploidii DNA i ekspresji białka p53 w pobranych endoskopowo komórkach cylindrycznych przełyku (113). Wieloparametrowa analiza przy pomocy FC pozwala połączyć badania nad obecnością komórek nowotworowych nabłonkowych (oznaczenie cytokeratyny), zawartością DNA i obecnością antygenów np. Ki67 i PCNA (68). Dla celów klinicznych wykorzystuje się ocenę kinetyki transportu błonowego komórek i w ten sposób bada się wielolekową oporność na cytostatyki. Cytometria przepływowa znajduje również zastosowanie w badaniach z zakresu immunologii, badaniach nad apoptozą i martwicą komórek oraz w innych dziedzinach medycyny (68, 76).

1.3 ZNACZENIE PLOIDII DNA W NOWOTWORACH LUDZKICH

1.3.1 Cykl komórkowy i ocena DNA w cytometrze przepływowym

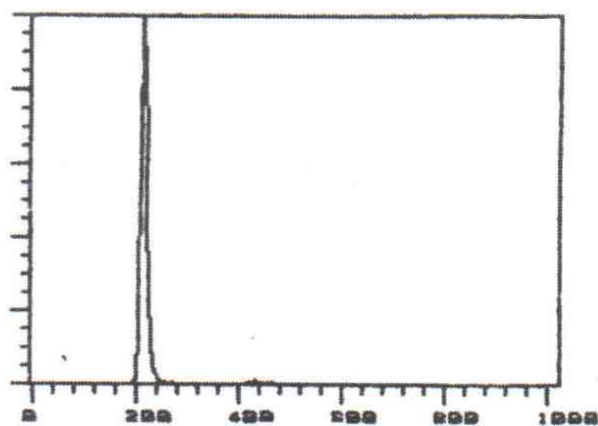
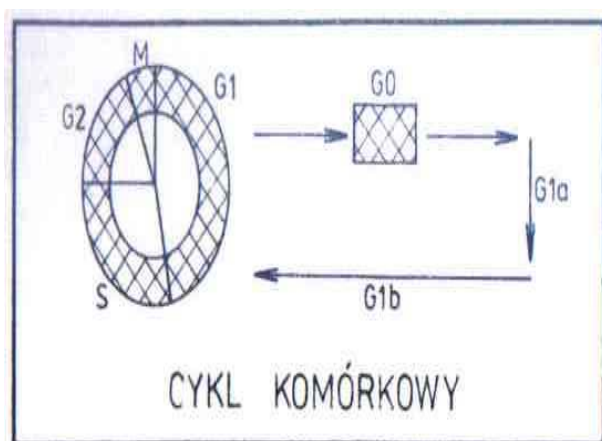
Cykl komórkowy, przedstawiony przez Francisa Jakoba w 1962 roku w Instytucie Pasteura i kilku innych instytutach w Paryżu, jest zaprogramowanym, ściśle kontrolowanym procesem, podczas którego zachodzą zmiany ilości DNA (39). Mechanizmy regulujące cykl komórkowy umożliwiają prawidłowy podział komórki i podwojenie informacji genetycznej. Prawidłowość cyklu komórkowego oraz naprawa zaburzeń struktury kwasów nukleinowych zależy od cyklinozależnych kinaz, cyklin, inhibitorów kompleksu cyklina-cyklinozależna kinaza, białek aktywujących enzymy i od białek supresorowych (39). Komórki nie uczestniczące w cyklu znajdują się w fazie spoczynkowej G₀. Fazą poprzedzającą syntezę DNA jest faza G₁, przejście z fazy G₀ do G₁ jest jedynym etapem cyklu komórkowego zależnym od czynników zewnętrznych takich jak substancje odżywcze, czy czynniki wzrostu. Faza G₁ występująca tuż po podziale komórkowym jest okresem, w którym komórka potomna powiększa swoją masę i upodabnia się do komórki macierzystej poprzez syntezę białek funkcjonalnych. Faza S syntezy DNA, podczas której następuje podwojenie ilości DNA z około 5-6 do 10-12 pg na komórkę, jest poprzedzona i zakończona punktami

kontrolnymi cyklu, w których podział komórkowy może być zatrzymany z powodu uszkodzeń w łańcuchu DNA. W fazie przedpodziałowej G2 następuje kondensacja chromatyny, a komórka powiększa swój potencjał powierzchniowy. W fazie tej zachodzi również synteza tubuliny, która na początku mitozy polimeryzuje, wytwarzając mikrotubule wrzeczona podziałowego (39, 120). Ostatnia faza to podział mitotyczny M (39) (Ryc.2). Czas trwania cyklu mitotycznego, jak i poszczególnych jego faz, jest różny dla poszczególnych organizmów. Trwa on u bakterii 30 min, a u człowieka od 8 godzin w niektórych postaciach białaczek, do 72 godzin w komórkach naskórka (87, 120). Podczas cyklu komórkowego ilość DNA w jądrze zwiększa się w warunkach prawidłowych z 2n (n zawartość DNA komórki rozrodczej) w fazie G0/G1 do 4n w fazie G2/M. Zaburzenia mechanizmów kontroli cyklu mitotycznego prowadzą do powstania komórek o nieprawidłowej zawartości DNA, czyli komórek potomnych, w których zawartość DNA nie będzie odpowiadała wielokrotności 2n. Powstają w ten sposób klony, w których zawartość DNA nie odpowiada krotności 2n. Przyjęło się nazywać je komórkami aneuploidalnymi. Określenie to jest ogólne dla wszystkich komórek z nieprawidłową liczbą chromosomów w jądrze komórkowym. Występują także szczególne postacie aneuploidii, np.: komórki tetraploidalne (4n), monoploidalne (1n), lub też klony komórek z zawartością DNA (4n) będące w fazie spoczynkowej G0 (powyższe rozważanie nie dotyczy komórek rozrodczych) (8, 39, 76, 120). Ocenę ilościową zawartości DNA wykonuje się z zawiesiny komórek, uzyskanej ze świeżej lub mrożonej tkanki, albo z bloków parafinowych. Aneuploidię komórek określa się na podstawie stosunku nasilenia fluorescencji zawartego w nich DNA w fazie G0/G1 do fluorescencji komórek standardowych w fazie G0/G1. Oblicza się w ten sposób indeks DNA (DI).

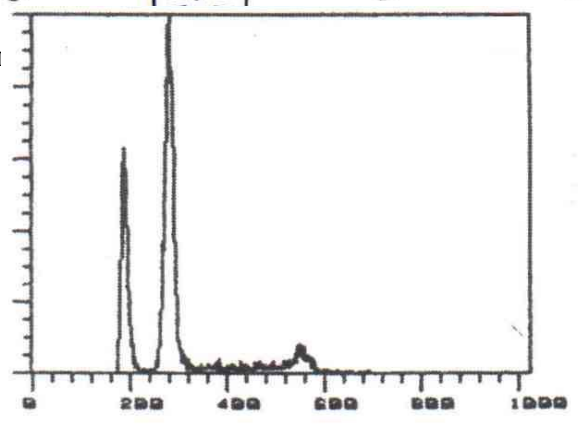
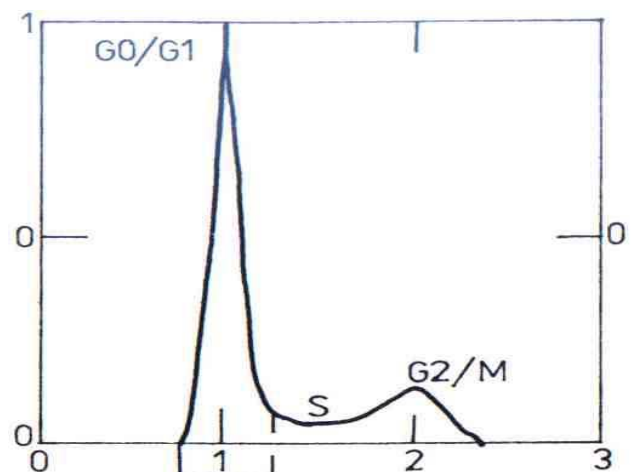
$$\text{INDEX DNA} = \frac{\text{Fluorescencja komórek w fazie G0/G1 badanej tkanki}}{\text{Fluorescencja komórek w fazie G0/G1 populacji wzorcowej}}$$

Standardowe metody nie pozwalają na rozróżnienie faz G0 od G1, ani G2 od M. Fazy te przedstawiają na krzywej histogramu dwa oddzielne sygnały, a część krzywej pomiędzy tymi sygnałami odzwierciedla fazę proliferacyjną S (Ryc.3). W prawidłowych populacjach komórkowych przeważają komórki w fazie G0/G1, czyli indeks DNA DI=1(±5%). Taki histogram nazywamy diploidalnym (Ryc.3 i 4) (75, 94, 123). Nondiploidalną (aneuploidalną) krzywą histogramu cechuje obecność subpopulacji komórkowych o odmiennym od

standardowego nasileniu fluorescencji - indeks DNA ($DI \neq 1$) (Ryc.5). Do oceny jakości histogramów DNA wykorzystuje się współczynnik zmienności (CV). Jest to stosunek odchylenia standardowego do szerokości sygnału G0/G1 lub subpopulacji, w połowie wysokości sygnału. Wartość tego współczynnika zależy od stanu badanej tkanki (151). Współczynnik CV dla komórek świeżych lub mrożonych nie może przekraczać wartości 5%, a dla tkanek z bloków parafinowych, którym stawiane są mniejsze wymagania, wartości 8% (75, 123). Wartość CV wzrasta w wyniku autolizy lub zanieczyszczeń w badanej próbce. Z tego powodu pobrana tkanka musi być możliwie szybko utrwalona, zamrożona lub przebadana (75). Współczynnik CV służy do kwalifikowania histogramów pod kątem przydatności do oceny (123). Aby uzyskać powtarzalne wyniki badania, cytometry są regularnie kalibrowane. Dzięki temu uzyskuje się stałą współzależność pomiędzy zawartością DNA a intensywnością fluorescencji oraz możliwie niski współczynnik CV. Do kalibracji urządzenia służą standardy zewnętrzne produkowane fabrycznie: znakowane fluorochromem cząsteczki silikonu, erytrocyty kurczęcia lub limfocyty ludzkie (151). Celem kontroli DI (standard wewnętrzny) używa się zawiesiny komórek ze zdrowej tkanki narządu odpowiadającego badanej próbce, na przykład z tkanki jajnika pacjentki, u której wykonano zabieg operacyjny z innych wskazań niż rak jajnika. Do oceny fazy S i rozróżniania pików fluorescencji DNA klonów aneuploidalnych i komórek obumarłych służą programy umożliwiające prawidłowe zinterpretowanie wyników badania (94). Odpowiednie oprogramowanie jest integralną częścią laboratorium badawczego (112).



1 3. p



Rycina 4. prawidłowy histogram diploidalny Rycina 5. histogram aneuploidalny

S, G1, G2, M, -fazy cyklu komórkowego CV współczynnik zmienności
Rysunki za Niezabitowski A, Lackowska B.(94)

1.3.2 Ploidia DNA w litych nowotworach ludzkich

Zawartość DNA w jądrach komórek można mierzyć za pomocą dwóch podstawowych metod cytometrycznych: metodą cytometrii przepływowej, gdzie dokonuje się pomiaru intensywności fluorescencji kompleksów DNA-barwnik i cytometrii obrazowej (statycznej), gdzie przeprowadza się pomiar gęstości optycznej zabarwionego DNA. Cytometria przepływowa daje możliwość badania wielu tysięcy komórek w krótkim czasie. Cytometria obrazowa to pomiar kilkuset komórek, wymagający dłuższego okresu czasu. Jej zaletą jest możliwość morfologicznej oceny badanej komórki pod mikroskopem. Zaletą FC jest krótki czas badania i możliwość mierzenia kilku parametrów jednocześnie, wadą - brak możliwości identyfikacji morfologicznej badanych próbek. Od około dwudziestu lat dokonuje się pomiarów zawartości DNA obydwoma metodami. Obecnie uważa się, iż stwierdzenie aneuploidii jest złym czynnikiem rokowniczym w większości nowotworów ludzkich (27, 127, 145).

Rak sutka

Ocena ploidii według niektórych autorów powinna być włączona do rutynowej oceny histopatologicznej. Stwierdzono, że znaczenie aneuploidii w raku sutka zależy od wielkości DI i odsetka komórek w fazie S, a wartości te w różny sposób korelują z innymi czynnikami ryzyka i stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu. Odsetek komórek w fazie S jest wyznacznikiem podatności na chemioterapię u chorych po menopauzie (53, 87, 127).

Rak płuca

Jak wykazały liczne badania, znaczenie ploidii DNA w raku płuca jest nie do końca jasne. Wydaje się, że zależy ono od typu histologicznego nowotworu i jest czynnikiem prognostycznym jedynie u chorych na raka płaskonabłonkowego (87, 120, 144).

Rak jelita grubego

Polscy autorzy w roku 1998 stwierdzili, że ploidia DNA lepiej koreluje z przebiegiem klinicznym u chorych na raka jelita grubego, niż stopnie zaawansowania według klasyfikacji Duke'a (25). Znaczenie ploidii w tym nowotworze jest cały czas dyskutowane. Ploidia DNA wydaje się być jednym z istotnych czynników prognostycznych. Nie ulega wątpliwości, że stwierdzenie aneuploidii jest czynnikiem niekorzystnym u chorych na raka jelita grubego (87, 94).

Rak przełyku

Stwierdzenie komórek aneuploidalnych wskazuje na agresywny przebieg i szybsze wznovy miejscowe oraz wykazuje korelację z innymi czynnikami prognostycznymi jak nasilenie ekspresji białka p53, czy obecnością przerzutów w węzłach chłonnych (87, 127).

Rak żołądka

Aneuploidia jest niekorzystnym czynnikiem ryzyka korelującym z umiejscowieniem raka, głębokością nacieku, przerzutami do okolicznych węzłów chłonnych i znamienne krótszym czasem przeżycia (27, 87). Jednak istnieją poglądy, że znaczenie ploidii nie jest tak oczywiste i powinno być dalej badane (26).

Rak prostaty

Aneuploidia jest uważana za jeden z głównych czynników rokowniczych, szczególnie w nowotworach z nieprzerwaną torebką i bez przerzutów do węzłów chłonnych, a guzy diploidalne są bardziej wrażliwe na chemioterapię w porównaniu do aneuploidalnych (87, 127).

Rak szyjki macicy

Znaczenie ploidii DNA w raku szyjki macicy nie zostało jednoznacznie potwierdzone (74, 127).

Rak trzonu macicy

Stwierdzono gorsze rokowanie i krótszy czas przeżycia u chorych z nowotworami aneuploidalnymi. Aneuploidia była również powiązana ze zwiększonym stopniem złośliwości histologicznej i głębokością nacieku. Ploidia jest w tym nowotworze niezależnym czynnikiem ryzyka (107).

Mięsaki i nowotwory kości

Istnieją sprzeczne doniesienia co do znaczenia ploidii i odsetka komórek w fazie S w tych nowotworach. Skąpa ilość przebadanego materiału i sprzeczne wyniki nie pozwalają na jednoznaczną odpowiedź. Istnieją doniesienia o przydatności oznaczania odsetka komórek w fazie S, gdzie przy określonym odsetku komórek w tej fazie zwiększa się wrażliwość mięsaka na chemioterapię (87, 127).

Rak nerki

Nie ma jednoznacznie potwierdzonej wartości badania ploidii DNA w tym raku. Aneuploidia często współistnieje z wysokim odsetkiem fazy S, niskim stopniem zróżnicowania, znacznym zaawansowaniem klinicznym i niekorzystnym przebiegiem choroby (63).

2. CEL PRACY

Celem pracy było:

- 1) przeprowadzenie analizy zależności pomiędzy ploidią DNA i zawartością procentową komórek w fazie S a następującymi czynnikami prognostycznymi w raku jajnika: stopniem zaawansowania klinicznego, typem histologicznym, stopniem zróżnicowania histopatologicznego, stężeniem markera CA 125 w surowicy krwi w czasie rozpoznania raka jajnika, wiekiem pacjentek w czasie rozpoznania choroby, doszczętnością pierwotnej operacji cytoredukcyjnej, odpowiedzią na chemioterapię I rzutu, wynikiem operacji sprawdzającej,
- 2) znalezienie niezależnych czynników rokowniczych w badanej grupie chorych,
- 3) sprawdzenie, czy ploidia DNA i frakcja procentowa komórek w fazie S (SPF) są czynnikami rokowniczymi.

Cel realizowano przez:

- oznaczenie ploiddii DNA oraz frakcji procentowej komórek fazy S w komórkach raka jajnika przy użyciu cytometru przepływowego FACS-Calibur Becton-Dickinson,
- statystyczne opracowanie uzyskanych wyników w odniesieniu do powyżej przedstawionych czynników prognostycznych.

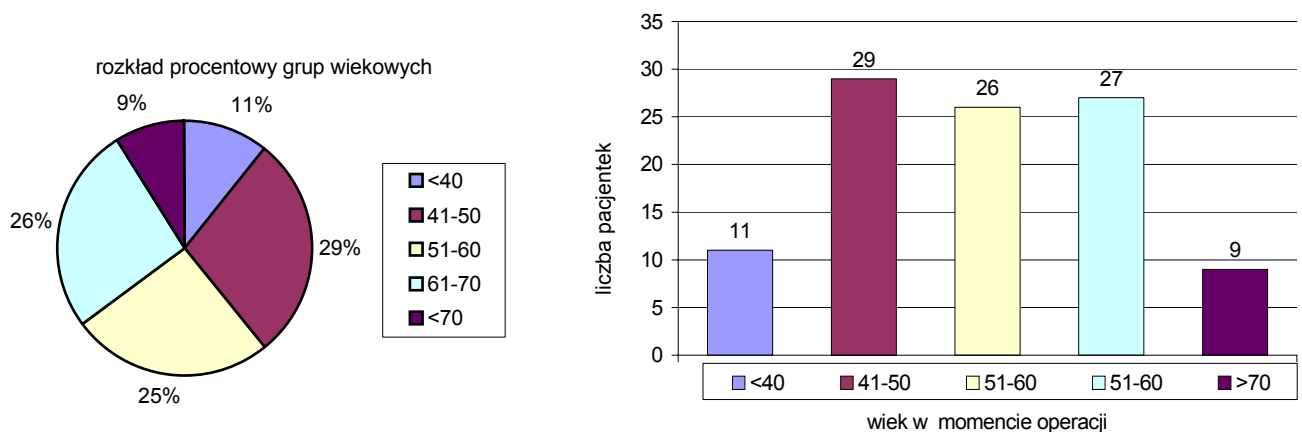
3.MATERIAŁ

Przebadano ploidię DNA oraz odsetek komórek w fazie S we fragmentach tkanek nowotworowych, pobieranych od pacjentek leczonych z powodu raka jajnika. Pacjentki były leczone w Klinice Ginekologii AMG od roku 1998. Tkanę pobierano podczas pierwotnej operacji cytoredukcyjnej. Badano te fragmenty tkanek ogniska pierwotnego nowotworu, z których lekarz patolog pobierał skrawki do badania śródoperacyjnego. Pacjentki obserwowano do 15 sierpnia 2003 roku, lub do zgonu z powodu choroby nowotworowej.

3.1 Charakterystyka chorych

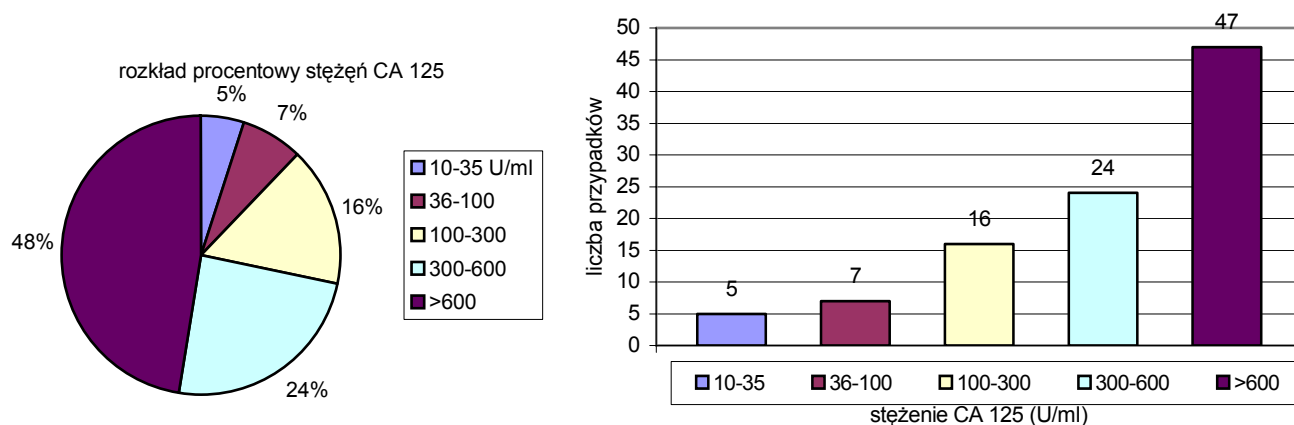
Badaniem objęto 102 kobiety, u których wykonano pierwotny zabieg cytoredukcyjny w Klinice Ginekologii Akademii Medycznej w Gdańsku od stycznia 1998 do lipca 2002. Najstarsza pacjentka w chwili rozpoznania miała 82 lata, najmłodsza 24, średni wiek wyniósł 54 lata i 9 miesięcy, mediana 53 lata, odchylenie standardowe 11,72. Najliczniejszą grupę stanowiły chore w przedziale wiekowym 41-50 lat.

Rycina 6. Wiek chorych operowanych z powodu raka jajnika w dziesięcioletnich przedziałach czasowych



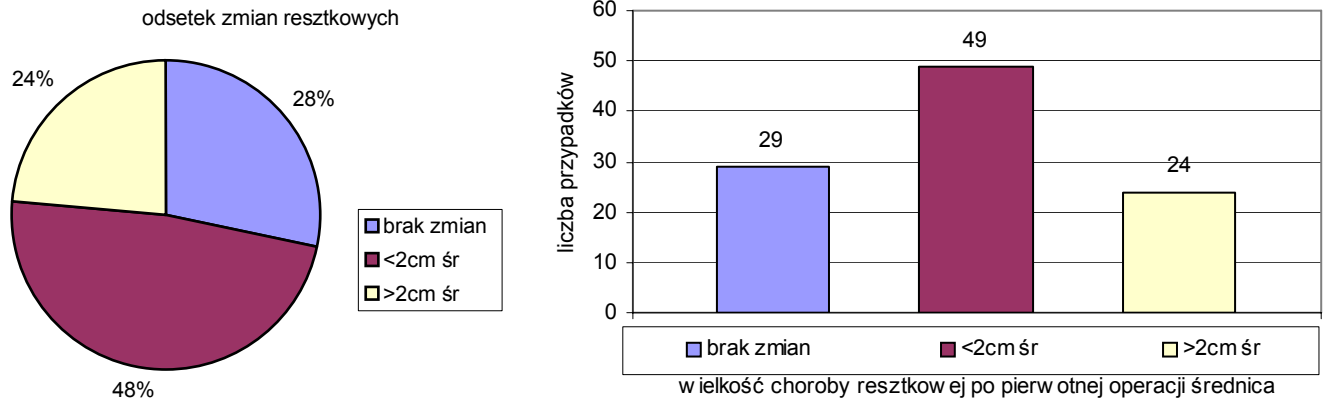
U 99 chorych (97,05%) w okresie bezpośrednio poprzedzającym operację oceniono stężenie antygenu CA 125 w surowicy krwi. Badanie przeprowadzono używając zestawów EIA CA 125 produkowanych przez firmy Roche–Diagnostica, Abbott Laboratories lub Byk–Sangtec Diagnostica. Za normę przyjęto stężenie do 35 U/ml. Najniższe stężenie wyniosło 13 U/ml, za najwyższy przedział przyjęto stężenie powyżej 600 U/ml. Stężenie markera CA 125 w granicach normy stwierdzono u 5 (4,901%) chorych. Największą grupę 47 (47,47%) stanowiły pacjentki ze stężeniem markera >600 U/ml.

Rycina 7. Podział chorych ze względu na stężenie CA 125 w momencie pierwotnej operacji cytoredukcyjnej.



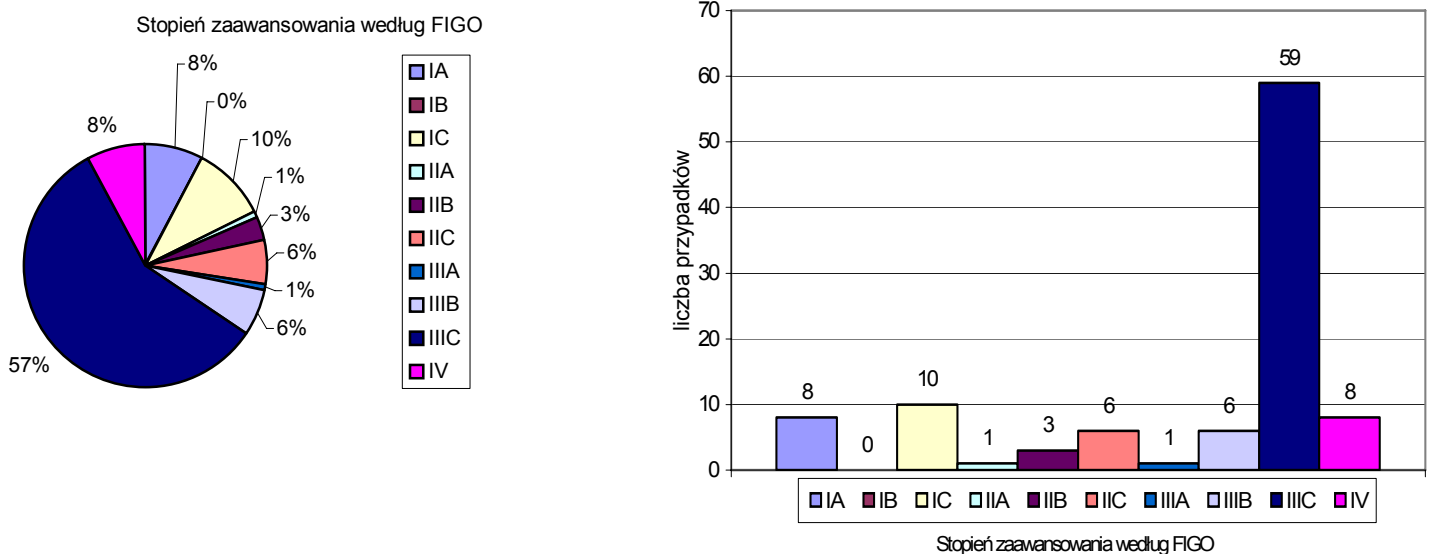
U wszystkich pacjentek wykonano pierwotną operację cytoredukcyjną zgodnie z zaleceniami European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) której Klinika Ginekologii jest stałym członkiem (ośrodek nr 551). Za operację doszczętną przyjęto taką, po której nie pozostawiono zmian lub średnica największej pozostawionej zmiany nowotworowej nie przekraczała 20 mm - 78 kobiet (76,47%). Największą grupę stanowiły chore, u których pozostawiono zmiany makroskopowe, lecz nie przekraczały one 20 mm średnicy - 49 pacjentek (48,03%). Wyodrębniono grupę pacjentek, u których po operacji pierwotnej nie pozostawiono zmian makroskopowych w obrębie jamy brzusznej 29 (28%).

Rycina 8. Struktura chorych ze względu na doszczętność pierwotnej operacji cytoredukcyjnej.



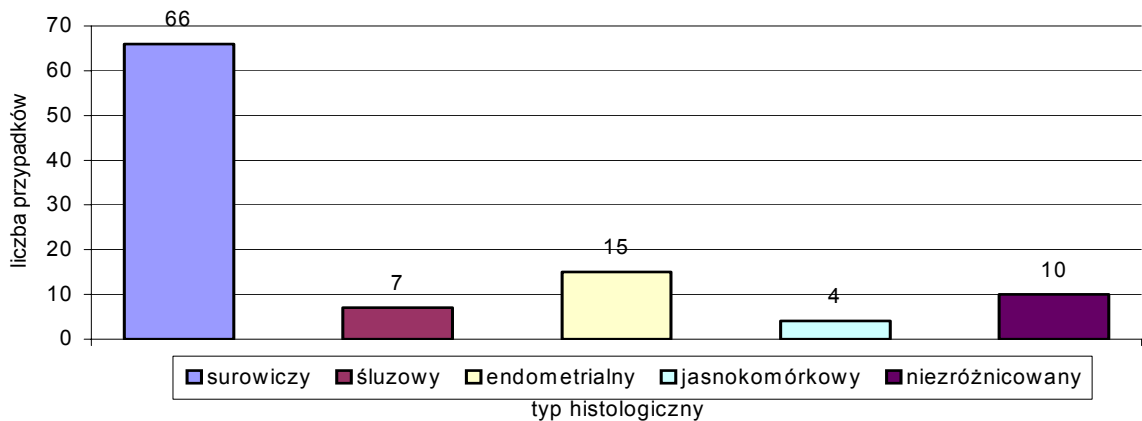
Na podstawie danych zebranych podczas pierwotnej operacji cytoredukcyjnej oceniono stopień zaawansowania klinicznego według FIGO. Najliczniejszą grupę stanowiły pacjentki w stopniu IIIc - 59 (57,8%), najmniej liczną – chore w stopniu zaawansowania IIA i IIIA (po jednym przypadku). W badanym materiale nie występował nowotwór w stopniu zaawansowania IB.

Rycina 9. Struktura chorych w zależności od zaawansowania klinicznego raka jajnika według FIGO



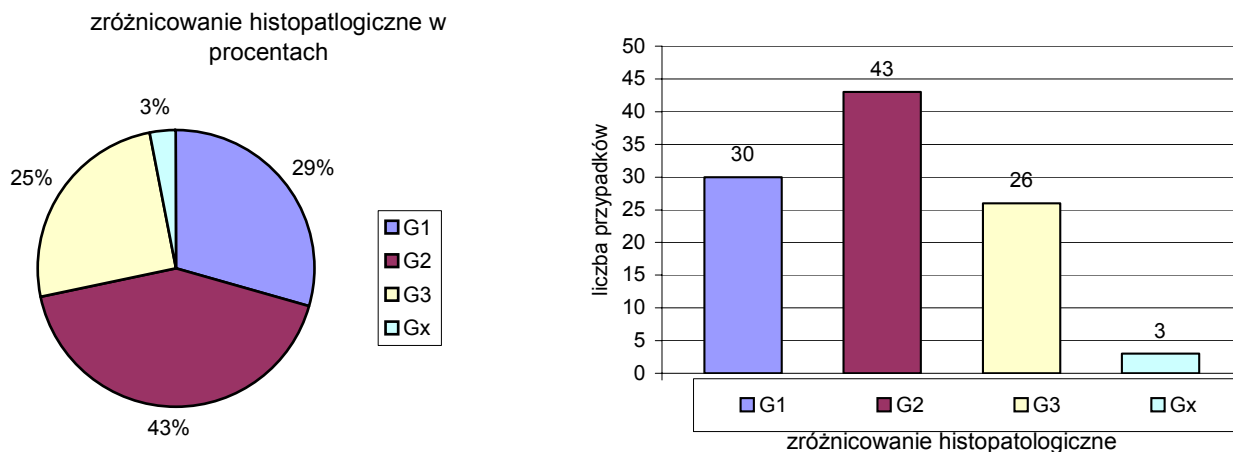
Rozpoznanie raka jajnika, typ histologiczny i stopień zróżnicowania histopatologicznego określano w Samodzielnej Pracowni Patomorfologii Klinicznej Instytutu Położnictwa i Chorób Kobietych Akademii Medycznej w Gdańsku, kierowanej przez prof. dr hab. Marię Hrabowską. Najliczniejszą grupę stanowiły przypadki raka surowiczego - 66 (64,70%), najmniej liczną guzy jasnokomórkowe - 4 (3,9%), u 10 (9,8%) nowotwór był niezróżnicowany.

Rycina 10. Struktura typów histologicznych guzów jajnika w analizowanej grupie



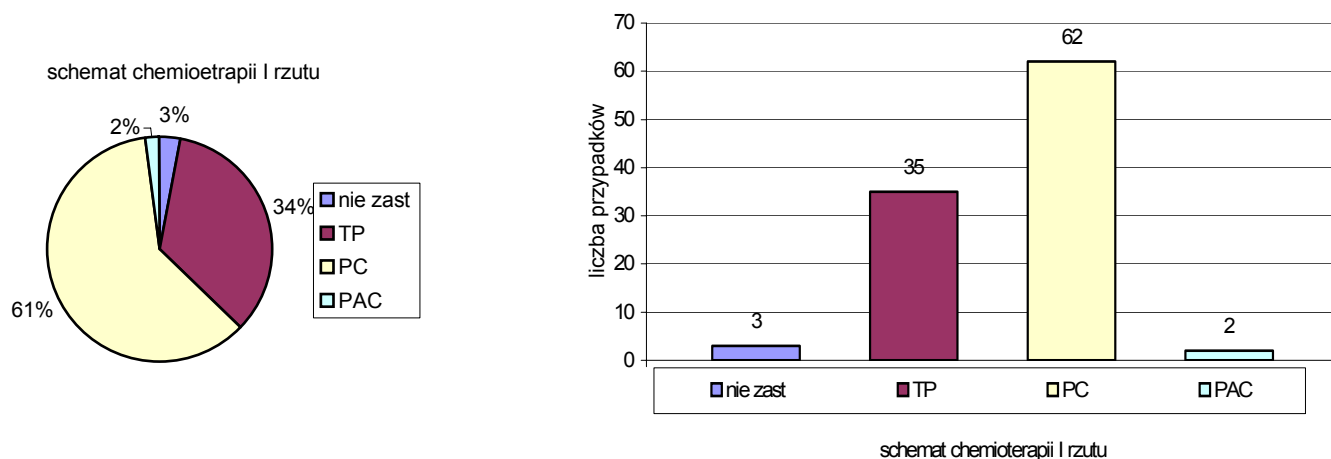
Najczęściej stwierdzano nowotwór o średnim stopniu zróżnicowania (G2), który wystąpił u 43 kobiet (42,16%). U trzech pacjentek (2,94%) nie określono stopnia zróżnicowania nowotworu (Gx).

Rycina 11. Struktura zróżnicowania histopatologicznego nowotworów w analizowanej grupie.



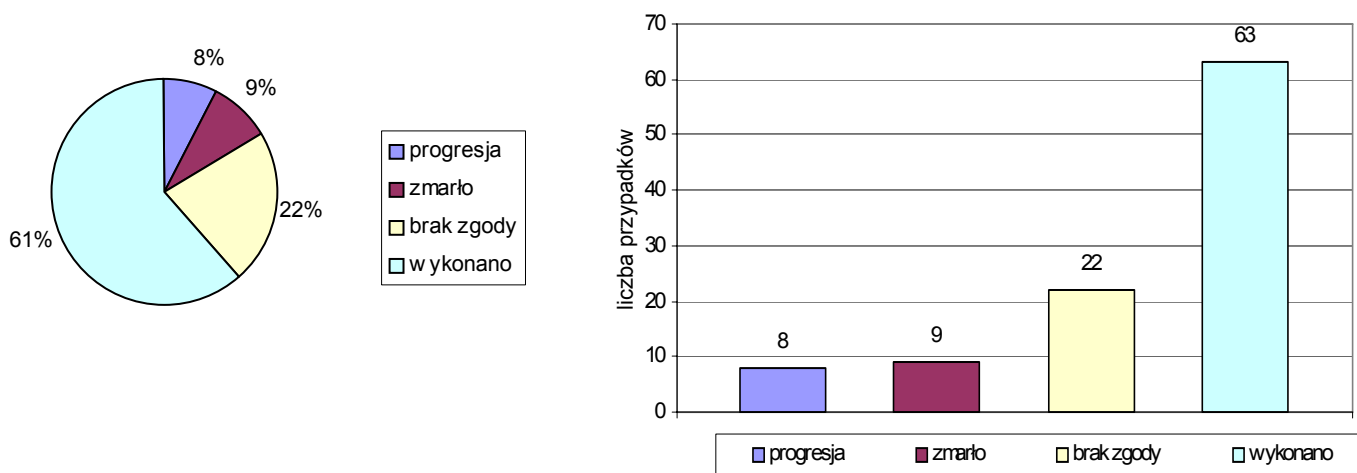
Po operacji chore otrzymywały wielolekową chemioterapię dożylną w oddziale chemioterapii Kliniki Ginekologii AMG. Leczenie rozpoczynano w 6-8 dobie po zabiegu według następujących schematów: PC (Cisplatyna 75 mg/m², Cyklofosfamid 750mg/ m²) u 62 kobiet (60,78%), TP (Paclitaxel 135 mg/m² we wlewie 24 – godzinnym, następnie Cisplatyna 75 mg/m² lub Karboplatyna AUC 5 – 35 (34,31%), PAC (Cisplatyna 50 mg/m², Adriamycyna 50 mg/m², Cyklofosfamid 650mg/ m²) u 2 pacjentek. Kolejne cykle podawano co 21 dni (sześć kursów). Nie zastosowano chemioterapii u 2 chorych, które zmarły w okresie okołoperacyjnym i u jednej pacjentki w stopniu zaawansowania IA według FIGO.

Rycina 12. Podział chorych ze względu na zastosowany schemat chemioterapii



U pacjentek, u których osiągnięto całkowitą remisję kliniczną (CR) - ustąpienie wszelkich zmian i objawów choroby, oraz które wyraziły zgodę, wykonywano operację sprawdzającą typu „second look”. Wynik operacji klasyfikowano zgodnie z zaleceniami WHO (1981 rok): całkowita remisja patologiczna (CRP) - brak zmian nowotworowych stwierdzanych w badaniu histopatologicznym, częściowa remisja (PR) - zmniejszenie się o ponad 50% wszystkich mierzalnych ognisk nowotworowych przy braku nowych ognisk choroby, stabilizacja choroby (SD) - zmniejszenie wymiarów ognisk nowotworowych o mniej niż 50% lub zwiększenie o mniej niż 25%, pod warunkiem braku nowych ognisk, progresja choroby (PD) - pojawienie się nowych lub powiększenie się o ponad 25 % już istniejących ognisk nowotworowych. Za pozytywną odpowiedź na chemioterapię I rzutu uznano stany CRP, PR, SD stwierdzane w czasie przeprowadzonych operacji sprawdzających (SLO) lub całkowitą remisję kliniczną u pacjentek, u których nie wykonano operacji sprawdzającej. Operację sprawdzającą, w wyniku której nie stwierdzono zmian nowotworowych, uznano za negatywną. Operację SLO wykonano u 63 pacjentek (61,76%). 22 chore (21,56%) nie wyraziły zgody na operację sprawdzającą. Do czasu SLO zmarło 9 kobiet (8,82%). Z powodu progresji procesu nowotworowego u 8 chorych odstąpiono od zabiegu.

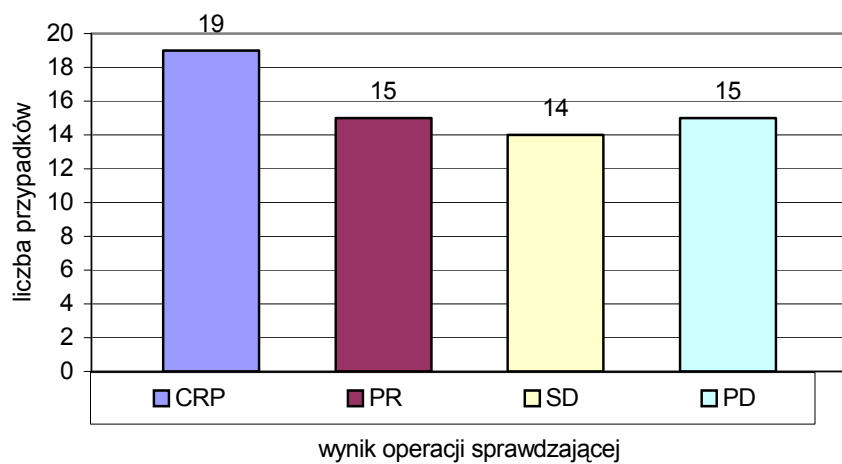
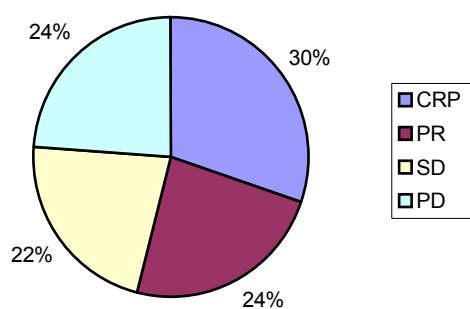
Rycina 13. Podział chorych ze względu na wykonanie operacji „second look”



W operacji SLO, wykonanej u 63 chorych, najczęściej stwierdzono CRP 19 (30,17%)
PR i PD stwierdzono u 15 chorych (23,81%), SD wystąpiło u 14 chorych.

Rycina 14. Wyniki operacji sprawdzającej

wynik operacji sprawdzającej w %



3.2 Metody

3.2.1 Przechowywanie materiału tkankowego.

Pobrano materiał, około 2 cm³ po dokładnym opisanu, dzielono na 4 części i umieszczano w hermetycznych pojemnikach. Pojemniki umieszczano w ciekłym azocie temp –195,8°C. Czas od pobrania do zanurzenia w środowisku ciekłego azotu nie przekraczał 10 minut. Czas przechowywania materiału w środowisku ciekłego azotu wynosił od kilku dni do 42 miesięcy.

3.2.2 Przygotowanie materiału do analizy w cytometrze przepływowym

Materiał przygotowywano metodą detergentowo-trypsynową, zaproponowaną przez Vindelov (143). Metoda polega na rozpuszczaniu komórkowych błon lipidowych za pomocą detergentu, eliminowaniu za pomocą trypsyny elementów szkieletu komórki i białek komórkowych, enzymatycznym trawieniu kwasu rybonukleinowego i stabilizowaniu chromatyny jądrowej za pomocą sperminy. Następnym etapem jest stechiometryczne wbudowywanie jodku propidionowego do wyizolowanych jąder komórkowych. Jądra komórkowe zabarwione jodkiem propidionowym, po wzbudzeniu wiązką laserową, emitują światło o długości fali pomiędzy 580-650 nm. Detektor FACScan's fluorescence 2 (FL2), w który są wyposażone cytometry firmy Becton Dickinson, może zanalizować światło o długości fali od 564-606 nm.

3.2.3 Opis metody

Do przygotowania materiału używano zestawu Cycle TEST PLUS DNA Reagent Kit firmy Becton Dickinson nr katalogowy 340242. Zastosowano następujące etapy postępowania:

1. Mechaniczne rozdrobnienie materiału na płytce Petriego w środowisku roztworu buforowego (cytrynian sodu, sacharoza i DMSO).
2. Wirowanie rozdrobnionego materiału w temperaturze pokojowej, przy obciążeniu 400g przez 5 minut, następnie zlewanie supernatantu z pozostawieniem osadu komórkowego na dnie próbówki.
3. Dodanie 250 µl roztworu A (trypsyna bufor detergentowy), delikatne mieszanie.
4. Inkubacja 10 minut w roztworze A w temperaturze pokojowej.
5. Dodanie 200 µl roztworu B (inhibitor trypsynowy i RNaza), delikatne mieszanie.
6. Inkubacja w temperaturze pokojowej przez 10 minut.

7. Dodanie 200 μ l roztworu C (jodek propidionowy i czterochlorowodorek sperminy w buforze cytrynianowym).
8. Inkubacja 10 minut w zaciemnionej chłodziarce temp. 2 - 8°C.
9. Przesączenie przez sączi nylonowe o średnicy porów 50 μ m Becton Dickinson Nr katalogowy 340603.
10. Wykonanie pomiarów.

3.2.4 Oznaczanie ploidii DNA i odsetka komórek w fazie S przy użyciu cytometru przepływowego

Zawiesina komórek z DNA zabarwionym barwnikiem fluorescencyjnym zostaje wprowadzona do strumienia cieczy w naczyniu pomiarowym. Dzięki wykorzystaniu zasady ogniskowania hydrodynamicznego, komórki przesuwają się do środka strumienia i trafiają na ustawioną prostopadle wiązkę światła laserowego. Układ optyczny rejestruje emitowane przez komórkę światło ze wzbudzonych elektronów barwnika oraz światło rozproszone na komórce. Rejestrowanie emitowanego światła odbywa się za pomocą układu filtrów i detektorów, a opracowanie - przy pomocy oprogramowania będącego integralną częścią cytometru.

Pomiary zostały wykonane na cytometrze FACS-Calibur Becton-Dickinson, wyprodukowanym roku 1998. Urządzenie jest w posiadaniu Kliniki Hematologii AMG. Do zbierania danych i opracowania ploidii DNA wykorzystano program Cellquest, a do obliczenia odsetka komórek w fazie S i powtórnego opracowania ploidii użyto programu Mod Fit LT (Verity Software House Incorporation Topsham ME) wersja 2.0 z roku 1995.

Liniowość aparatu była ustalana na podstawie standardu zewnętrznego DNA QC Particles, firmy Becton Dickinson nr katalogowy 95-023. Jako standardu wewnętrznego użyto potwierdzonej histopatologicznie tkanki pobranej z niezmiennego jajnika.

3.2.5 Interpretacja wyników badania.

Jako diploidalne zakwalifikowano histogramy z pojedynczym pikiem komórek w fazie G0/G1 przy $DI=1(\pm 5\%)$.

Jako aneuploidalne zakwalifikowano histogramy zawierające więcej niż jeden oddzielny pik komórkowy w fazie G0/G1, $DI\neq 1(\pm 5\%)$.

3.2.6 Metody statystyczne

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu komputerowego Stata 8.0.

W związkach pomiędzy zmiennymi kategorycznymi porównywano odsetki przy pomocy testu χ^2 , a w przypadku małej liczebności wartości oczekiwanych w badanych grupach stosowano test Fishera.

W analizie dotyczącej zmiennych ciągłych oceniano parametryczność danych stosując test Shapiro–Wilk. W celu oceny związku zmiennych kategorycznych i ciągłych, w przypadku zmiennych o rozkładzie normalnym porównywano średnie, stosując test t-Studenta. W przypadku zmiennych nie mających rozkładu normalnego, korzystano ze statystyki rank, stosując testy Wilcozona, Kruskala-Wallisa i Mann-Whitneya.

Zmienne ciągle oceniano także pod kątem wzajemnych zależności, z wykorzystaniem regresji logicznej w przypadku korelacji ze zmiennymi kategorycznymi, lub regresji liniowej w przypadku zmiennych ciągłych.

W analizie czasu przeżycia oraz do wykreślenia krzywych przeżycia stosowano metodę Kaplana-Meiera. Czas przeżycia w różnych grupach porównywano z zastosowaniem testu logrank. W analizie czynników rokowniczych stosowano test logrank oraz jednoczynnikowy test Coxa. Wszystkie cechybrane pod uwagę w analizie jednoczynnikowej były następnie oceniane pod kątem wzajemnych zależności, z wykorzystaniem regresji logicznej w przypadku zmiennych kategorycznych lub regresji liniowej dla zmiennych ciągłych. Oceniano także liniowość związków, korzystając z analizy korelacji. Tak przygotowane dane poddano analizie wieloczynnikowej przy zastosowaniu modelu proporcjonalnego ryzyka (model Coxa). Końcowy model - grupę czynników o niezależnej wartości rokowniczej - uzyskano stosując technikę backward stepwise selection.

Za poziom istotności przyjęto wartość $p=0,05$.

4. Wyniki

Ogółem wykonano 156 oznaczeń ploidii DNA z próbek pobranych podczas pierwotnej operacji cytoredukcyjnej.

W 29 przypadkach uzyskano współczynnik CV powyżej 5%, w tej grupie powtórzono badanie i w 20 przypadkach uzyskano prawidłowy CV. Pozostałe 9 przypadków wyłączone z analizy.

W 15 przypadkach przeprowadzono badania podwójnie, używając różnych wycinków tkanki nowotworowej – we wszystkich przypadkach uzyskano zbieżne wyniki.

10 oznaczeń wykonano z tkanki zdrowej, celem kontroli jakości badania. W tych przypadkach uzyskano histogramy z diploidalną zawartością DNA $DI=1(\pm 5\%)$.

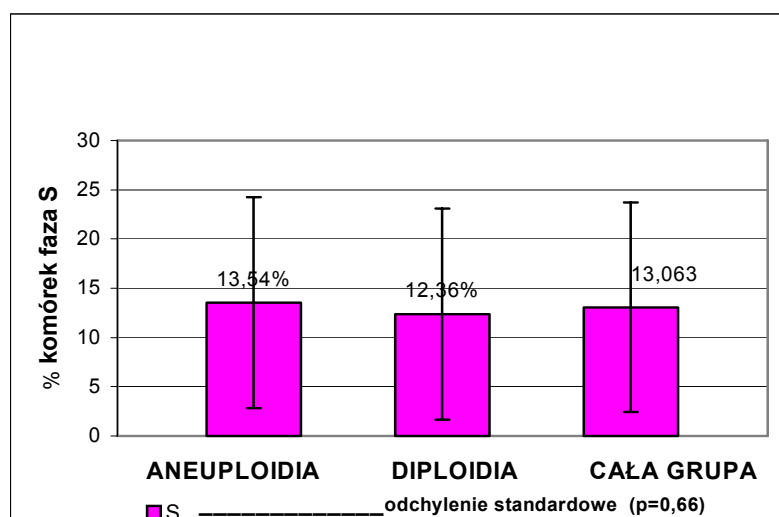
Do analizy statystycznej użyto wyników ze 102 pomiarów, pozostałych po wyłączeniu wyników z tkanek zdrowych i podwójnych oznaczeń z guzów nowotworowych.

W wybranej grupie 102 pacjentek zawartość procentową komórek w fazie S udało się oznaczyć w 95 przypadkach.

W analizowanej grupie 102 pacjentek leczonych z powodu raka jajnika diploidalną zawartość DNA w komórkach nowotworowych stwierdzono w 37,25% (38 /102) przypadków, nowotwory aneuploidalne w 62,75% (64/102).

Zawartość procentowa komórek fazy S w całej grupie wyniosła 13,0637%, odchylenie standardowe 10,638, minimalna zawartość 0,58%, maksymalna 57,62%. Nie stwierdzono różnicy w zawartości procentowej fazy S w komórkach nowotworów diploidalnych 12,356% odchylenie standardowe 10,63 i aneuploidalnych 13,536 % odchylenie standardowe 10,71 ($p= 0,66$).

Rycina 15. Zawartość procentowa komórek w fazie S w zależności od ploidii DNA



4.1.1 Ploidia DNA, odsetek komórek w fazie S a wiek badanych.

Stwierdzono, że nowotwory z diploidalną zawartością DNA statystycznie znamienne częściej występowały u pacjentek młodszych średnio o prawie 7 lat. Nie stwierdzono statystycznie znamiennej korelacji wieku chorych z procentową zawartością komórek fazy S w badanych guzach ($p=0,067$).

Tabela I. Średni wiek pacjentek w zależności od ploiddii DNA.

ploidia DNA	liczebność	ploidia DNA	Średni wiek	odchylenie standardowe	poziom istotności
aneuploidia	64	aneuploidia	57,218	11,47	
diploidia	38	diploidia	50,5526	11,09	$p=0,0053$

4.1.2 Ploidia DNA, odsetek komórek w fazie S a typ histologiczny raka jajnika.

Sprawdzono, czy istnieje zależność pomiędzy typem ploiddii DNA a typem zróżnicowania tkankowego raka jajnika. Nie stwierdzono statystycznie znamiennej zależności pomiędzy typem histologicznym raka a zawartością DNA w komórkach nowotworowych. Uwagę zwraca całkowity brak nowotworów z diploidalną zawartością DNA w grupie raków jasnokomórkowych, jednak mała liczebność tej grupy uniemożliwia wnioskowanie. Badając zależność średniej zawartości komórek w fazie S w poszczególnych typach histopatologicznych, stwierdzono statystycznie znamienne różnicę pomiędzy rakiem śluzowym - 7,37% komórek w fazie S, a rakiem jasnokomórkowym - 18,83% ($p=0,023$). Nie stwierdzono różnic pomiędzy pozostałymi typami histopatologicznymi.

Tabela II. Typy histologiczne raka w grupach z diploidalną i aneuploidalną zawartością DNA oraz średni % komórek fazy S .

typ różnicowania tkankowego	ploiddia DNA (liczba, procent)		razem 102 (100%)	średni % fazy S /odchylenie standardowe
	diploidia	aneuploidia		
	38 (37,25%)	64 (62,75%)		13,06 / 10,64
surowiczny	25 (37,88%)	41 (61,12%)	66 (100%)	13,37 / 10,93
śluzowy	1 (14,29%)	6 (85,71%)	7 (100%)	7,37 / 4,34
endometrialny	8 (53,33%)	7 (46,67%)	15 (100%)	14,56 / 13,09
jasnokomórkowy	0 (0%)	4 (100%)	4 (100%)	18,83 / 10,93
niezróżnicowany	4 (40%)	6 (60%)	10 (100%)	10,38 / 5,672

$p=0,023$ porównanie zawartości fazy S w raku śluzowym i jasnokomórkowym, pozostałe $p>0,05$

4.1.3 Ploidia DNA, odsetek komórek w fazie S a stopień zróżnicowania histopatologicznego nowotworu

W badanej grupie nie stwierdzono zależności pomiędzy ploidią DNA a stopniem zróżnicowania histopatologicznego nowotworu. Nie stwierdzono również różnic między procentową zawartością komórek fazy S w poszczególnych stopniach zróżnicowania nowotworu. Zwraca uwagę całkowity brak nowotworów z diploidalną zawartością DNA w grupie raków gdzie nie udało się określić stopnia zróżnicowania histopatologicznego.

Tabela III. Stopnie zróżnicowania nowotworu w grupach z diploidalną i aneuploidalną zawartością DNA oraz średni odsetek komórek fazy S .

Stopień dojrzałości	Ploidia DNA, liczba, procent		razem	Średni % fazy S /odchylenie
	diploidia	aneuploidia		
G1	15(50%)	15(50%)	30(100%)	15,39 / 14,80
G2	13(30,23%)	30(69,77%)	43(100%)	12,40 / 9,19
G3	10(38,46%)	16(61,54%)	26(100%)	11,60 / 5,81
Gx	0(0%)	3(100%)	3(100%)	9,57 / 5,86
Razem	38(37,25%)	64(62,75%)	102(100%)	13,06 / 10,63

p>0,05 pomiędzy wszystkimi grupami

4.1.4 Ploidia DNA, odsetek komórek w fazie S a stopień zaawansowania klinicznego nowotworu według FIGO.

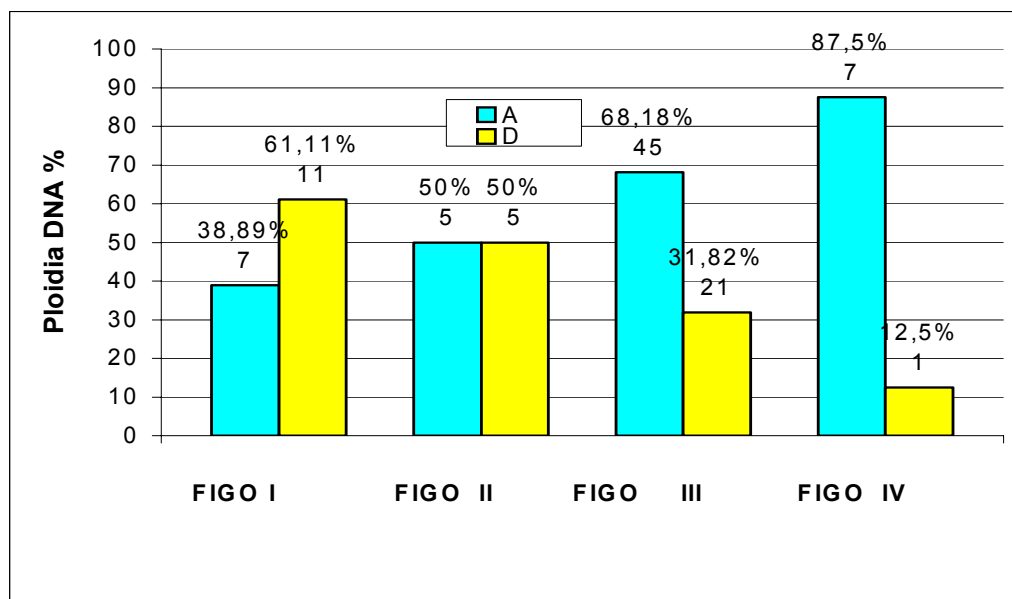
Analizując zależność pomiędzy rodzajem ploidi DNA i stopniem zaawansowania klinicznego stwierdzono: statystycznie znamienne częstsze występowanie komórek diploidalnych w nowotworach w I stopniu zaawansowania według FIGO w porównaniu do III° (p=0,023) i IV° (p=0,022). Nie stwierdzono znamienych różnic w zawartości DNA pomiędzy stopniami I° a II°, III° a IV° oraz II° a IV° (p>0,05). Nie stwierdzono również różnic między procentową zawartością komórek fazy S w poszczególnych stopniach zaawansowania według FIGO .

Tabela IV. Stopnie zaawansowania według FIGO raka w grupach z diploidalną i aneuploidalną zawartością DNA oraz średni % komórek fazy S .

Stopień FIGO	Ploidia DNA, liczba, procent		razem	średni % komórek w fazie S /odchylenie standardowe
	diploidia	aneuploidia		
I	11(61,11%)	7(38,89%)	18(100%)	11,14 / 10,08
II	5(50%)	5(50%)	10(100%)	13,44 /17,55
III	21(31,82%)	45(68,18%)	66(100%)	13,16 / 9,08
IV	1(12,5%)	7(87,5%)	8(100%)	18,13 / 16,86
razem	38(37,25%)	64(62,75%)	102(100%)	13,06 / 10,63

p>0,05 odsetek komórek fazy S, porównanie pomiędzy wszystkimi grupami

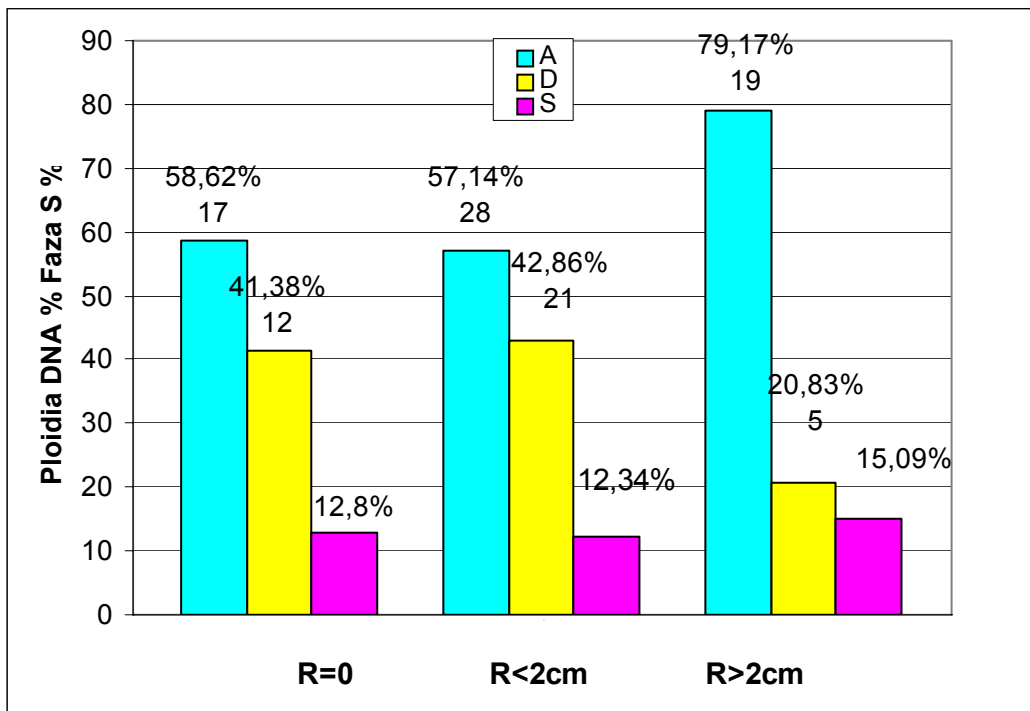
Rycina 16. Odsetek i liczba nowotworów diploidalnych i aneuploidalnych w poszczególnych stopniach zaawansowania według FIGO.



4.1.5 Ploidia DNA, odsetek komórek w fazie S a doszczętność pierwotnej operacji cytoredukcyjnej.

Nie stwierdzono zależności pomiędzy zawartością DNA ani zawartością procentową komórek w fazie S w tkankach raka a doszczętnością pierwotnej operacji cytoredukcyjnej. Zaobserwowano jednak trend w kierunku zwiększonej ilości nowotworów aneuploidalnych w grupie z chorobą resztkową $R > 2\text{cm}$ w stosunku do $R < 2\text{cm}$ ($p = 0,065$).

Rycina 17. Odsetek i liczba nowotworów diploidalnych i aneuploidalnych w zależności od doszczętności pierwotnej operacji cytoredukcyjnej oraz średni % komórek fazy S.



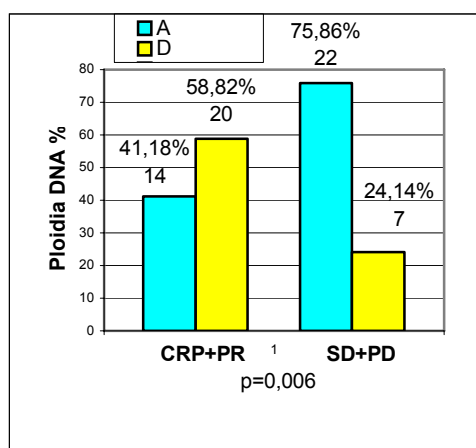
4.1.6 Ploidia DNA, odsetek komórek w fazie S a wynik operacji sprawdzającej

Dokonano analizy wyników operacji sprawdzającej (SLO) w zależności od ploidii DNA. Badanie przeprowadzono na grupie 63 pacjentek, u których wykonano SLO. Stwierdzono statystycznie znamienne większą częstość występowania aneuploidii w grupie pacjentek z progresją choroby nowotworowej (PD) w stosunku do reszty badanej grupy (CRP+PR+SD) ($p=0,001$). Przeanalizowano zależność między podgrupami z całkowitą remisją patologiczną i częściową remisją (CRP+PR) w stosunku do podgrupy ze stabilizacją choroby lub progresją (SD+PD). Stwierdzono większą częstość aneuploidii w grupie SD+PD ($p=0,006$). Nie stwierdzono żadnych zależności między wynikiem operacji SLO, a zawartością procentową komórek w fazie S.

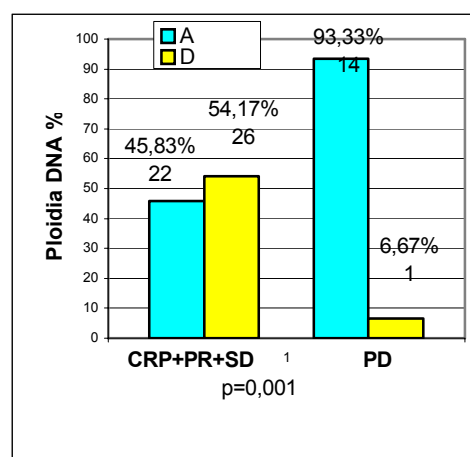
Tabela V. Wynik operacji SLO w zależności od ploidii DNA i zawartości komórek fazy S

Wynik SLO	Ploidia DNA, liczba, procent		razem	Średni %fazy S /odchylenie standardowe
	diploidia	aneuploidia		
CRP	10(52,63%)	9(47,37%)	19(30,17%)	13,83 / 8,74
PR	10(66,67%)	5(33,33%)	15(23,80%)	18,36 / 13,06
SD	6(42,86%)	8(57,19%)	14(22,23%)	9,85 / 5,55
PD	1(6,67%)	14(93,33%)	15(23,80%)	16,63 /13,63
Razem	27(42,86%)	36(57,14%)	63(100%)	13,06 / 10,63

Rycina 18. Wynik SLO podzielone na grupy CRP+PR i SD+PD a ploidia DNA



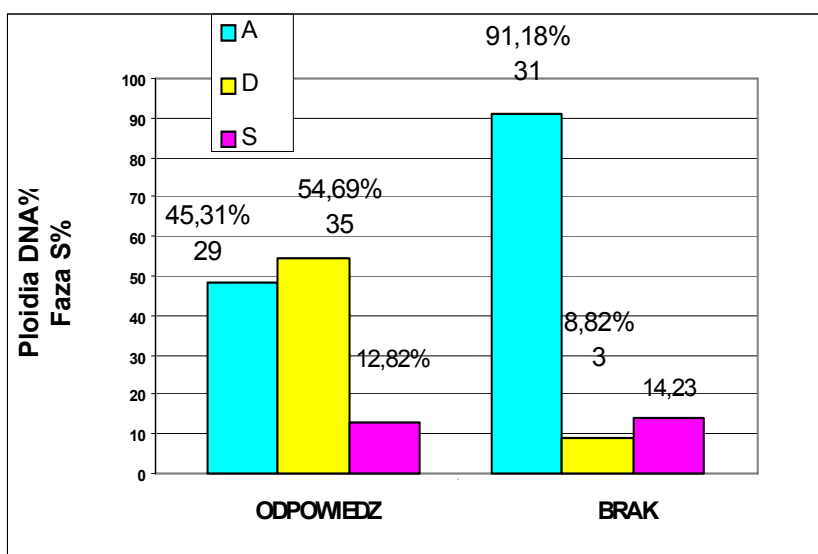
Rycina 19. Wyniki SLO podzielone na grupy CRP+PR+SD i PD a ploidia DNA



4.1.7 Ploidia DNA, odsetek komórek w fazie S a odpowiedź na chemioterapię pierwszego rzutu

Przeanalizowano zależność pomiędzy zawartością DNA a odpowiedzią na chemioterapię pierwszego rzutu. Z analizy wyłączono dwie chore, które zmarły w okresie okołoperacyjnym i dwie chore, z którymi stracono kontakt po skończeniu chemioterapii. Analiza objęła 98 pacjentek. Stwierdzono częstsze występowanie aneuploidii w grupie, gdzie nie było odpowiedzi na chemioterapię pierwszego rzutu (31/34), w stosunku do grupy chorych, które odpowiedziały pozytywnie (29/64) ($p < 0,0001$). Nie stwierdzono różnicy pomiędzy procentową zawartością komórek w fazie S a odpowiedzią na chemioterapię pierwszego rzutu (Ryc. 20).

Rycina 20. Odpowiedź na chemioterapię I rzutu a ploidia DNA procent i liczba oraz średni odsetek komórek w fazie S



4.2 Analiza czynników ryzyka

Przeprowadzono analizę jednoczynnikową, szacując prawdopodobieństwo zgonu w zależności od poszczególnych czynników ryzyka: wieku chorych, zaawansowania klinicznego nowotworu według FIGO, zróżnicowania histopatologicznego, typu histologicznego nowotworu, doszczętności pierwotnej operacji cytoredukcyjnej, odpowiedzi na chemioterapię I rzutu, stężenia antygenu CA 125 w surowicy przed zabiegiem operacyjnym, wyniku operacji sprawdzającej, ploiddii DNA, odsetka komórek w fazie S (Tab. VI).

Stwierdzono, że wiek ma negatywny wpływ na rokowanie – im wyższy wiek kobiet w momencie rozpoznania, tym wyższe ryzyko zgonu ($p=0,002$). Wykazano zależność między ryzykiem zgonu a stopniem zaawansowania klinicznego według FIGO - im wyższy stopień zaawansowania tym gorsze rokowanie ($p<0,001$). Badając wpływ stopnia zróżnicowania histopatologicznego G na przeżycie, stwierdzono: im wyższy stopień zróżnicowania, tym mniejsze ryzyko zgonu ($p=0,01$).

Badając wpływ typu histologicznego nowotworu na ryzyko zgonu stwierdzono, że rak jasnokomórkowy rokuje gorzej w stosunku do pozostałych typów histologicznych raka jajnika ($p=0,006$).

Stwierdzono wpływ doszczętności zabiegu pierwotnego ($p=0,002$) oraz wpływ odpowiedzi na chemioterapię I rzutu na ryzyko zgonu ($p<0,0001$).

Wykazano zależność między stężeniem markera CA 125 w surowicy krwi w okresie przedoperacyjnym a ryzykiem zgonu - im wyższe stężenie antygenu CA 125, tym gorsze rokowanie ($p=0,002$).

Wynik operacji sprawdzającej SLO ma wpływ na ryzyko zgonu ($p<0,001$).

Przy negatywnym wyniku operacji SLO spadek przeżywalności o 25% wystąpił po 45 miesiącach, a u chorych, u których stwierdzono zmiany podczas operacji sprawdzającej, spadek przeżywalności o 25 % wystąpił już po 17 miesiącach.

Odnotowano mniejsze ryzyko zgonu w grupie chorych z rakiem diploidalnym ($p < 0,001$).

Tabela VI. Czynniki rokownicze w analizowanej grupie

czynnik rokowniczy	Opis	poziom istotności
wiek	im starszy wiek w chwili rozpoznania, tym gorsze rokowanie	$p=0,002$
ploidia DNA	chorzy z rakami diploidalnymi rokują lepiej od chorych z rakami aneuploidalnymi	$p < 0,001$
Faza S	brak wpływu na rokowanie	$p=0,992$
	w nowotworach aneuploidalnych	$p=0,0565$
	w nowotworach diploidalnych	$p=0,630$
Stopień zaawansowania według FIGO	im wyższy stopień zaawansowania, tym gorsze rokowanie	$p < 0,001$
Stopień zróżnicowania histopatologicznego (G)	im wyższy stopień, tym gorsze rokowanie	$p=0,01$
typ histologiczny	rak jasnokomórkowy rokuje gorzej	$p=0,006$
	rak surowiczy bez wpływu na rokowanie	$p=0,42$
	rak śluzowy bez wpływu na rokowanie	$p=0,135$
	rak endometrialny bez wpływu	$p=0,066$
	rak niezróżnicowany bez wpływu	$p=0,116$
doszczętność zabiegu pierwotnego	im mniejsza doszczętność, tym gorsze rokowanie	$p= 0,002$
Odpowiedź na chemioterapię I rzutu	brak odpowiedzi rokuje gorzej	$p < 0,0001$
stężenie markera CA125 w surowicy krwi oznaczony przed zabiegiem operacyjnym	im wyższe stężenie antygenu CA 125, tym gorsze rokowanie	$p=0,002$
Wynik SLO	im większe zmiany, tym gorsze rokowanie	$p < 0,001$

Następnie przeprowadzono analizę wieloczynnikową w poszukiwaniu niezależnych czynników rokowniczych. Stwierdzono trzy niezależne czynniki rokownicze:

1. I stopień zaawansowania według FIGO zmniejsza ryzyko zgonu ($p=0,001$), współczynnik ryzyka RR- 0,1702, 95% przedział ufności 0,0578-0,501 (Tab. VII).
2. Brak odpowiedzi na chemioterapię I rzutu zwiększa ryzyko zgonu ($p=0,001$), współczynnik ryzyka RR- 6,6270, 95% przedział ufności 3,3168-13,240 (Tab. VII).
3. Diploidia DNA pomniejsza ryzyko zgonu ($p=0,019$), współczynnik ryzyka RR- 0,4344, 95% przedział ufności 0,2169-0,8698 (Tab. VII).

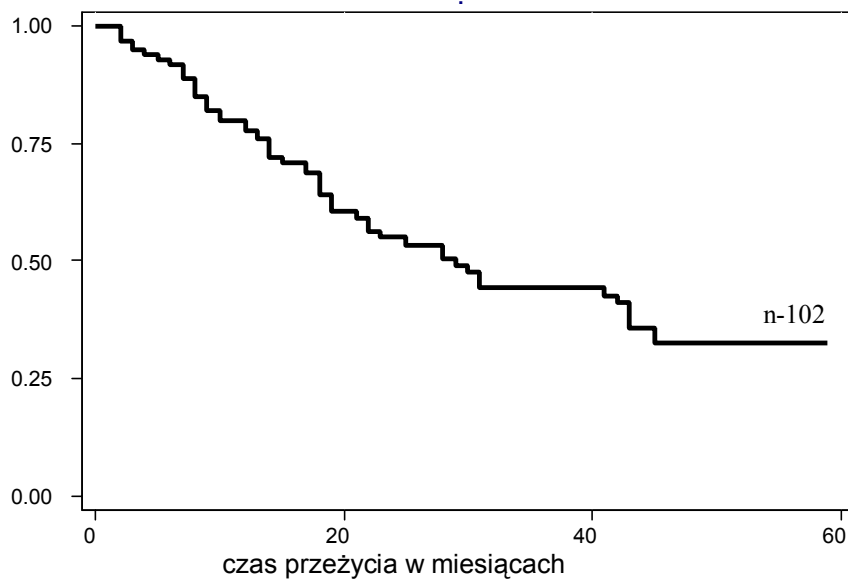
Tab VII. Niezależne czynniki rokownicze.

Czynnik	Współczynnik ryzyka	p	95% przedział ufności
Diploidia DNA	0,4344	$p=0,019$	0,2169-0,8698
Brak odpowiedzi na chemioterapię I rzutu	6,6270	$p=0,001$	3,3168-13,240
I stopień zaawansowania według FIGO	0,1702	$p=0,001$	0,0578-0,501

4.3 Analiza przeżycia

Do analizy przeżycia posłużono się metodą Kaplana-Meiera.

Wykres 1. Całkowite przeżycia chorych w analizowanej grupie.

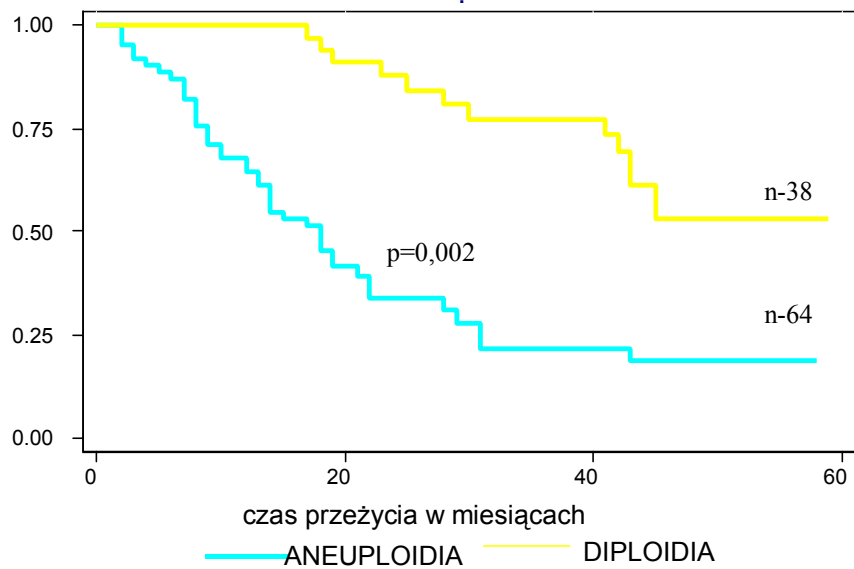


Na wykresie 1. przedstawiono zależność kumulowanej proporcji przypadków przeżywających od czasu, jaki upłynął od rozpoznania choroby.

Obniżenie przeżywalności o 50% (mediana czasu przeżycia) wyniosło 29 miesięcy.

W badanej grupie do chwili ukończenia badania nie osiągnięto obniżenia przeżywalności o 75%.

Wykres 2. Całkowite przeżycia chorych w zależności od ploidy DNA

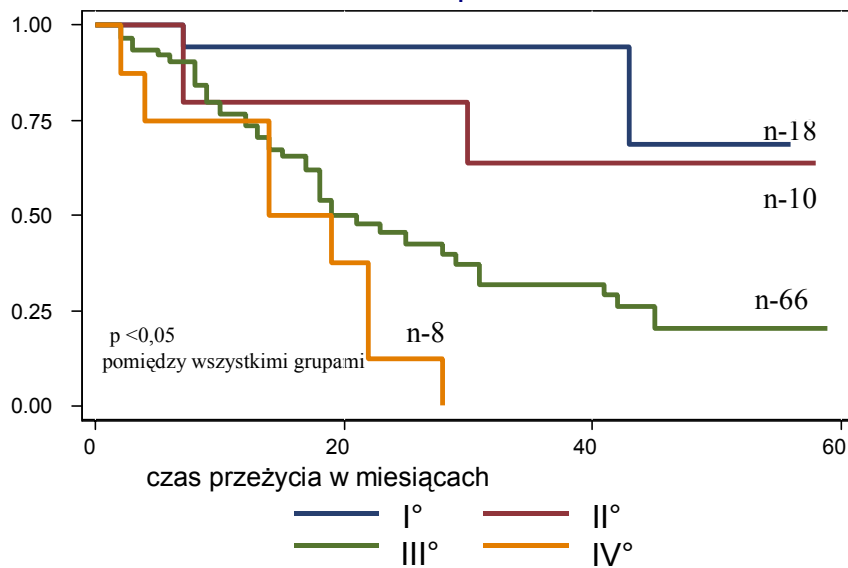


Na wykresie 2 przedstawiono zależność kumulowanej proporcji przypadków przeżywających od rodzaju ploidy DNA nowotworu.

W grupie chorych z nowotworami aneuploidalnymi mediana czasu przeżycia wyniosła 18 miesięcy, a obniżenie przeżywalności o 25 % nastąpiło po 9 miesiącach.

W grupie chorych z nowotworami diploidalnymi nie osiągnięto mediany przeżycia, a obniżenie przeżywalności o 25 % nastąpiło po 41 miesiącach ($p=0,002$).

Wykres 3. Całkowite przeżycia chorych w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu według FIGO

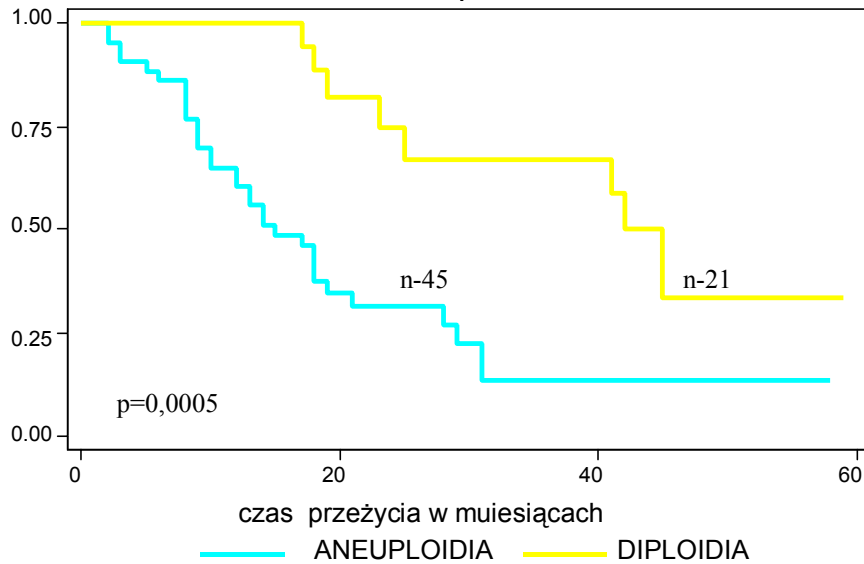


Na wykresie 3 przedstawiono zależność kumulowanej proporcji przypadków przeżywających od stopnia zaawansowania nowotworu według FIGO.

W badanej grupie chorych w I i II stopniu zaawansowania według FIGO nie osiągnięto mediany czasu przeżycia.

U chorych w III stopniu zaawansowania mediana czasu przeżycia wyniosła 21, a w IV stopniu 19 miesięcy. Różnice pomiędzy czasami przeżycia w poszczególnych stopniach zaawansowania są statystycznie istotne ($p < 0,05$).

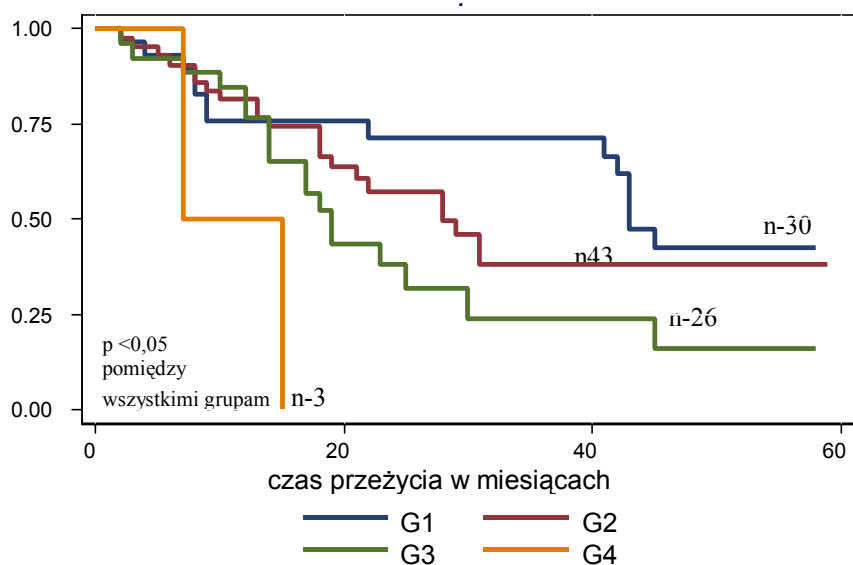
Wykres 4. Całkowite przeżycia chorych w zależności od ploidy DNA w III stopniu zaawansowania według FIGO.



Na wykresie 4 przedstawiono zależność kumulowanej proporcji przypadków przeżywających w III stopniu zaawansowania FIGO od rodzaju ploidy DNA.

Stwierdzono lepsze rokowanie u pacjentek w III stopniu zaawansowania z rakiem diploidalnym ($p=0,0005$). Mediana czasu przeżycia u chorych w III stopniu zaawansowania z nowotworem aneuploidalnym wyniosła 15 miesięcy, natomiast u chorych z nowotworem diploidalnym 45 miesięcy. W pozostałych stopniach zaawansowania według FIGO zależność nie wykazywała znamienności statystycznej ($p>0,05$). Nie stwierdzono różnicy w ryzyku zgonu w zależności od odsetka komórek w fazie S w żadnym ze stopni zaawansowania.

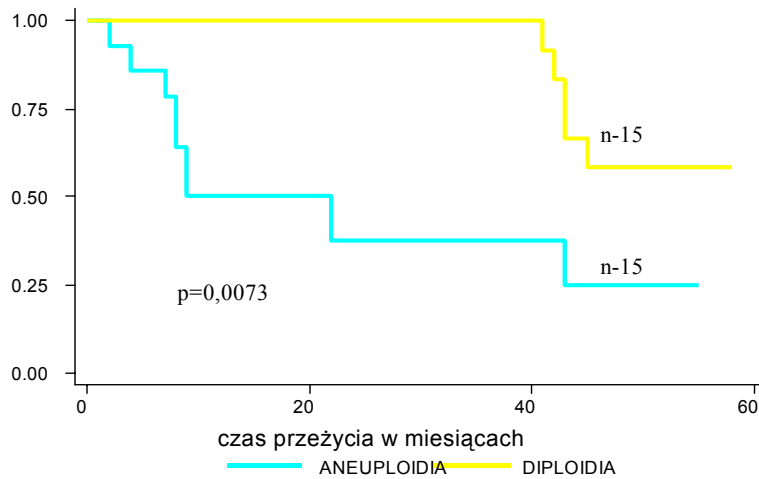
Wykres 5. Całkowite przeżycia chorych w zależności od stopnia zróżnicowania histopatologicznego (G).



Na wykresie 5 przedstawiono zależność kumulowanej proporcji przypadków przeżywających od stopnia zróżnicowania histopatologicznego nowotworu.

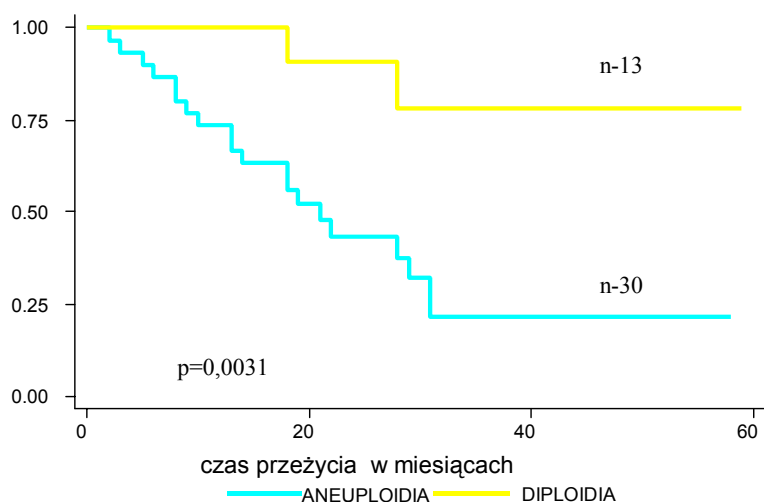
Mediana czasu przeżycia dla G1 wyniosła 43 miesiące, dla G2 - 28, dla G3 - 19 dla G4 - 7 miesięcy. Zależność jest statystycznie znamiennej pomiędzy wszystkimi stopniami zróżnicowania G1-G3 $p < 0,05$ pomiędzy wszystkimi grupami. Nie stwierdzono różnicy w ryzyku zgonu w zależności od odsetka komórek w fazie S w żadnym ze stopni zróżnicowania.

Wykres 6. Całkowite przeżycia chorych w zależności od ploidy DNA w G1 stopniu zróżnicowania histopatologicznego.



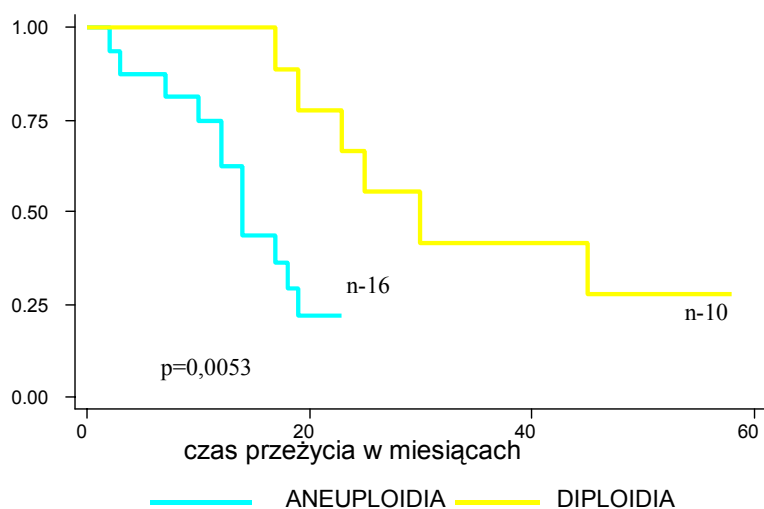
Na wykresie 6 przedstawiono zależność kumulowanej proporcji przypadków przeżywających w G1 stopniu zróżnicowania od rodzaju ploidy DNA. Stwierdzono lepsze rokowanie dla chorych z rakiem diploidalnym, mediana czasu przeżycia nie została osiągnięta, a dla chorych z nowotworem aneuploidalnym wyniosła 22 miesiące ($p=0,0073$).

Wykres 7. Całkowite przeżycia chorych w zależności od ploidy DNA w G2 stopniu zróżnicowania histopatologicznego.



Na wykresie 7 przedstawiono zależność kumulowanej proporcji przypadków przeżywających w G2 stopniu zróżnicowania od rodzaju ploidii DNA. Stwierdzono lepsze rokowanie dla chorych z rakiem diploidalnym. W tej grupie mediana czasu przeżycia nie została osiągnięta, a dla chorych z nowotworem aneuploidalnym wyniosła 21 miesięcy ($p=0,0031$).

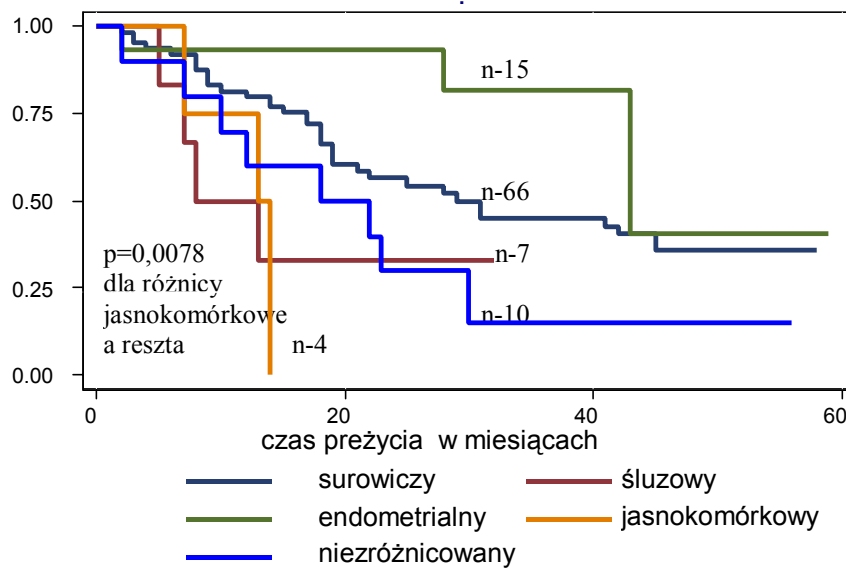
Wykres 8. Całkowite przeżycia chorych w zależności od ploidii DNA w G3 stopniu zróżnicowania histopatologicznego.



Na wykresie 8 przedstawiono zależność kumulowanej proporcji przypadków przeżywających w G3 stopniu zróżnicowania od rodzaju ploidii DNA. Stwierdzono lepsze rokowanie dla chorych z rakiem diploidalnym, mediana czasu przeżycia wyniosła 30, a dla chorych z nowotworem aneuploidalnym 14 miesięcy ($p=0,0053$).

Nie stwierdzono różnicy w ryzyku zgonu w zależności od odsetka komórek w fazie S w żadnym ze stopni zróżnicowania histopatologicznego nowotworu.

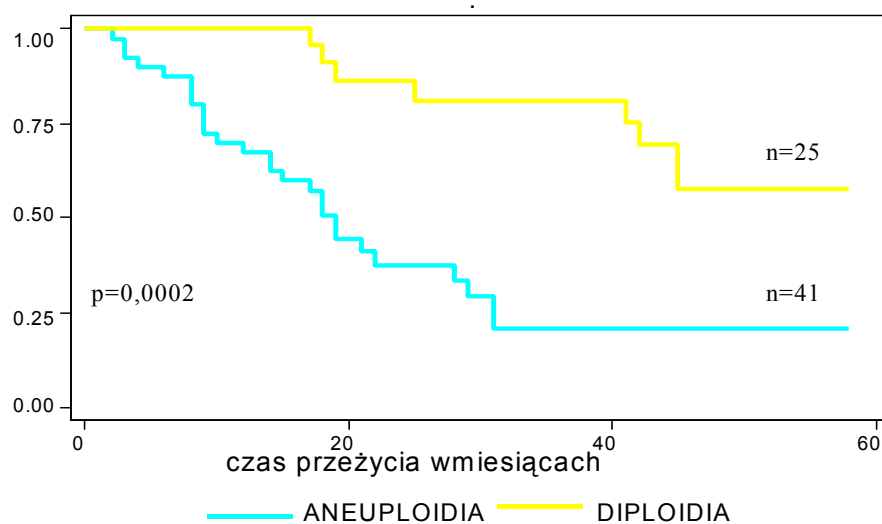
Wykres 9. Całkowite przeżycia chorych w zależności od typu histologicznego nowotworu



Na wykresie 9 przedstawiono zależność kumulowanej proporcji przypadków przeżywających od typu histologicznego nowotworu.

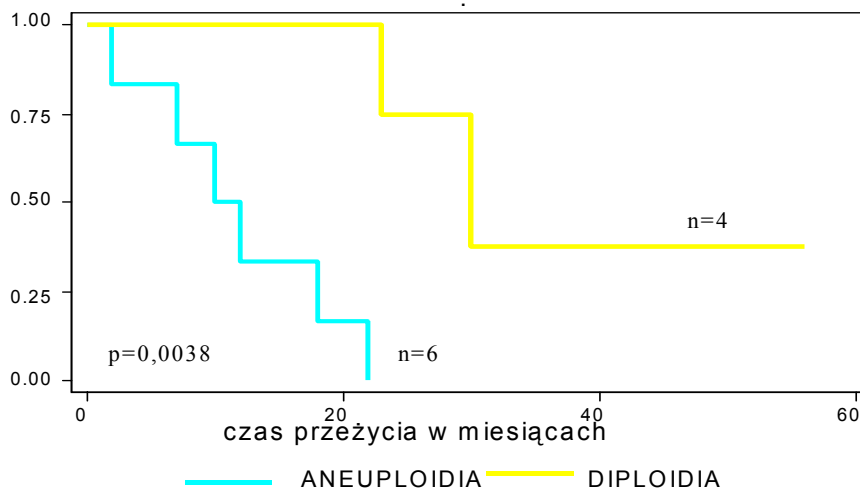
W badanej grupie stwierdzono gorsze rokowanie u chorych z nowotworem jasnokomórkowym w stosunku do całej grupy, ponieważ żadna z tych chorych nie przeżyła 18 miesięcy ($p=0,0078$). Mediany czasu przeżycia dla poszczególnych typów histopatologicznych kształtowały się następująco: rak surowiczy - 50% spadek przeżywalności nastąpił po 29 miesiącach, u chorych z rakiem śluzowym po 8, z rakiem endometrialnym po 43, u chorych z rakiem jasnokomórkowym po 13 i w grupie z rakiem niezróżnicowanym po 18. miesiącach.

Wykres 10. Całkowite przeżycia chorych w zależności od ploidy DNA w grupie chorych z rakiem surowiczym



Zależność ryzyka zgonu od rodzaju ploidy DNA stwierdzono w grupie chorych z rakiem surowiczym ($p=0,0002$) (Wykres 10). Mediana czasu przeżycia u chorych z nowotworem aneuploidalnym wyniosła 19 miesięcy, u chorych z nowotworem diploidalnym nie została osiągnięta. Spadek przeżywalności o 25% w grupie z nowotworem aneuploidalnym wystąpił w dziewiątym, a w grupie z nowotworem diploidalnym w 42. miesiącu.

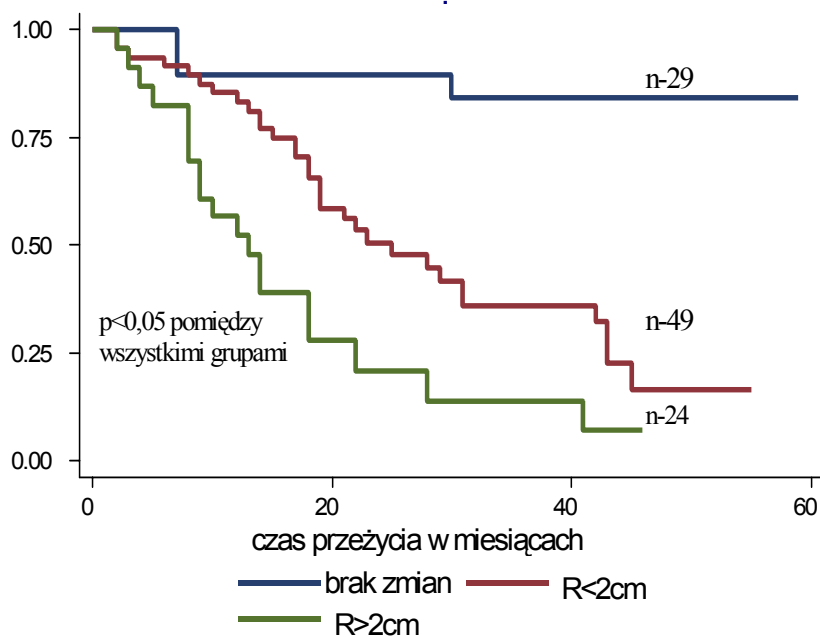
Wykres 11. Całkowite przeżycia chorych w zależności od ploidy DNA w grupie chorych z rakiem niezróżnicowanym.



U chorych z rakiem niezróżnicowanym również stwierdzono zależność ryzyka zgonu od rodzaju ploidii DNA ($p=0,0038$) (Wykres 11). Mediana czasu przeżycia u chorych z nowotworem aneuploidalnym wyniosła 10 miesięcy, a u chorych z nowotworem diploidalnym 30 miesięcy.

W pozostałych typach histologicznych nowotworu nie stwierdzono różnicy statystycznie znamiennej w zależności od ploidii DNA. W żadnej z grup nie stwierdzono zależności ryzyka zgonu od odsetka komórek w fazie S.

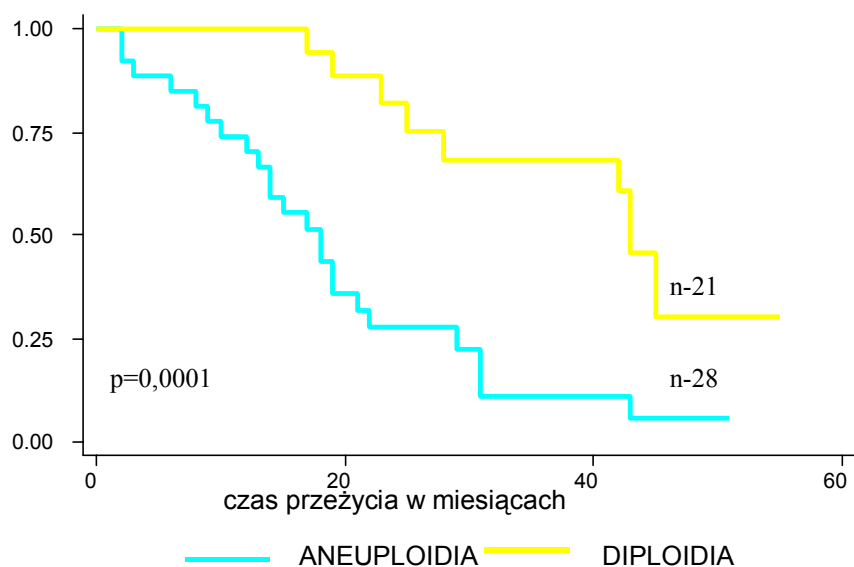
Wykres 12. Przeżycia chorych w zależności od wielkości zmian pozostawionych po pierwotnej operacji cytoredukcyjnej.



Na wykresie 12 przedstawiono zależność kumulowanej proporcji przypadków przeżywających od wielkości zmian resztkowych pozostawionych po pierwotnej operacji cytoredukcyjnej. Mediana czasu przeżycia w grupie bez pozostawionych zmian resztkowych nie została osiągnięta, w grupie ze zmianami o średnicy poniżej 2 cm wyniosła 25 miesięcy, a w grupie ze zmianami o średnicy powyżej 2 cm wyniosła 13 miesięcy. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami były statystycznie znamienne ($p<0,05$).

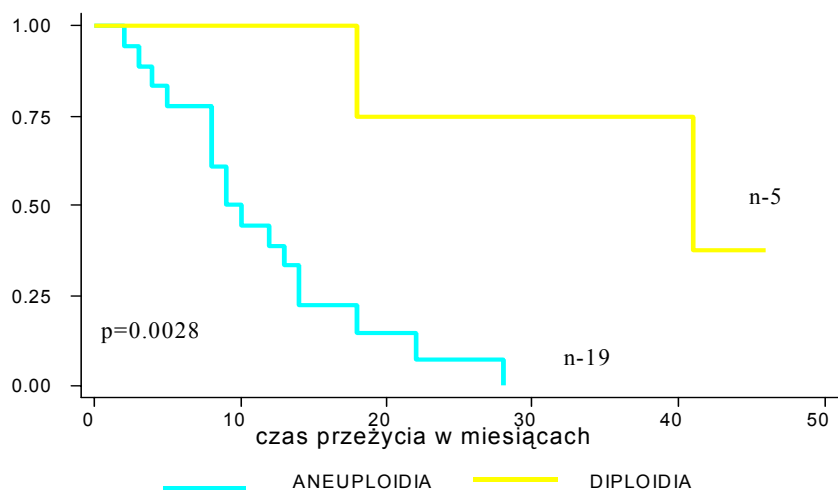
Analizowano zależność kumulowanej proporcji przypadków przeżywających w grupie chorych bez pozostawionych zmian resztkowych w zależności od rodzaju ploidii DNA. Stwierdzono brak statystycznie znamienych różnic w przeżywalności u chorych z rakiem diploidalnym i aneuploidalnym w tej grupie chorych ($p=0,3250$).

Wykres 13. Całkowite przeżycia chorych w zależności od ploiddii DNA w grupie ze zmianami resztkowymi R<2 cm.



W grupie ze zmianami resztkowymi R<2cm stwierdzono lepsze rokowanie u chorych z nowotworami diploidalnymi - mediana czasu przeżycia 43 miesiące podczas gdy w grupie z nowotworami aneuploidalnymi - 18 miesięcy (p = 0,0001) (Wykres 13).

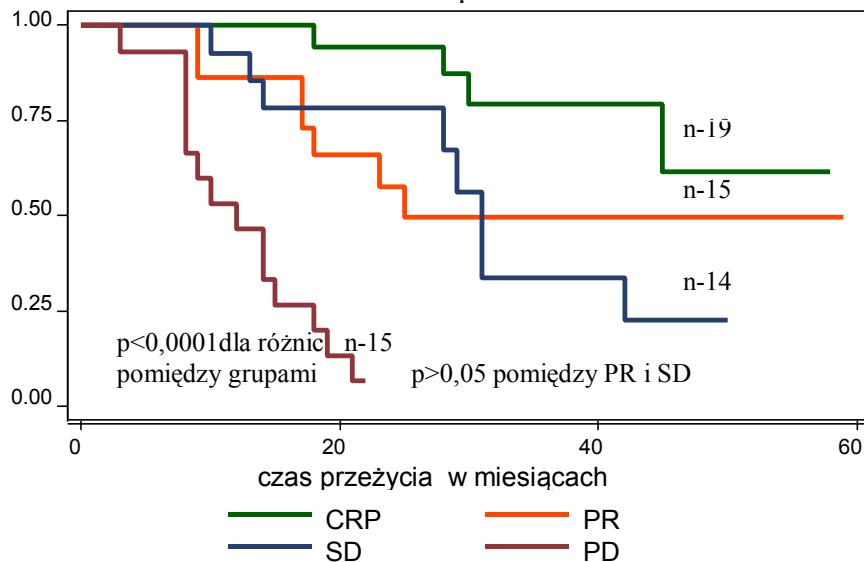
Wykres 14. Całkowite przeżycia chorych w zależności od ploiddii DNA w grupie ze zmianami resztkowymi R>2 cm



W grupie ze zmianami resztkowymi R>2cm stwierdzono również lepsze rokowanie u chorych z nowotworami diploidalnymi - mediana przeżycia 41 miesiące, niż w grupie z nowotworami aneuploidalnymi – odpowiednio 9 miesięcy (p= 0,0028) (Wykres14).

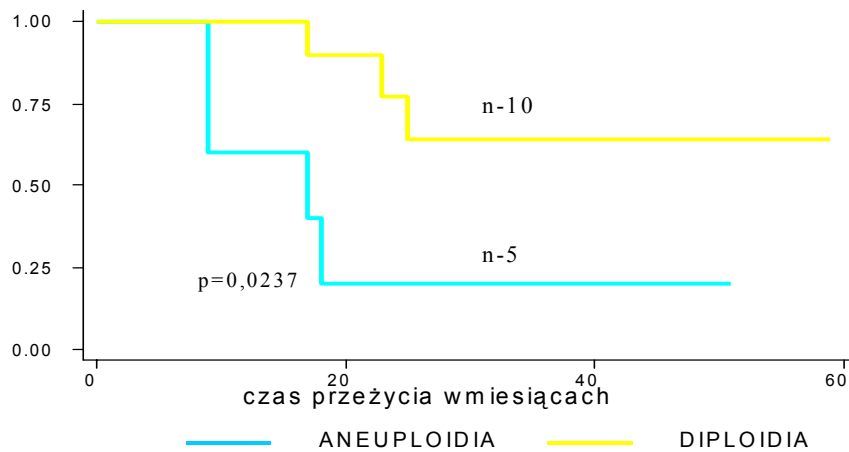
Nie stwierdzono znaczenia rokowniczego odsetka komórek fazy S w żadnej z grup.

Wykres 15. Całkowite przeżycia chorych w zależności od wyniku operacji sprawdzającej.



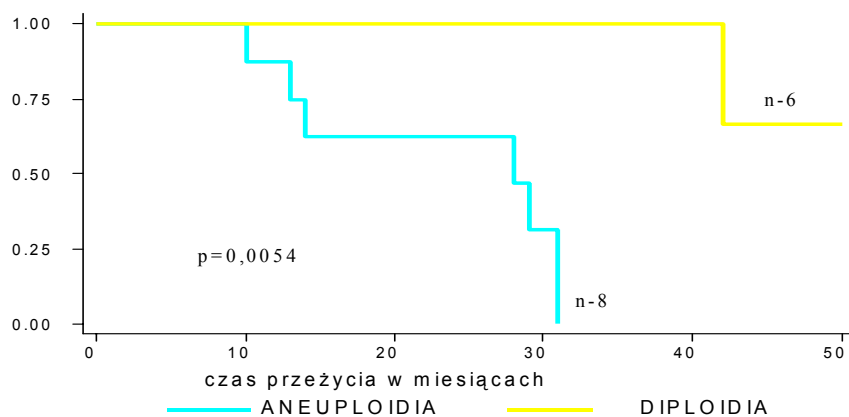
Na wykresie 15 przedstawiono zależność kumulowanej proporcji przypadków przeżywających od wyniku operacji SLO. Mediany i spadki przeżywalności o 25 % w badanej grupie przedstawiały się następująco: dla CRP - nie osiągnięto mediany, a spadek przeżywalności o 25% wystąpił po 45 miesiącach, w grupie z PR mediana - 25 miesięcy, a spadek przeżywalności o 25 % wyniósł 17 miesięcy, SD odpowiednio 31 i 28 miesięcy, PD – odpowiednio 12 i 8 miesięcy, różnice pomiędzy poszczególnymi grupami były statystycznie znamienne ($p < 0,0001$), pomiędzy grupą z SD i PR nie stwierdzono statystycznej różnicy ($p > 0,05$).

Wykres 16. Całkowite przeżycia w zależności ploidii DNA u chorych u których uzyskano PR w wyniku operacji sprawdzającej.



Następnie przeanalizowano wpływ ploidii DNA na przeżywalność w poszczególnych grupach wyników operacji sprawdzającej. Stwierdzono wpływ na przeżycia chorych w zależności od ploidii DNA w grupie z PR ($p=0,0237$). Mediany i spadki przeżywalności o 25 % wyniosły: dla chorych z guzami aneuploidalnymi odpowiednio 17 i 9 miesięcy, dla chorych z guzami diploidalnymi nie osiągnięto mediany czasu przeżycia, a spadek przeżywalności o 25% wystąpił po 25 miesiącach (Wykres 16).

Wykres 17. Całkowite przeżycia chorych w zależności ploidii DNA w grupie, w której uzyskano SD w wyniku operacji sprawdzającej.



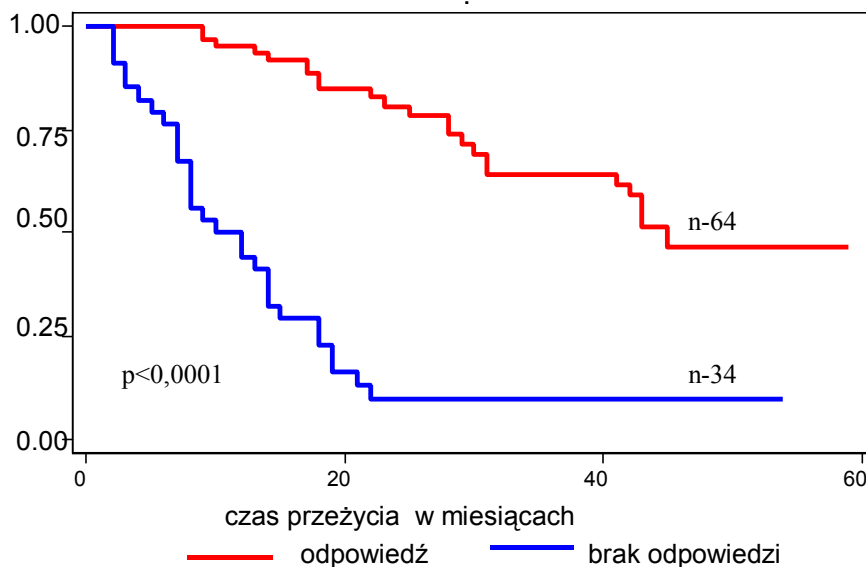
Stwierdzono również wpływ na przeżycia chorych w zależności od ploidii DNA w grupie z SD ($p=0,0054$). Mediany i spadki przeżywalności o 25 % wyniosły: dla chorych z guzami

aneuploidalnymi odpowiednio 28 i 13 miesięcy, dla chorych z guzami diploidalnymi nie osiągnięto mediany czasu przeżycia a spadek przeżywalności o 25% wystąpił po 45 miesiącach (Wykres 17).

Dla CRP i PD w wyniku operacji sprawdzającej w badanej grupie nie stwierdzono wpływu rodzaju ploidii DNA guzów na przeżycie chorych ($p > 0,05$).

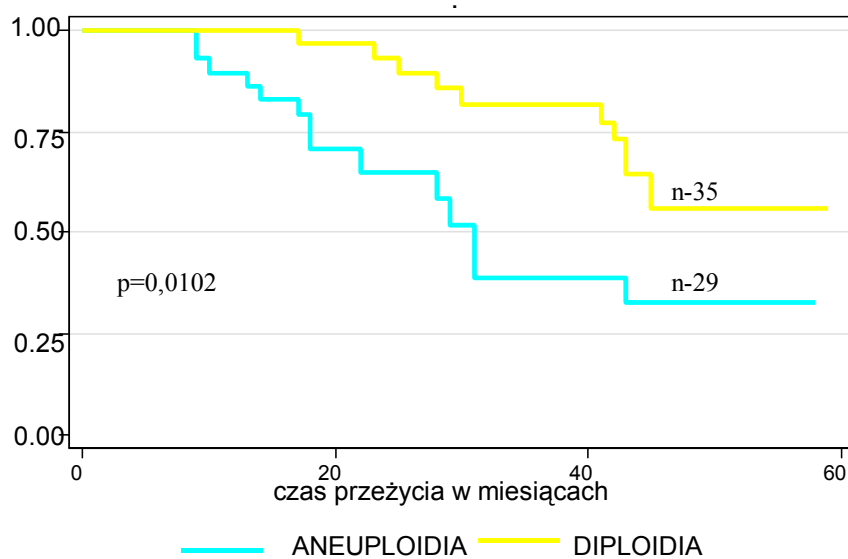
Nie stwierdzono wpływu odsetka komórek w fazie S na długość przeżycia chorych w żadnej grupie wyników operacji sprawdzającej ($p > 0,05$).

Wykres 18. Przeżycia chorych w zależności odpowiedzi na chemioterapię I rzutu.



Na wykresie 18 przedstawiono zależność kumulowanej proporcji przypadków przeżywających od odpowiedzi na chemioterapię pierwszego rzutu. Mediana czasu przeżycia w grupie pacjentek, które odpowiedziały na chemioterapię I rzutu wyniosła 45 miesięcy, w grupie pacjentek, które nie odpowiedziały pozytywnie - 12 miesięcy ($p < 0,0001$).

Wykres 19. Całkowite przeżycia chorych w zależności ploidii DNA w grupie z pozytywną odpowiedzią na chemioterapię I rzutu.



Następnie przeanalizowano wpływ ploidii DNA na przeżycie w poszczególnych grupach chorych. Stwierdzono, że w grupie pacjentek, które pozytywnie zareagowały na chemioterapię I rzutu: u chorych z rakiem z komórek aneuploidalnych mediana czasu przeżycia wyniosła 31 miesięcy, a spadek przeżywalności o 25% wystąpił po 18 miesiącach, u pacjentek z guzami diploidalnymi nie osiągnięto mediany, a spadek przeżywalności o 25% wystąpił po 42 miesiącach, różnica była statystycznie znamienne ($p=0,0102$) (Wykres 19).

Nie stwierdzono wpływu ploidii DNA u chorych, które nie odpowiedziały pozytywnie na chemioterapię I rzutu ($p=0,1027$). Nie stwierdzono wpływu odsetka komórek w fazie S na przeżycia chorych w żadnej z grup ($p<0,05$).

5. Dyskusja

Pomimo wprowadzania coraz nowszych sposobów leczenia raka jajnika, w dalszym ciągu 5-letnia prognoza przeżycia dla pacjenta, według danych FIGO z roku 2003, wynosi 46,4% i jak wykazują liczne badania, bardziej zależy od czynników rokowniczych związanych z biologią nowotworu, niż od zastosowanego postępowania (9, 98, 102). Powszechnie używane „tradycyjne” czynniki prognostyczne takie jak: stopień zaawansowania klinicznego, typ i zróżnicowanie histopatologiczne, wiek, wielkość guza, jakkolwiek zawierają informacje kliniczne, to, jak donoszą liczni badacze, nie zawsze są obiektywne i nie wystarczają do wdrożenia indywidualnego postępowania u poszczególnych pacjentek (9, 55). Informacje o potencjalnej złośliwości nieprawidłowo proliferujących komórek można uzyskać z analizy zawartego w nich DNA (76). Badania retrospektywne i prospektywne przeprowadzone w wielu niezależnych ośrodkach wskazują, że ploidia DNA oraz odsetek komórek w fazie S (SPF) są czynnikami prognostycznymi mającymi wpływ na osobniczy przebieg choroby i długoterminowe rokowanie (14, 17, 28, 37, 43, 45, 54, 65, 66, 90, 106, 134, 135, 141). Według Kaern i Trope w przypadku nowotworów o granicznej złośliwości ploidia DNA powinna mieć wpływ na postępowanie terapeutyczne (65, 136). Inni autorzy uważają, że ploidia DNA, a szczególnie odsetek komórek w fazie S nie mają znaczenia prognostycznego (38, 86). Barnabei natomiast stwierdził znaczenie SPF przy jednoczesnym braku znaczenia ploidii DNA jako czynnika rokowniczego (3).

5.1 Odsetek nowotworów aneuploidalnych

W badaniach nad ploidią DNA oznaczaną metodą cytometrii przepływową, częstość nowotworów z aneuploidalną zawartością DNA waha się od 48 % do 89% (14, 117).

W przedstawionym własnym materiale odsetek nowotworów aneuploidalnych wyniósł 62,75% (64 na 102 badane guzy) we wszystkich stopniach zaawansowania. Fridlander na grupie 123 chorych stwierdził aneuploidię w 73% przypadków, jednak badanie to było przeprowadzone u pacjentek z III i IV stopniem zaawansowania według FIGO (44). Inni badacze jak: Kimmig, a w polskich badaniach Pietrzak i Obrębowska, stwierdzili odpowiednio 60,68% i 66,7 % oraz 44% nowotworów aneuploidalnych we wszystkich stopniach zaawansowania (71, 97, 106). W ostatnim cytowanym badaniu raki w niskim stopniu zaawansowania klinicznego stanowiły aż 49%, co może tłumaczyć mniejszy odsetek

nowotworów aneuploidalnych. Należy również podkreślić, że w ocenie różnych autorów heterogenność populacji komórek nowotworowych wynosi, w zależności od badania, od 8 do 27% (64, 66). Ponadto nowotwory z nieprawidłowym kariotypem mogą w badaniu FC wykazywać diploidalną ilość DNA (19, 64, 66). Przedstawione powyżej przyczyny mogą tłumaczyć różnice w częstości występowania nowotworów aneuploidalnych w badaniach pochodzących z różnych ośrodków.

5.2 Wiek jako czynnik rokowniczy, występowanie nowotworów z aneuploidalną populacją komórek w zależności od wieku

Wiek chorych jest uznanym czynnikiem prognostycznym (9, 10, 32, 102, 118, 132). W przeprowadzonym badaniu potwierdzono w analizie jednoczynnikowej znaczenie wieku jako czynnika prognostycznego i stwierdzono, że im starszy wiek w momencie rozpoznania choroby, tym gorsze rokowanie. W analizowanym materiale wyniki są zgodne z danymi przedstawianymi w przytaczanych powyżej doniesieniach. Zdaniem niektórych autorów, na pogorszenie rokowania z wiekiem może mieć wpływ spadek możliwości obronnych układu immunologicznego organizmu (32). Istnieją również hipotezy, że naturalny proces starzenia organizmu ma wpływ na gorsze rokowanie u chorych w starszym wieku, z tego powodu niektórzy autorzy w swoich badaniach nad czynnikami prognostycznymi wyłączały z badania pacjentki w wieku powyżej 70. roku życia (135).

Następnie sprawdzono, czy istnieje związek pomiędzy występowaniem nowotworów z aneuploidalną populacją komórek a wiekiem pacjentki w momencie rozpoznania choroby. Stwierdzono znamienne częstsze występowanie nowotworów diploidalnych u chorych w młodszym wieku oraz rosnącą z wiekiem częstość występowania nowotworów aneuploidalnych. Średni wiek pacjentek z nowotworami diploidalnymi wyniósł 50,55 lat, a w grupie z nowotworami aneuploidalnym 57,22 lata. Podobny wynik osiągnął Gajewski, który podzielił badane pacjentki na grupy poniżej i powyżej 60. roku życia (45). W grupie młodszej nowotwory aneuploidalne występowały w 69% przypadków, a u chorych powyżej 60 roku życia w 80% przypadków. Vergote w badaniu nad ploidią DNA u pacjentek w stopniu zaawansowania I według FIGO stwierdził większą częstość występowania nowotworów aneuploidalnych w grupie chorych powyżej 50 roku życia (141). W polskim badaniu Pietrzak stwierdził większą częstość nowotworów aneuploidalnych w starszym wieku (106). Kaern w swoim badaniu również wykazał trend do większej częstości występowania nowotworów aneuploidalnych u chorych starszych (64). W badaniu nad nowotworami

o granicznej złośliwości ten sam autor potwierdził powyższą zależność (65). Sugeruje on, że wynika to z osłabienia z wiekiem mechanizmów reperacji DNA oraz nasilających się zaburzeń immunologicznych. Natomiast Kigawa nie potwierdził zależności wieku i ploidii DNA. Średni wiek chorych z nowotworami diploidalnymi wyniósł 52,6 lat, a chorych z nowotworami aneuploidalnymi 54,4 lat. Jednakże badanie to uwzględniało tylko pacjentki z nowotworami w wysokim stopniu zróżnicowania histopatologicznego (70).

5.3 Stopień zaawansowania według FIGO jako czynnik rokowniczy.

Występowanie nowotworów z aneuploidalną zawartością komórek w poszczególnych stopniach zaawansowania oraz wpływ ploidii na rokowanie

Stopień zaawansowania według FIGO jest powszechnie uznawanym czynnikiem rokowniczym (9, 10, 19, 77, 102). W analizowanym materiale stwierdzono zależność czasu przeżycia chorych od stopnia zaawansowania według FIGO: im wyższy stopień zaawansowania tym gorsze rokowanie co do długoletniego przeżycia. Wyniki badań własnych potwierdziły wpływ stopnia zaawansowania według FIGO na rokowanie u chorych na raka jajnika (9, 10, 19, 77, 102). Ponadto badania własne w analizie wieloczynnikowej wykazały, że I stopień zaawansowania według FIGO jest niezależnym czynnikiem rokowniczym i ma pozytywny wpływ na rokowanie. Znany problemem związanym z podziałem według FIGO, podnoszonym przez licznych autorów, jest trudność poprawnej oceny stopnia zaawansowania (99, 104, 105, 125). Istnieje zgodność co do faktu, że poprawne oznaczenie stopnia zaawansowania ma istotny wpływ na rokowanie i dalsze postępowanie terapeutyczne, szczególnie u chorych w I stopniu zaawansowania (125, 135). W pracy oceniano, czy istnieje korelacja pomiędzy stopniem zaawansowania według FIGO, a ploidią DNA w komórkach nowotworu. Stwierdzono, że u chorych I stopniu zaawansowania nowotwory diploidalne występują częściej w porównaniu do pozostałych grup pacjentek. Podobne wnioski opublikowali Kimmig, Erba, Iversen oraz w polskim badaniu Obrębowska (38, 61, 71, 97). Następnie w przedstawianym materiale analizowano wpływ ploidii DNA na przeżycie chorych w poszczególnych stopniach zaawansowania według FIGO. Stwierdzono znamienne lepsze przeżycie chorych w III stopniu zaawansowania z nowotworami diploidalnymi. W pozostałych stopniach zaawansowania zawartość DNA nie miała znaczenia

prognostycznego. Podobne wyniki osiągnął Kigawa (70). Gajewski wykazał znaczenie ploidii DNA jako niezależnego czynnika rokowniczego w I i II stopniu zaawansowania FIGO, natomiast nie stwierdził znaczenia w III i IV stopniu zaawansowania (45). Fridlander stwierdził znaczenie ploidii DNA w stopniach zaawansowania FIGO od I do III. Natomiast rokowanie u pacjentek w IV stopniu zaawansowania było złe, niezależnie od rodzaju ploidii DNA (44). Trope oraz Schueler stwierdzili, że zawartość ploidii DNA jest niezależnym czynnikiem rokowniczym u pacjentek w niskich stopniach zaawansowania według FIGO (121, 135). Kimmig w swoim badaniu stwierdził nadrzędne znaczenie stopnia zaawansowania według FIGO nad ploidią DNA, która w jego badaniu nie była silnym czynnikiem rokowniczym (71). Podobnie Meyer nie stwierdził znaczenia ploidii DNA jako niezależnego czynnika rokowniczego u chorych z nowotworami w wysokich stopniach zaawansowania (86).

5.4 Stopień zróżnicowania histopatologicznego jako czynnik rokowniczy. Wpływ ploidii DNA na rokowanie w poszczególnych stopniach zróżnicowania histopatologicznego

Stopień zróżnicowania histopatologicznego jest powszechnie uznawanym czynnikiem rokowniczym (9, 10, 19, 77, 102, 141). W przedstawianym własnym materiale, w analizie jednoczynnikowej stwierdzono zależność przeżycia chorych od stopnia zróżnicowania histologicznego: im wyższy stopień zróżnicowania (G) tym gorsze rokowanie. W badaniu własnym potwierdzono wielokrotnie opisywany wpływ zróżnicowania histologicznego na rokowanie u chorych na raka jajnika (9, 10, 77, 102, 118). Opisywaną przez licznych autorów wadą oznaczania stopnia zróżnicowania histopatologicznego jako czynnika rokowniczego jest zależność oceny tego czynnika od subiektywnego odczucia badającego patologa (9, 104). Ponadto nie ma zgodności co do tego, czy ten sam system stopniowania można zastosować przy różnych typach zróżnicowania tkankowego nowotworu (9). Analizując w przedstawianym materiale korelację ploidii DNA ze stopniem zróżnicowania histopatologicznego nie stwierdzono statystycznie znamienych różnic w częstości występowania aneuploidii i diploidii pomiędzy poszczególnymi stopniami. Do podobnego spostrzeżenia doszedł Schueler analizując grupę 64 pacjentek z niskimi stopniami zaawansowania (121). Również Gajewski nie znalazł statystycznie znamiennej korelacji ploidii DNA ze stopniem dojrzałości tkankowej (45). W polskim badaniu Pietrzak uzyskał

podobne wyniki, lecz z uwagi na niewielką liczebność grupy badanej nie wyciągnął wniosków (106). Innego zdania są natomiast Vergote, który stwierdził wzrost nowotworów aneuploidalnych w kolejnych stopniach zróżnicowania histologicznego, podobnie Kaern Trope oraz Iversen (61, 60, 64, 134, 141).

Badając wpływ ploidi DNA na przeżycia w poszczególnych stopniach zróżnicowania histopatologicznego, stwierdzono w analizowanym materiale lepsze rokowanie we wszystkich stopniach zróżnicowania G1-G3 u chorych z nowotworami diploidalnymi. Podobne wyniki uzyskali Rodenburg, Kaern i Kigawa u pacjentek z nowotworami niskozróżnicowanymi (70, 116, 134). Gajewski stwierdził, że dodanie informacji niesionej przez oznaczenie ploidi DNA w poszczególnych stopniach zróżnicowania histopatologicznego poprawia siłę rokowniczą badania (45). Barley potwierdził większe znaczenie rokownicze ploidi DNA od stopnia dojrzałości (12). Inni badacze jak Kimmig, Vergote, Meye, stwierdzili nadrzędne znaczenie zróżnicowania histopatologicznego nad ploidią DNA (71, 86, 141).

5.5 Typ histologiczny jako czynnik rokowniczy. Wpływ ploidi DNA na rokowanie w poszczególnych typach histologicznych

W analizie jednoczynnikowej w prezentowanym własnym materiale stwierdzono, że typ histologiczny raka jajnika nie miał znaczenia prognostycznego poza wąską grupą pacjentek, u których wystąpił rak jasnokomórkowy. Pacjentki te miały większe ryzyko zgonu. Podobne wyniki są powszechnie znane i publikowane w badaniach nad czynnikami prognostycznymi (9, 10, 19, 77, 102). Doniesienia dotyczące raka jasnokomórkowego są wciąż jednak niejednoznaczne i wymagają dalszych badań (9, 118). Również nasz materiał z powodu małej liczebności grupy (4 przypadki) nie nadaje się do wyciągania jednoznacznych wniosków. Oceniając zależność pomiędzy typem histologicznym a ploidią DNA, w analizowanym materiale nie stwierdzono różnic w częstości występowania nowotworów z aneuploidalną i diploidalną zawartością komórek w poszczególnych typach histologicznych. Podobnie większość badaczy nie wykazała związku pomiędzy ploidią DNA a typem histologicznym (12, 14, 70, 71, 116, 121). Natomiast Gajewski w swoim badaniu stwierdził stały rozkład częstości występowania aneuploidii w poszczególnych typach histologicznych z wyłączeniem raków typu endometrialnego. Nowotwory typu endometrialnego tylko w 2 na 10 przypadków charakteryzowały się aneuploidalną zawartością DNA. Autor ten jednak uważa, że liczba badanych była zbyt mała, by mogła stanowić podstawę do wyciągania wniosków (45).

Pietrzak stwierdził różnice w częstości występowania różnych rodzajów ploidii w poszczególnych typach histologicznych, jednocześnie zaznaczył, że badana grupa była zbyt mała by wyciągnąć jednoznaczne wnioski (106). Vergote w swoim badaniu nad nowotworami w niskim stopniu zaawansowania według FIGO stwierdził, że nowotwory endometrialne i śluzowe przeważnie były diploidalne, a nowotwory jasnokomórkowe znamienne częściej zawierały klony o szczególnym rodzaju aneuploidii - tetraploidalne (141). W analizowanym materiale własnym nie stwierdzono żadnego nowotworu diploidalnego na cztery aneuploidalne w grupie nowotworów jasnokomórkowych. Na przedstawianym materiale dokonano również analizy, czy w poszczególnych typach histologicznych ploidia DNA miała znamienny wpływ na przeżycie. Stwierdzono, że nowotwory aneuploidalne rokują gorzej w grupie pacjentek z guzami surowiczymi i niezróżnicowanymi. Gorsze rokowanie w nowotworach aneuploidalnych odnosi się w prezentowanym badaniu, jak u wielu innych autorów, do całej grupy badanej (14, 17, 28, 43, 45, 54, 66, 106, 116, 134). Grupy z nowotworami surowiczymi i niezróżnicowanymi są w przedstawianym materiale duże i jednorodne. Grupy z nowotworami jasnokomórkowymi i śluzowymi natomiast są małymi grupami, na podstawie których trudno wykazać zależność statystyczną. Mogło to mieć wpływ na uzyskane wyniki.

5.6 Ploidia DNA jako niezależny czynnik rokowniczy. Wpływ ploidii DNA na przeżycia chorych w zależności od doszczętności pierwotnej operacji cytoredukcyjnej. Wpływ ploidii DNA na wynik operacji sprawdzającej typu SLO.

Badania własne wykazały, że ploidia DNA posiada znaczenie jako niezależny czynnik rokowniczy. Prezentowane wyniki badań potwierdzają doniesienia innych autorów (14, 17, 19, 28, 43, 45, 54, 66, 71, 106, 116, 134, 135). Mniejsza grupa autorów nie wykazuje znaczenia ploidii DNA jako niezależnego czynnika rokowniczego (38, 86). Wszyscy badacze jednak podkreślają, że aneuploidia częściej koreluje z bardziej agresywnym przebiegiem klinicznym nowotworu. Spostrzeżenie to znajduje potwierdzenie w analizowanym materiale własnym. W prezentowanym materiale stwierdzono, że wielkość choroby resztkowej mierzona w centymetrach pozostawiona po pierwotnej operacji cytoredukcyjnej jest czynnikiem rokowniczym mającym wpływ na przeżycie. Wyniki przedstawianych badań własnych potwierdzają, podkreślane przez wielu autorów, znaczenie wielkości choroby

resztkowej jako czynnika rokowniczego (9, 19, 77, 118, 139). Obecnie wielu autorów uważa za doszczętny zabieg pierwotny, po którym nie pozostawiono żadnej widocznej makroskopowo zmiany w obrębie jamy brzusznej (32, 50, 139). W prezentowanym materiale zaobserwowano trend w kierunku większej częstości nowotworów aneuploidalnych występujących w grupie pacjentek, u których zmiany resztkowe pozostawione po pierwotnej operacji cytoredukcyjnej miały średnicę ponad 2 cm. Ponadto stwierdzono w grupie pacjentek z pozostawioną chorobą resztkową statystycznie znamienne dłuższe przeżycia u chorych z nowotworem diploidalnym.

Badając agresywność nowotworów w zależności od ploidii DNA odnotowano większą częstość nowotworów aneuploidalnych w grupie pacjentek, u których nastąpiła progresja choroby nowotworowej, stwierdzona podczas operacji sprawdzającej SLO. Podobną zależność zaobserwowano u pacjentek, u których w operacji sprawdzającej stwierdzono PD lub SD w porównaniu z pacjentkami, u których wystąpiła CRP lub PR. Ponadto pacjentki z nowotworami aneuploidalnymi w obydwu grupach miały znamienne krótszy czas przeżycia. Przedstawione dane potwierdzają spostrzeżenia cytowanych powyżej autorów licznych doniesień o większej agresywności raków z aneuploidalną zawartością DNA w komórkach (14, 17, 28, 43, 45, 54, 66, 71, 106, 116, 134, 135).

5.7 Odpowiedź na chemioterapię I rzutu jako niezależny czynnik rokowniczy. Wpływ ploidii DNA na przeżycia chorych w zależności od odpowiedzi na chemioterapię I rzutu

W prezentowanym własnym materiale stwierdzono, iż odpowiedź na chemioterapię pierwszego rzutu jest niezależnym czynnikiem prognostycznym. Zależność tę opisywali również inni autorzy (9, 10, 77, 80, 98, 102). Pacjentki, u których wystąpiła progresja choroby podczas leczenia pierwszego rzutu, miały krótszy czas przeżycia (9, 77). Odpowiedź na chemioterapię pierwszego rzutu według Ozols jest jednym z podstawowych czynników rokowniczych i zależy w dużym stopniu od doszczętności zabiegu pierwotnego (98). Znaczenie odpowiedzi na chemioterapię podnoszone jest również przez innych autorów (80). W przedstawianej grupie chorych nie stwierdzono wpływu ploidii DNA na przeżycie u pacjentek, u których podczas leczenia chemioterapią I rzutu wystąpiła progresja choroby nowotworowej. Większą częstość nowotworów aneuploidalnych stwierdzono jednak w grupie pacjentek, które nie odpowiedziały pozytywnie na chemioterapię pierwszego rzutu. Podobne obserwacje poczynił Kigawa, który uważa, iż spowodowane jest to większą agresywnością

nowotworów aneuploidalnych (70). Podobne wnioski opublikowali inni autorzy (116, 134, 136). W grupie pacjentek, które zareagowały pozytywnie na chemioterapię I rzutu w badanym materiale stwierdzono dłuższe przeżycia u pacjentek z nowotworami diploidalnymi. Podobne wyniki prezentowało wielu badających przebieg leczenia chorych na raka jajnika. Stwierdzali oni w swoich doniesieniach większą agresywność nowotworów aneuploidalnych (14, 66, 70, 116, 134, 136).

5.8 Faza S

Znaczenie, jako czynnika rokowniczego, odsetka komórek w fazie S jest cały czas dyskutowane. Spośród najczęściej cytowanych autorów Kallioniemi, Henricksen, Barnabei podają znaczenie SFP jako niezależnego czynnika rokowniczego w jedno- bądź wieloczynnikowych analizach (3, 54, 66). W prezentowanej pracy nie stwierdzono znaczenia prognostycznego odsetka komórek w fazie S. Do podobnych wniosków doszli Meyer i Kaern (64, 86). Według obu autorów brak znaczenia SPF jako czynnika rokowniczego bierze się z trudności właściwego jej oznaczenia. Podobnego zdania jest Kigawa (70). Za jedną z przyczyn uważa się zjawisko heterogeniczności nowotworów. Z powodu tego zjawiska nie wiadomo, czy populacja komórek, które posłużyły do oznaczania SPF zawiera wystarczający procent komórek aneuploidalnych i czy nie jest to populacja komórek ze zmienioną ilością komórek diploidalnych w stosunku do aneuploidalnych. Z drugiej strony w rakach diploidalnych może wystąpić zanieczyszczenie badanej populacji innymi prawidłowymi komórkami gospodarza. Poza tym autorzy ci uważają, że na histogramach piki charakterystyczne dla fazy G1 i G2 mogą nakładać się na część krzywej ilustrującej fazę S (64, 70, 86). Z tych powodów oznaczanie cytometryczne SPF jest nieprzydatne dla celów klinicznych. W przedstawianym materiale nie udało się również potwierdzić postulowanego przez niektórych badaczy znaczenia SPF w przewidywaniu odpowiedzi nowotworu na chemioterapię (11). Nie stwierdzono związku SPF z częstością odpowiedzi na chemioterapię I rzutu. Nie stwierdzono także opisywanych przez Christov i Iversen statystycznie znamiennych związków SPF ze znanymi czynnikami rokowniczymi (20, 60). Odnotowano jedynie zwiększony procent komórek w fazie S w nowotworach jasnokomórkowych. Zależność ta jest jednak trudna do interpretacji z uwagi na zbyt małą liczebność badanej grupy. Wyniki przedstawionego badania potwierdzają stanowisko Kaern, Meyer, Brescia oraz Erba, Kigawa i innych o nieprzydatności oznaczania SPF do badań klinicznych (14, 38, 64, 70, 86).

6. WNIOSKI

1. Ploidia DNA oznaczana za pomocą cytometrii przepływowej jest niezależnym czynnikiem rokowniczym u chorych na raka jajnika.
2. I stopień zaawansowania raka jajnika według klasyfikacji FIGO jest niezależnym czynnikiem rokowniczym, ma pozytywny wpływ na rokowanie.
3. Odpowiedź na chemioterapię I rzutu, w leczeniu skojarzonym chorych na raka jajnika, jest niezależnym czynnikiem rokowniczym, ma pozytywny wpływ na rokowanie.
4. Nowotwory z diploidalną zawartością DNA występują częściej u chorych w młodszym wieku i w niskich stopniach zaawansowania według FIGO.
5. Nowotwory z aneuploidalną zawartością DNA występują częściej u pacjentek, u których stwierdzono progresję procesu nowotworowego podczas chemioterapii pierwszego rzutu.
6. Nie stwierdzono różnic w częstości występowania danego typu ploidii w zależności od: typu histologicznego nowotworu, stopnia dojrzałości histopatologicznej nowotworu, doszczętności pierwotnej operacji cytoredukcyjnej.
7. Zawartość procentowa komórek w fazie S, w naszym materiale nie ma znaczenia jako czynnik rokowniczy u chorych na raka jajnika.
8. Oznaczanie ploidii DNA jest możliwe i przydatne w warunkach Kliniki Ginekologii Instytutu Położnictwa i Chorób Kobiety AMG i powinno być wykonywane rutynowo.

7. STRESZCZENIE

Rak jajnika jest szóstym pod względem częstości występowania a jednocześnie jednym z nowotworów powodujących największą śmiertelność u kobiet w Polsce. Zachorowalność na raka jajnika stale wzrasta w świecie, jest różna w poszczególnych regionach geograficznych i dla różnych grup etnicznych. Również umieralność na raka jajnika wzrasta w Polsce i na świecie, wzrost ten, różny w poszczególnych dekadach, jest jednak wolniejszy, niż wzrost zachorowalności. Pomimo wprowadzania coraz nowszych sposobów leczenia, uzyskiwane wyniki są w dalszym ciągu niezadowalające, a wynik 5-letnich przeżyć, choć wzrósł w świecie do 48,4% w latach 1993-1995, to jednak jest wciąż zbyt mały. Kolejne wyniki badań z lat 1996-1998 wykazały spadek 5-letnich przeżyć do 46,4%. Z powyższych względów wielu ekspertów uważa, że osiągnięto szczyt możliwości leczenia za pomocą współczesnej chemioterapii, opartej na pochodnych platyny i taxanach.

W pracy podjęto próbę analizy zależności pomiędzy ploidią DNA i zawartością procentową komórek w fazie S a następującymi czynnikami prognostycznymi w raku jajnika: stopniem zaawansowania klinicznego, typem histologicznym, stopniem zróżnicowania histopatologicznego, stężeniem markera CA 125 w surowicy krwi w czasie rozpoznania raka jajnika, wiekiem pacjentek w czasie rozpoznania choroby, doszczętnością pierwotnej operacji cytoredukcyjnej, odpowiedzią na chemioterapię I rzutu, wynikiem operacji sprawdzającej. Ponadto wyznaczono niezależne czynniki rokownicze w badanej grupie chorych i sprawdzono czy frakcja procentowa komórek w fazie S (SPF) jest czynnikiem rokowniczym. Cel realizowano przez wykonanie oznaczeń ploiddi DNA w komórkach raka jajnika przy użyciu cytometru przepływowego FACS-Calibur firmy Becton-Dickinson oraz statystyczne opracowanie uzyskanych wyników. Analizę przeprowadzono przy użyciu programu komputerowego Stata 8.0. W analizie czasu przeżycia oraz do wykreślenia krzywych przeżycia stosowano metodę Kaplana-Meiera. W analizie czynników rokowniczych stosowano test logrank oraz jednoczynnikowy test Coxa. Za poziom istotności przyjęto wartość $p=0,05$.

Badaniem objęto 102 kobiety, u których wykonano pierwotny zabieg cytoredukcyjny w Klinice Ginekologii Akademii Medycznej w Gdańsku od stycznia 1998 do lipca 2002. Najstarsza pacjentka w chwili rozpoznania miała 82 lata najmłodsza 24, średni wiek 54 lata i 9 miesięcy, mediana 53. U wszystkich pacjentek wykonano pierwotną operację cytoredukcyjną zgodnie z zaleceniami EORTC, której Klinika Ginekologii jest stałym członkiem (ośrodek nr 551). Za operację doszczętną przyjęto taką, po której nie pozostawiono zmian lub średnica największej pozostawionej zmiany nowotworowej nie przekraczała 20 mm. Najlicniejszą grupę stanowiły pacjentki w stopniu zaawansowania IIIc według klasyfikacji FIGO - 59 (57,84%), najmniej liczną – chore w stopniu zaawansowania IIA i IIIA (po jednym przypadku). Najlicniejszą grupę stanowiły przypadki surowiczego raka jajnika - 66 (64,70%), najmniej liczną guzy jasnokomórkowe - 4(3,9%). Najczęściej stwierdzano nowotwór o średniej dojrzałości histopatologicznej G2, który wystąpił u 43 kobiet (42,16%). Po operacji chore przenoszono do oddziału chemioterapii Kliniki Ginekologii, gdzie otrzymywały wielolekową chemioterapię dożylną. U pacjentek, u których osiągnięto całkowitą remisję kliniczną (CR) - ustąpienie wszelkich zmian i objawów choroby oraz które wyraziły zgodę, wykonywano operację sprawdzającą typu „second look” (SLO). Operację SLO wykonano u 63 pacjentek (61,76%). Tkanekę do oznaczenia ploidii DNA pobierano podczas pierwotnej operacji cytoredukcyjnej. Pobrany materiał (około 2 cm³) po dokładnym opisaniu dzielono na 4 części i umieszczano w hermetycznych pojemnikach. Pojemniki były zanurzane w ciekłym azocie w temp. -195,8°C. Czas od pobrania do umieszczenia w środowisku ciekłego azotu nie przekraczał 10 minut. Materiał przygotowano metodą detergentowo-trypsynową zaproponowaną przez Vindelov. Ogółem wykonano 156 oznaczeń ploidii DNA. W 29 przypadkach uzyskano współczynnik zmienności CV powyżej 5%. Współczynnik zmienności (CV) wykorzystuje się do oceny jakości histogramów DNA. Jest to stosunek odchylenia standardowego do szerokości sygnału G0/G1 lub subpopulacji, w połowie wysokości sygnału. Współczynnik CV dla komórek świeżych lub mrożonych nie może przekraczać wartości 5%. W tej grupie powtórzono badanie i w 20 przypadkach uzyskano prawidłowy CV. Pozostałe 9 przypadków wyłączono z analizy.

W 15 przypadkach przeprowadzono badania podwójnie, używając różnych wycinków tkanki nowotworowej. We wszystkich przypadkach uzyskano zbieżne wyniki. 10 oznaczeń wykonano z tkanki zdrowej celem kontroli jakości badania. W tych przypadkach uzyskano histogramy z diploidalną zawartością DNA $DI=1(\pm 5\%)$.

Do analizy statystycznej użyto wyników ze 102 pomiarów pozostałych po wyłączeniu wyników z tkanek zdrowych i podwójnych oznaczeń z guzów nowotworowych. W wybranej grupie 102 pacjentek zawartość procentową komórek w fazie S oznaczono w 95 przypadkach. W analizowanej grupie 102 pacjentek leczonych z powodu raka jajnika, diploidalną zawartość DNA w komórkach nowotworowych stwierdzono w 37,25% (38 /102) przypadków, klony aneuploidalne w 62,75% (64/102). Zawartość procentowa komórek fazy S w całej grupie wyniosła 13,0637%. Nie stwierdzono różnicy w zawartości procentowej komórek w fazie S w tkankach nowotworów diploidalnych i aneuploidalnych ($p=0,66$). Stwierdzono, że nowotwory z diploidalną zawartością DNA statystycznie znaczącej częściej występowały u pacjentek młodszych średnio o prawie 7 lat. Nie wykazano statystycznie znaczącej korelacji wieku chorych z procentową zawartością komórek fazy S w badanych guzach ($p=0,067$). Nie potwierdzono statystycznie znaczącej zależności pomiędzy typem histologicznym raka a zawartością DNA w komórkach nowotworowych. Badając zależność średniej zawartości komórek w fazie S w poszczególnych typach histopatologicznych, stwierdzono statystycznie znaczącą różnicę pomiędzy rakiem śluzowym - 7,37% komórek w fazie S a rakiem jasnokomórkowym - 18,83% ($p=0,023$). Nie stwierdzono różnic pomiędzy pozostałymi typami histopatologicznymi. W badanej grupie nie stwierdzono zależności pomiędzy ploidią DNA a stopniem zróżnicowania histopatologicznego. Nie stwierdzono również różnic między procentową zawartością komórek w fazie S w poszczególnych stopniach zróżnicowania histopatologicznego. Analizując zależność pomiędzy typem ploidi DNA a stopniem zaawansowania klinicznego wykazano: statystycznie znacząco częstsze występowanie komórek diploidalnych w nowotworach w I stopniu zaawansowania według FIGO w porównaniu do III° ($p=0,023$) i IV° ($p=0,022$). Nie odnotowano różnic między procentową zawartością komórek w fazie S w poszczególnych stopniach zaawansowania według FIGO. Nie potwierdzono zależności pomiędzy zawartością DNA ani zawartością procentową SFP w komórkach raka a doszczętnością pierwotnej operacji cytoredukcyjnej. Stwierdzono statystycznie znacząco większą częstość występowania aneuploidii w grupie pacjentek z progresją choroby nowotworowej (PD) w stosunku do reszty badanej grupy (CRP+PR+SD) ($p=0,001$). Nie wykazano żadnych zależności między wynikiem operacji SLO

a zawartością procentową komórek w fazie S. Stwierdzono częstsze występowanie aneuploidii w grupie, gdzie nie było odpowiedzi na chemioterapię pierwszego rzutu, w stosunku do grupy chorych, które odpowiedziały pozytywnie ($p < 0,0001$). Nie stwierdzono różnicy pomiędzy procentową zawartością komórek fazy S a odpowiedzią na chemioterapię pierwszego rzutu. Analizując czynniki ryzyka stwierdzano, że: wiek ma negatywny wpływ na rokowanie, im wyższy stopień zaawansowania według FIGO tym gorsze rokowanie, im większa dojrzałość histopatologiczna tym mniejsze ryzyko zgonu. Badając wpływ typu histologicznego nowotworu na ryzyko zgonu stwierdzono jedynie że rak jasnokomórkowy rokuje gorzej w stosunku do pozostałych rodzajów nowotworów ($p = 0,006$), jednak ze względu na małą liczbę przypadków należy do tego wyniku podchodzić z dużą rezerwą. Wykazano zależność między stężeniem antygenu CA 125 w surowicy w okresie przedoperacyjnym a ryzykiem zgonu: im wyższe stężenie antygenu CA 125 tym gorsze rokowanie ($p = 0,002$). Stwierdzono, że wynik operacji sprawdzającej SLO ma wpływ na ryzyko zgonu ($p < 0,001$). Przy negatywnym wyniku operacji SLO spadek przeżywalności o 25% wystąpił po 45 miesiącach, a u chorych, u których stwierdzono zmiany podczas operacji sprawdzającej spadek przeżywalności o 25 % wystąpił już po 17 miesiącach. Odnotowano mniejsze ryzyko zgonu w grupie chorych z rakiem diploidalnym. Stwierdzono trzy niezależne czynniki rokownicze: I stopień zaawansowania według FIGO zmniejsza ryzyko zgonu ($p < 0,001$), brak odpowiedzi na chemioterapię I rzutu zwiększa ryzyko zgonu ($p < 0,001$), diploidalna zawartość DNA pomniejsza ryzyko zgonu ($p < 0,019$). Przeprowadzona analiza pozwoliła na sformułowanie następujących wniosków: ploidia DNA oznaczana za pomocą cytometrii przepływowej jest niezależnym czynnikiem rokowniczym u chorych na raka jajnika. I stopień zaawansowania raka jajnika według klasyfikacji FIGO jest niezależnym czynnikiem rokowniczym, ma pozytywny wpływ na rokowanie. Odpowiedź na chemioterapię I rzutu w leczeniu skojarzonym chorych na raka jajnika jest niezależnym czynnikiem rokowniczym, ma pozytywny wpływ na rokowanie. Nowotwory z diploidalną zawartością DNA występują częściej u chorych w młodszym wieku i w niskich stopniach zaawansowania według FIGO. Nowotwory z aneuploidalną zawartością DNA występują częściej u pacjentek, u których stwierdzono progresję procesu nowotworowego podczas chemioterapii pierwszego rzutu. Nie stwierdzono różnic w częstości występowania danego typu ploiddii w zależności od: typu histologicznego nowotworu, stopnia dojrzałości histopatologicznej nowotworu, doszczętności pierwotnej operacji cytoredukcyjnej. Zawartość procentowa komórek w fazie S w naszym materiale nie ma znaczenia jako czynnik rokowniczy u chorych na raka jajnika.

Oznaczanie ploidi DNA jest możliwe i przydatne w warunkach Kliniki Ginekologii Instytutu Położnictwa i Chorób Kobietych AMG i powinno być wykonywane rutynowo.

8. PIŚMIEMMICTWO

1. Advanced epithelial ovarian cancer: 1998 consensus statements *Ann.Oncol.*1999;10(supl.1):87-92.
2. Anastasiadis P, Koutlaki N, Skaphida P, Perdikis V, Liberis V, Galazios G.. Ovarian cancer epidemiology in Thrace, Greece. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2000;21:298-302.
3. Auersperg N, Maines-Bandiera SL, Dyck HG Ovarian carcinogenesis and the biology of ovarian surface epithelium. *J Cell.Physiol.*1997;173:261-265.
4. Barnabei VM, Miller DS, Bauer KD, Murad TM, Rademaker AW, Lurain JR. Flow cytometric evaluation of epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 1990 ; 162: 1584-90.
5. Benedet JL, Hacker NF, Ngan HYS. Cancer of the ovary.In Staging clasifications and clinical practice guidness of gynaecologic cancers by FIGO Commitee on Gynecologic Oncology and IGCS Guidelines Committee 2003.
6. Berek JS, Bertelsen K, du Bois A, Brady MF, Carmichael J, Eisenhauer EA, Gore M, Grenman S, Hamilton TC, Hansen SW, Harper PG, Horvath G, Kaye SB, Luck HJ, Lund B, McGuire WP, Neijt JP, Ozols RF, Parmar MK, Piccart-Gebhart MJ, van Rijswijk R, Rosenberg P, Rustin GJ, Sessa C, Willemse PH, et al. Advanced epithelial ovarian cancer: 1998 consensus statements. *Ann Oncol.* 1999;10 (Suppl 1):87-92.
7. Berrino F, Capoccacia R, Esteve J,at.al. Survival of Cancer Patients in Europe: The Eurocare-2 Study .IARC Scientific Publications. Lyon 1999 :153.
8. Boczkowski K. Zarys genetyki medycznej PZWL Warszawa 1985.
9. Bosze P, Bast RC, Berchuck A, Burke HB, Buller RE, Creasman WT, Dubeau L, Fox H, Geisler HE, Geisler JP, Henson DE, Rustin GJ, Vermorken JB, Wells M, Wilbanks GD Conseusus statements on prognostic factors in epithelial ovarian carcinoma. Report of the Consensus Meeting organized by the European Society of Gynaecological Oncology, ESGO. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2000;21:513-26.
10. BoyleP, la Vecchia C, Walker A,Annual Report on the Results of Treatment in Gynaecological Cancer. International Federation of Gynaecolog and Obstetrics. 2001;1: 1-184
11. Braly PS, Klewacz RR, Flow cytometric evaluation of ovarian cancer. *Cancer* 1993;71(supl):1621-1628.
12. Braly PS. Flow cytometry as a prognostic factor in endometrial cancer--what does it add? *Gynecol Oncol.* 1995 ;58:145-7.
13. Brązert J,Pietryga M, Szabłoński W, Persona-Śliwińska A, Biczysko R. Wartość diagnostyczna morfologicznych indeksów ultrasonograficznych oraz oznaczeń stężenia Ca 125 w rozpoznawaniu nowotworów jajnika. *Gin-Pol* 2003;12:1542-1548.

14. Brescia RJ, Barakat RA, Beller U, Frederickson G, Suhrland MJ, Dubin N, Demopoulos RI. The prognostic significance of nuclear DNA content in malignant epithelial tumors of the ovary. *Cancer*. 1990 ;65:141-7.
15. Bręborowicz J Bręborowicz D. Patologia nowotworów jajnika wywodzących się z nabłonka pokrywającego i z podścieliska. W Markowska J. ed. *Onkologia ginekologiczna*. Urban&Partner Wrocław 2002 :771-781.
16. Brioschi PA, Irion O, Bischof P, Bader M, Forni M, Krauer F. Serum CA 125 in epithelial ovarian cancer. A longitudinal study. *Br J Obstet Gynaecol* 1987;94:196-201.
17. But I, Gorisek B. DNA-ploidy as an independent prognostic factor in patients with serous ovarian carcinoma. *Int J Gynaecol Obstet*. 2000 ;71:259-62.
18. Canistra S.A, Cancer of the ovary . *N.Eng.J.Med* 1993;329: 1550-57
19. Cervantes A. Prognostic factors in advanced ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 1997;7:1-4
20. Christov K, Vassilev N. Flow cytometric analysis of DNA and cell proliferation in ovarian tumors. *Cancer*. 1988 ; 61: 121-5.
21. Cramer DW, Hutchison GB, Welch WR, Scully RE, Ryan KJ. Determinants of ovarian cancer risk. I. Reproductive experiences and family history. *J Natl Cancer Inst*. 1983 ;71:711-6.
22. Creasman WT, Eddy GL. Prognostic factors in relation to second-look laparotomy in ovarian cancer. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*. 1989 ;3:183-90.
23. Creasman WT. Prognostic significance of the size of residual tumor and related prognostic factors . *CME Journal of Gynecologic Oncology* 1999;4:51-53.
24. Crissman JD, Zarbo RJ, Ma CK, Visscher DW. Histopathologic parameters and DNA analysis in colorectal adenocarcinomas. *Pathol Annu*. 1989;24 Pt 2:103-47.
25. Czerniak B, Eppich EM, Gorczyca W, et al. Cytometryczne pomiary ploidy DNA w raku jelita grubego. *Patol Pol* 1988;39:1-12.
26. D'Agnano I, D'Angelo C, Savarese A, Carlini M, Garofalo A, Bottari L, Santoro E, Giannarelli D, Vecchione A, Zupi G. DNA ploidy, proliferative index, and epidermal growth factor receptor: expression and prognosis in patients with gastric cancers. *Lab. Invest* 1995;72:432-438.
27. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer. Principal and practice of Oncology* . JB Lipincott. Philadelphia 1993.
28. Diebold J, Suchy B, Baretton GB, Blasenbren S, Meier W, Schmidt M, Rabes H, Lohrs U. DNA ploidy and MYC DNA amplification in ovarian carcinomas. Correlation with p53 and bcl-2 expression, proliferative activity and prognosis *Virchows Arch*. 1996;429:221-7.
29. Dikowska J, Wojciechowska U, Tarkowski W, Zatoński W. *Nowotwory złośliwe w Polsce w roku 2000*. Centrum Onkologii –Instytut. Warszawa 2003.
30. DiSaia P, Creasman W, *Epithelial ovarian cancer Clinical Gynecology Oncology*. Mosby Years Book 1997.
31. DiSaia P, Creasman W. *Epithelial ovarian cancer Clinical Gynaecology Oncology*. 6 th Eds :289:350 Mosby 2002

32. Dudziak M. Korelacja czynników kliniczno morfologicznych u chorych na raka jajnika na podstawie operacji sprawdzających typu „second look” Rozprawa na stopień doktora medycyny Akademia Medyczna w Gdańsku 1999
33. Eisenhauer EA, Vermorken JB, van Glabbeke M. Predictors of response to subsequent chemotherapy in platinum pretreated ovarian cancer: a multivariate analysis of 704 patients [seecomments] *Ann Oncol.* 1997 ;8:963-8.
34. Emerich J. Profilaktyka i leczenie nowotworów jajnika Medipress Ginekologia Gdańsk 1998.
35. Emerich J. Nowoczesne metody diagnostyczno-lecznicze u chorych na raka jajnika, ze szczególnym uwzględnieniem pooperacyjnej chemioterapii dootrzewnowej, przy zastosowaniu wszczepianych cewników. Rozprawa habilitacyjna Akademia Medyczna w Gdańsku 1993.
36. Emoto M, Udo T, Obama H, Eguchi F, Hachisuga T, Kawarabayashi T. The blood flow characteristics in borderline ovarian tumors based on both color Doppler ultrasound and histopathological analyses.. *Gynecol Oncol.* 1998;70:351-7.
37. Erba E, Giordano M, Danova M, Mazzini G, Ubezio P, Torri V, Mangioni C, Landoni F, Bolis P, Tenti P, et al. Cell kinetics of human ovarian cancer with in vivo administration of bromodeoxyuridine.. *Ann Oncol.* 1994 ;5:627-34.
38. Erba E, Ubezio P, Pepe S, Vaghi M, Marsoni S, Torri W, Mangioni C, Landoni F, D'Incalci M. Flow cytometric analysis of DNA content in human ovarian cancers. *Br J Cancer.* 1989 ;60:45-50.
39. Fangman LW, Kishimoto T, Kohiyama M, Coath C. Cell division and the Replicon. HFSP. Strasburg 2000.
40. Fathala M.F. Factors in causation and incidence of ovarian cancer. *Obstet Gynecol Surv* 1972;27:751-755.
41. Fathala MF. Incessant ovulation :a factor in ovarian neoplasia? *Lancet.* 1971; 2-163-167.
42. Franceschi S, Parazzini F, Negri E, Booth M, La Vecchia C, Beral V, Tzonou A, Trichopoulos D. Pooled analysis of 3 European case-control studies of epithelial ovarian cancer: III. Oral contraceptive use *Int J Cancer.* 1991;49:61-65.
43. Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW, Russell P, Coates AS, Tattersall MH. Influence of cellular DNA content on survival in advanced ovarian cancer. Influence of cellular DNA content on survival in advanced ovarian cancer. *Cancer Res.* 1984 ;44:397-400.
44. Friedlander ML, Hedley DW, Swanson C, Russell P. Prediction of long-term survival by flow cytometric analysis of cellular DNA content in patients with advanced ovarian cancer. *J. Clin Oncol.* 1988 ; 6: 282-90.
45. Gajewski WH, Fuller AF Jr, Pastel-Ley C, Flotte TJ, Bell DA. Prognostic significance of DNA content in epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol* 1994;53:5-12.
46. Gerber J. Obraz kliniczny raka jajnika. W Markowska J. ed. *Onkologia ginekologiczna.* Urban&Partner Wrocław 2002 :759-765.
47. Goff BA, Mandel L, Muntz H.G, Melancon CH Ovarian carcinoma diagnosis. Results of a national ovarian cancer survey. *Cancer* 2000;89:2068-75.

48. Grab D, Flock F, Stohr I, Nussle K, Rieber A, Fenchel S, Brambs HJ, Reske SN, Kreienberg R. Classification of asymptomatic adnexal masses by ultrasound, magnetic resonance imaging, and positron emission tomography. *Gynecol Oncol*.2000;77:454-459.
49. Green JA, Berns ELS, Hensen Logmans S, et al. Biological markers in ovarian cancer implications for clinical practice. *CME J of Gynecol Oncol* 1999;1: 13-21.
50. Hacker NF, Berek JS, Lagasse LD, Nieberg RK, Elashoff RM. Primary cytoreductive surgery for epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol*.1983;61:413-420.
51. Hata K, Hata T, Manabe A, Kitao M. Ovarian tumors of low malignant potential: transvaginal Doppler ultrasound features. *Gynecol Oncol*. 1992;45:259-264.
52. Hedley DW, Shankey TV, Wheelless LL. DNA Cytometry Consensus Conference. *Cytometry* 1993;11:471-474.
53. Hedley DW. DNA Cytometry Consensus Conference. DNA flow cytometry and breast cancer. *Breast cancer Res. Treat.* 1993;28:51-53.
54. Henriksen R, Strang P, Backstrom T, Wilander E, Tribukait B, Oberg K. Ki-67 immunostaining and DNA flow cytometry as prognostic factors in epithelial ovarian cancers *Anticancer Res.* 1994 ;14:603-8.
55. Hernandez E, Bhagavan BS, Parmley TH, Rosenshein NB. Interobserver variability in the interpretation of epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1984; 17:117-23.
56. Hoskins WJ, Eisenhauer EA, Van Glabbeke M, et al. Predicting outcome after initial relapse of epithelial ovarian cancer :can we identify patients who will not benefit from further therapy. *CME J of Gynecol Oncol* 1999;1: 64-68
57. Hoskins WJ, Rubin SC, Dulaney E, Chapman D, Almadrones L, Saigo P, Markman M, Hakes T, Reichman B, Jones WB, et al. Influence of secondary cytoreduction at the time of second-look laparotomy on the survival of patients with epithelial ovarian carcinoma. *Influence of secondary cytoreduction at the time of second look laparotomy on the survival of patients with epithelial ovarian carcinoma* *Gynecol Oncol*. 1989 ;34:365-71
58. Houlston RS, Collins A, Slack J, Campbell S, Collins WP, Whitehead MI, Morton NE. Genetic epidemiology of ovarian cancer: segregation analysis. *Ann Hum Genet* .1991;55:291-299.
59. Hubner KF, McDonald TW, Niethammer JG, Smith GT, Gould HR, Buonocore E. Assessment of primary and metastatic ovarian cancer by positron emission tomography (PET) using 2-[18F]deoxyglucose (2-[18F]FDG). *Gynaecol Oncol*. 1993;51:197-204.
60. Iversen OE, Skaarland E. Ploidy assessment of benign and malignant ovarian tumors by flow cytometry. A clinicopathologic study. *Cancer*. 1987 ; 60: 82-7.
61. Iversen OE. Prognostic value of the flow cytometric DNA index in human ovarian carcinoma. *Cancer*. 1988 ; 61: 971-5.
62. Jacobs IJ, Kohler MF, Wiseman RW, et al. Clonal origin of epithelial ovarian carcinoma: analysis by loss of heterozygosity, p53 mutation, and X-chromosome inactivation. *J Natl Cancer Inst*. 1992;84:1793-8.

63. Jochum W, Schroder S, al-Taha R, August C, Gross AJ, Berger J, Padberg BC. Prognostic significance of nuclear DNA content and proliferative activity in renal cell carcinomas. A clinicopathologic study of 58 patients using mitotic count, MIB-1 staining, and DNA cytophotometry. *Cancer*. 1996 ;77:514-21.
64. Kaern J, Trope CG, Kristensen GB, Pettersen EO. Flow cytometric DNA ploidy and S-phase heterogeneity in advanced ovarian carcinoma. *Cancer*. 1994 ; 73: 1870-7.
65. Kaern J, Trope CG, Kristensen GB, Abeler VM, Pettersen EO. DNA ploidy; the most important prognostic factor in patients with borderline tumors of the ovary. *Int J Gynecol Cancer*. 1993 ;3:349-358.
66. Kallioniemi OP, Punnonen R, Mattila J, Lehtinen M, Koivula T. Prognostic significance of DNA index, multiploidy, and S-phase fraction in ovarian cancer. *Cancer*. 1988 ;61:334-9.
67. Kantorski J. Podstawy cytometrii przepływowej. *Central European Journal of Immunology* 1996;21: 87-93.
68. Kawiak J. Rola i miejsce cytometrii przepływowej w badaniach klinicznych. *Central Eur Jour of Immunol*. 1996;21:94-98.
69. Khoo SK, Hurst T, Kearsley J, Dickie G, Free K, Parsons PG, Whitaker S, Ward B. Prognostic significance of tumor ploidy in patients with advanced ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1990 ;39:284-8.
70. Kigawa J, Minagawa Y, Ishihara H, Kanamori Y, Terakawa N. Tumor DNA ploidy and prognosis of patients with serous cystadenocarcinoma of the ovary. *Cancer*. 1993 ; 72: 804-8.
71. Kimmig R, Wimberger P, Hillemanns P, Kapsner T, Caspari C, Hepp H. Multivariate analysis of the prognostic significance of DNA-ploidy and S-phase fraction in ovarian cancer determined by flow cytometry following detection of cytokeratin-labeled tumor cells. *Gynecol Oncol*. 2002 ; 84: 21-31.
72. Kirchner H. Logistics of tumor immunology. *Klin Wochenschr*. 1982; 4:37-47.
73. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975 ;256(5517):495-7.
74. Kristensen GB, Trope C. Evaluation of the prognostic significance of DNA ploidy and S-phase fraction in cancer of the uterine cervix. *CME Journal of Gynecologic Oncology* 2001;6:192-195.
75. Krygier Stojalowska A, Gontarewicz A, Grzegorzółka R, Gapski Z. Wybrane aspekty zasad przygotowania materiału komórkowego do przepływowej DNA cytometrii. *Nowiny lekarskie* 1998; 67: 448-456.
76. Kulwiak-Domagala J. Cytofluorometria przepływowa zastosowanie w diagnostyce patomorfologicznej. *Magazyn medyczny* 1992;11: 9-10.
77. Manyś G. Czynniki prognostyczne w raku jajnika. W Markowska J. ed. *Onkologia ginekologiczna*. Urban&Partner Wrocław 2002 :789-796.
78. Markman M. Intraperitoneal chemotherapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1999 ;31:239-46.
79. Markman M. The use of PET scanning in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2002 May;85:391-2.

80. Markman M, Rothman R, Hakes T, Reichman B, Hoskins W, Rubin S, Jones W, Almadrones L, Lewis JL Jr. Second-line platinum therapy in patients with ovarian cancer previously treated with cisplatin. *J Clin Oncol.* 1991;9:389-93.
81. Markowska J. Markery nowotworowe w diagnozowaniu i monitorowaniu raka jajnika. W Markowska J ed. *Onkologia ginekologiczna.* Urban&Partner Wrocław 2002 :782-788.
82. Markowska J, Markowska A. Epidemiologia raka jajnika. W Markowska J. ed. *Onkologia ginekologiczna.* Urban&Partner Wrocław 2002 :751-757.
83. McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, Clarke-Pearson DL, Davidson M. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N Engl J Med.* 1996 ;334:1-6.
84. Mcknight E, Look KY. The surveillance of the patient with epithelial ovarian cancer following primary chemotherapy . *CME J.Gynecol.Oncol* 2001;6:147-164.
85. Melmed MR,Lindmo T,Mendelsohn ML. *Flow Cytometry and Sorting* Willey-Liss. New York 1990.
86. Meyer JS, Gersell DJ, Yim S. Cell proliferation in ovarian carcinoma: superior accuracy of S-phase fraction (SPF) by DNA labeling index versus flow cytometric SPF, lack of independent prognostic power for SPF and DNA ploidy, and limited effect of SPF on tumor growth rate. *Gynecol Oncol.* 2001 ;81:466-76.
87. Meyn MS. Ataxia telangiectasia and cellular responses to DNA damage .*Cancer Res.*1995;15:55(24):5991-6001.
88. Milczek T, Emerich J, Dębniak J, Liro M. Ocena czynników rokowniczych w leczeniu dootrzewnym chorych na raka jajnika. *Gin Pol* 2001; 72: 212-316.
89. Milczek T, Klasa-Mazurkiewicz D, Emerich J. DNA Ploidia and residual disease as prognostics factors in epithelial ovarian cancer. *Int J of Gynecol Cancer* 2004; 14 (supl. 1), 179(Abstrakt 245)
90. Murray K, Hopwood L, Volk D, Wilson JF. Cytofluorometric analysis of the DNA content in ovarian carcinoma and its relationship to patient survival. *Cancer.* 1989 ; 63: 2456-60.
91. Nagele F, Petru E, Medl M, et al. Preoperative CA 125: An Independent Prognostic Factor in Patients With Stage I Epithelial Ovarian Cancer. *Obstet Gynecol* 1995;86:259-263.
92. Napier MP, Rustin GSJ. Ca 125 as prognostic factor. *CME Journal of Gynecologic Oncology* 1999;1:24-29.
93. Ness RB, Cottreau C. Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91:1459-67.
94. Niezabitowski A, Lackowska B. Przydatność kliniczna oceny DNA przy użyciu cytometrii przepływowej w nowotworach ludzkich. *Caenr Eur Jour of Immunol.* 1996;21:147-155.
95. Niloff JM, Knapp RC, Lavin PT, Malkasian GD, Berek JS, Mortel R, Whitney C, Zurawski VR Jr, Bast RC Jr. The CA 125 assay as a predictor of clinical recurrence in epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1986;155:56-60.
96. Nishimura H, Tashiro M, Hamaguchi K, Kiyozuka Y, Ide H, Tateno N, Miyoshi T, Yakushiji M. Significance of the serum CA125 level in recurrent ovarian cancer. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol.* 1992 ;18:37-43.

97. Obrębowska A, Spaczyński M. Kliniczna wartość ploidii DNA w raku jajnika *Gin-Pol* 1997;10:478-483.
98. Ozols RF, Garvin AJ, Costa J, Simon RM, Young RC. Advanced ovarian cancer: correlation of histologic grade with response to therapy and survival. *Cancer* 1980;45:572-81.
99. Palfalvi L, Ungar L. The surgeon as prognostic factor. *CME J of Gynecol Oncol* 1999;1: 57-59.
100. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, et al. Cancer incidence in Five Continents. IARC Scientific publications Lyon 1997:143.
101. Paszyc S. Podstawy fotochemii. PWN Warszawa 1983.
102. Pecorelli S. 25th. Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynecol Oncol*. 2003;8 (supl.1)
103. Piccart MJ, Bertelsen K, James K, Cassidy J, Mangioni C, Simonsen E, Stuart G, Kaye S, Vergote I, Blom R, Grimshaw R, Atkinson RJ, Swenerton KD, Trope C, Nardi M, Kaern J, Tumolo S, Timmers P, Roy JA, Lhoas F, Lindvall B, Bacon M, Birt A, Andersen JE, Zee B, Paul J, Baron B, Pecorelli S. Randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results. *J Natl Cancer Inst*. 2000 ;92:699-708.
104. Pickel H. Prognostics factors in ovarian cancer. *CME Journal of Gynecol Oncol* 1999; 4 : 8-12.
105. Pietrzak K. Czynniki prognostyczne w leczeniu chorych na raka jajnika. Dom Wydawniczy BELLONA Warszawa 1999
106. Pietrzak K, Olszewski W. DNA Ploidy as a Prognostic Factor in Patients with Ovarian Carcinoma. *Pol J Pathol* 1998;49:141-144.
107. Pisani AL, Barbuto DA, Chen D, Ramos L, Lagasse LD, Karlan BY. HER-2/neu, p53, and DNA analyses as prognosticators for survival in endometrial carcinoma. *Obstet Gynecol*. 1995;85;729-734.
108. Piver MS. Nowotwory nabłonkowe jajnika. W Piver MS. Handbook of Gynaecologic Oncology. PZWL Warszawa 1999. 12-53.
109. Podratz KC, Malkasian GD Jr, Hilton JF, Harris EA, Gaffey TA. Second-look laparotomy in ovarian cancer: evaluation of pathologic variables. *Am J Obstet Gynecol* 1985;152-230-8
110. Puls LE, Duniho T, Hunter JE, Kryscio R, Blackhurst D, Gallion H. The prognostic implication of ascites in advanced-stage ovarian cancer. *Gynecol. Oncol* 1996;61:109-112.
111. Purdie DM, Bain CJ, Siskind V, Webb PM, Green AC. Ovulation and risk of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2003 ;104:228-32
112. Rabinovitch PS. Multicycle –A Program for DNA content and cell analysis. Rabinovitch-Phoenix 1991.
113. Ramel S, Reid BJ, Sanchez CA, Blount PL, Levine DS, Neshat K, Haggitt RC, Dean PJ, Thor K, Rabinovitch PS. Evaluation of p53 protein expression in Barrett's esophagus by two-parameter flow cytometry. *Gastroenterology*. 1992 ;102(4 Pt 1):1220-8.
114. Rebbeck TR. Prophylactic oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Eur J Cancer*. 2002 ;38 (Suppl 6):15-17.
115. Reles AE, Gee C, Schellschmidt I, Schmider A, Unger M, Friedmann W, Lichtenegger W, Press MF. Prognostic significance of DNA content and S-phase fraction in epithelial ovarian carcinomas analyzed by image cytometry. *Gynecol Oncol*. 1998 ;71:3-13.

116. Rodenburg CJ, Cornelisse CJ, Heintz PA, Hermans J, Fleuren GJ. Tumor ploidy as a major prognostic factor in advanced ovarian cancer. *Cancer*. 1987;59:317-23.
117. Rodenburg CJ, Cornelisse CJ, Hermans J, Fleuren GJ. DNA flow cytometry and morphometry as prognostic indicators in advanced ovarian cancer: a step forward in predicting the clinical outcome. *Gynecol Oncol*. 1988 ;29:176-87
118. Rubin S.C, Randall TC, Armstrong KA, et al. Ten-year follow-up of ovarian cancer patients after second-look laparotomy with negative findings *Obstet Gynecol* .1999;93:21-24.
119. Rzymiski K. Diagnostyka obrazowa raka jajnika W Markowska J. ed. *Onkologia ginekologiczna*. Urban&Partner Wrocław 2002 :766-770.
120. Sawicki W. Podział wzrost różnicowanie i śmierć komórek. W Kawiak J, Mirecka J, Olszewska M, Warchoń J. *Podstawy cytofizjologii*. PZWL Warszawa 1985 :344-363.
121. Schueler JA, Cornelisse CJ, Hermans J, Trimboś JB, van der Burg ME, Fleuren GJ. Prognostic factors in well-differentiated early-stage epithelial ovarian cancer. *Cancer*. 1993 ; 71: 787-95.
122. Serov SF, Scully RE, Sabin ZH, International histological classifications of tumours: histological typing of ovarian tumors. *Genawa WHO*, 1973:vol 9:17.
123. Shankey TV, Rabinovitch PS, Bagwell B, Bauer KD, Duque RE, Hedley DW, Mayall BH, Wheelless L, Cox C Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. *International Society for Analytical Cytology. Cytometry*. 1993;14:472-7.
124. Shapiro HM. *Practical Flow Cytometry*. AR Liss Inc. New York 1985:1-30.
125. Sharp F, Mason WP, Creasman W . *Ovarian cancer*. New York Chapman and Hall Medical 1992;351-356.
126. Sigurdsson K, Alm P, Gullberg B. Prognostic factors in malignant epithelial ovarian tumors. *Gynecol Oncol*. 1983 ;15:370-80.
127. Skowronek J . Ploidna DNA jako czynnik rokowniczy w nowotworach. *Nowotwory* 1997;47:343-353.
128. Skreń A, Obrzut B. Leczenie chirurgiczne raka jajnika. W Markowska J. ed. *Onkologia ginekologiczna*. Urban&Partner Wrocław 2002 :797-806.
129. Strauss K, Hannet I, Engels S, Shiba A, Ward DM, Ullery S, Jinguji MG, Valinsky J, Barnett D, Orfao A, Kestens L. Performance evaluation of the FACSCount System: a dedicated system for clinical cellular analysis. *Cytometry* 1996; 26:52-59.
130. Swenerton KD, Hislop TG, Spinelli J, LeRiche JC, Yang N, Boyes DA. Ovarian carcinoma: a multivariate analysis of prognostic factors. *Obstetrics Gynecol*.1985;65:264-270.
131. Thews O, Thews A, Huber C, Vaupel P. Computer assisted interpretation of flow cytometry data in haematology. *Cytometry* 1996;23: 140-149.
132. Thigpen T, Brady MF, Omura GA, Creasman WT, McGuire WP, Hoskins WJ, Williams S. Age as a prognostic factor in ovarian carcinoma. The Gynecologic Oncology Group experience. *Cancer* 1993;71(2 Suppl):606-14.
133. Trimboś JB, Vergote I, Bolis G, Vermorken JB, Mangioni C, Madronal C, Franchi M, Tateo S, Zanetta G, Scarfone G, Giurgea L, Timmers P, Coens C, Pecorelli S; EORTC-ACTION collaborators. European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage ovarian carcinoma: European

- Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant ChemoTherapy in Ovarian Neoplasm trial. *J Natl Cancer Inst.* 2003 ;95:113-25.
134. Trope C, Kaern J. DNA ploidy in epithelial ovarian cancer: a new independent prognostic factor? *Gynecol Oncol.* 1994 ;53:1-4.
 135. Trope C, Kaern J, Hogberg T, Abeler V, Hagen B, Kristensen G, Onsrud M, Pettersen E, Rosenberg P, Sandvei R, Sundfor K, Vergote I. Randomized study on adjuvant chemotherapy in stage I high-risk ovarian cancer with evaluation of DNA-ploidy as prognostic instrument. *Ann Oncol.* 2000 Mar;11:281-8.
 136. Trope C, Kaern J. Management of borderline tumors of the ovary: state of the art. *Semin Oncol.* 1998;25:372-80.
 137. Ushijima K, Nishida T, Ohkura N, Sugiyama T, Nishimura H, Miyoshi T, Yakushiji M. Reassessment of second look operation for epithelial ovarian cancer. *Kurume Med J.* 1996;43(1):17-24.
 138. Valesy R, Barth J, Vanlandengendonck F, et al. Initial results of Central European Immunophenotyping Quality Control Program (CEQUAL). *Cytometry (Comm.Clin.Cytometry)* 1996;26:108-112.
 139. van der Burg ME, van Lent M, Buyse M, Kobierska A, Colombo N, Favalli G, Lacave AJ, Nardi M, Renard J, Pecorelli S. The effect of debulking surgery after induction chemotherapy on the prognosis in advanced epithelial ovarian cancer. Gynecological Cancer Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *N Engl J Med.* 1995; 332:629-634.
 140. Vergote I, De Brabanter J, Fyles A, Bertelsen K, Einhorn N, Sevelde P, Gore ME, Kaern J, Verrelst H, Sjøvall K, Timmerman D, Vandewalle J, Van Gramberen M, Trope CG. Prognostic importance of degree of differentiation and cyst rupture in stage I invasive epithelial ovarian carcinoma. *Lancet* 2001;357:176-182.
 141. Vergote IB, Kaern J, Abeler VM, Pettersen EO, De Vos LN, Trope CG. Analysis of prognostic factors in stage I epithelial ovarian carcinoma: importance of degree of differentiation and deoxyribonucleic acid ploidy in predicting relapse. : *Am J Obstet Gynecol.* 1993 ; 169: 40-52.
 142. Vermorken JB. The role of intraperitoneal chemotherapy in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2000 ;10(S1):26-32.
 143. Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry.* 1983 ;3:323-7.
 144. Visakorpi T, Holli K, Hakama M. High cell proliferation activity determined by DNA flow cytometry and prognosis in epidermoid lung carcinoma. *Acta Oncol.* 1995;34:605-609.
 145. Wersto RP, Liblit RA, Koss LG. Flow cytometric DNA analysis of human solid tumors: a review of the interpretation of DNA histograms. *Human. Pathol* 1991;22:1085-1098.
 146. Witkowski J. Cytometria przepływowa w badaniach transportu błonowego-uwagi metodyczne. *Central European Journal of Immunology* 1996;21: 171-181.
 147. Wronkowski Z, Zwierko M. Nowotwory złośliwe w Polsce, Uniwersalny przednik po metodach leczenia nowotworów *Hannach Publ.* 2000: 13-21.
 148. Wronkowski Z, Zwierko M, Romejko M. Ocena wyleczalności nowotworów złośliwych w Warszawie w latach 1963-1988. *Centrum Onkologii- Instytut Warszawa* 1995.
 149. Young RC. Initial therapy for early ovarian carcinoma.. *Cancer.* 1987 ;60(Suppl):2042-9.

150. Young RC, Walton LA, Ellenberg SS, Homesley HD, Wilbanks GD, Decker DG, Miller A, Park R, Major F J. Adjuvant therapy in stage I and stage II epithelial ovarian cancer. Results of two prospective randomized trials. *N Eng J Med.* 1990;322:1021-1027.
151. Zarbo RJ. Quality control issues technical consideration in flow cytometric DNA and cell-cycle analysis in solid tumors. *W: Flow Cytometry and Clinical Diagnosis . DF Keren, CA Hanson, PE Hurtubise, American Society of Clinical Pathologists. Chicago 1994:45, 425-469.*
152. Zatoński W. Epidemiology of cancer in Eastern Europe: special attention to cervical and ovarian carcinomas .*European School of Oncology. Warszawa 1996.*
153. Zatoński W, Tyczyński J. Nowotwory złośliwe w Polsce w 1996. Centrum Onkologii –Instytut. Warszawa 1999.
154. Zimny M, Siggelkow W, Schroder W, Nowak B, Biemann S, Rath W, Buell U. 2-[Fluorine-18]-fluoro-2-deoxy-d-glucose positron emission tomography in the diagnosis of recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2001 ;83:310-5.

9. WYKAZ UŻYTYCH W TEKŚCIE SKRÓTÓW

W niektórych przypadkach przytoczono pełną nazwę obcojęzyczną, z powodu braku zwyczajowych nazw w języku polskim.

AUC	pole pod krzywą stężenia w czasie
°C	stopień Celsjusza
¹¹C	izotop węgla
CA 125	antygen, marker nowotworowy, glikoproteina
CA72.4	antygen, marker nowotworowy, glikoproteina
CA 19-9	gastrointestinal cancer antigen, oligosacharyd
CASA	cancer associated serum antigen, mucyna
CR	całkowita remisja kliniczna
cm	centymetr (1/100 metra)
G1,G2,G3	stopnie zróżnicowania histopatologicznego
COX1	antygen towarzyszący rakom pochodzenia nabłonkowego
GOG	Gynaecologic Oncology Group
CRP	całkowita remisja patologiczna
CV	współczynnik zmienności
DI	index DNA
DMSO	dwumetylosulfotlenek
DNA	kwask deoksyrybonukleinowy
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
ESGO	European Society of Gynaecological Oncology
¹⁸F	izotop fosforu
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FC	cytometria przepływowa
FIGO	Międzynarodowa Federacja Ginekologów i Położników
FSH	folitropina
IBM	International Business Machines Corporation
ICS	interval cytoreductive surgery (I operację cytoredukcyjną)
LH	lutropina

Ki67	antygen proliferacji
MRI	magnetyczny rezonans jądrowy
¹³N	izotop azotu
¹⁵O	izotop tlenu
PAC	schemat chemioterapii oparty na pochodnych platyny z adriamycyną i cyklofosfamidem
PC	schemat chemioterapii oparty na pochodnych platyny z cyklofosfamidem
PCNA	antygen proliferacji
PD	progresja choroby
PET	Positron Emission Tomography
pg	pikogram (10 ⁻¹² g)
PR	częściowa remisja choroby
RI	współczynnik oporu naczyniowego
RR	współczynnik ryzyka
SD	stabilizacja choroby
SLO	operacja sprawdzająca typu „second look”
SPF	frakcja procentowa komórek w fazie S
TK	tomografia komputerowa
TP	schemat chemioterapii oparty na paclitaxelu
TPA	tkankowy antygen polipeptydowy
TPS	tkankowy swoisty antygen polipeptydowy
USG	ultrasonografia
WHO	World Health Organisation (Światowa Organizacja Zdrowia)