

# p53 protein, MAPK i topoizomeraza II $\alpha$ u seroznim karcinomima jajnika

---

Šundov, Dinka

Doctoral thesis / Disertacija

2013

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:921465>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-08**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Dinka Šundov**

**p53 PROTEIN, MAPK I TOPOIZOMERAZA II  $\alpha$   
U SEROZNIM KARCINOMIMA JAJNIKA**

Doktorska disertacija

Split, 2013.

Rad je izrađen na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, KBC Split

Voditelj rada:

prof.dr.sc. Snježana Tomić

*Posebnu zahvalnost na stručnoj pomoći pri izradi ove doktorske disertacije dugujem svojoj mentorici prof.dr.sc. **Snježani Tomić**. Hvala na iznimnoj vjeri u mene, pruženoj podršci, razumijevanju i strpljenju da ovaj rad privedem kraju.*

*Na nesebičnoj suradnji i pomoći zahvaljujem kolegici i prijateljici **Branki Petrić Miše**, dr.med., koja mi je, kao morfologu, pomogla da ovo istraživanje dobije kliničku dimenziju.*

*Zahvaljujem **Vesni Čapkun**, dipl.ing., prof.dr.sc. **Davorki Sutlović**, dipl.ing. i profesorici **Sonji Tomić Ferić** na korisnim savjetima i nesebičnoj pomoći u obradi rezultata ovog istraživanja, grafičkom uređenju te jezičnim korekcijama.*

*Zahvaljujem prof.dr.sc. **Šimunu Anđelinoviću** na podršci te svim kolegama i suradnicima Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju koji ovdje nisu pojedinačno spomenuti, a pomogli su na bilo koji način.*

*Veliko hvala mojim roditeljima na trajnoj podršci svih ovih godina.*

***Ovaj rad posvećujem suprugu Željku i našoj djeci, Andrei i Luki. Hvala vam na vašem strpljenju, podršci, neizmjerne vjeri u moj uspjeh, kao i na bezuvjetnoj ljubavi kojom ste me okružili.***

## SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Epidemiologija i etiologija	1
1.2.	Histološka klasifikacija karcinoma pokrovnog epitela jajnika	2
1.3.	Klinička slika	3
1.4.	Dijagnostika karcinoma jajnika	3
1.5.	FIGO klasifikacija karcinoma jajnika	4
1.6.	Liječenje karcinoma jajnika	6
1.6.1.	Kirurško liječenje	6
1.6.2.	Liječenje kemoterapijom	7
1.7.	Dvostruki model nastanka karcinoma jajnika	9
1.8.	Klinički značaj dvostrukog modela nastanka karcinoma jajnika	12
1.9.	Molekularne osobitosti seroznih karcinoma jajnika	13
1.9.1.	p53 tumor supresorski gen	13
1.9.2.	Mitogenom aktivirana protein kinaza (MAPK)	15
1.9.3.	Topoizomeraza II $\alpha$	16
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA	18
2.1.	Ciljevi istraživanja	18
2.2.	Hipoteza	18
3.	ISPITANICE I METODE ISTRAŽIVANJA	19
3.1.	Ispitanice	19
3.2.	Metode	21
3.2.1.	Histološka analiza	21
3.2.2.	Imunohistokemijska analiza	23
3.2.3.	Molekularna analiza	24
3.3.	Statistički postupci	25
4.	REZULTATI	26
4.1.	Obilježja ispitanica	26
4.2.	Patohistološka obilježja tumora	27
4.3.	Imunohistokemijska analiza	29
4.4.	Analize preživljenja	37
4.5.	Odgovor tumora na kemoterapiju	49
5.	RASPRAVA	56
6.	ZAKLJUČCI	70
7.	SAŽETAK	72
8.	SUMMARY	74
9.	LITERATURA	76
10.	ŽIVOTOPIS	91

## POPIS SKRAĆENICA

ARID1	<i>engl.</i> AT-rich interaction domain
BRAF	<i>engl.</i> v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BRCA1	gen karcinoma dojke 1 ( <i>engl.</i> breast cancer gene 1)
BRCA2	gen karcinoma dojke 2 ( <i>engl.</i> breast cancer gene 2)
CA 125	karcinomski antigen 125
CBR	klinički odgovor na liječenje ( <i>engl.</i> clinical benefit rate)
CR	potpuni odgovor na liječenje ( <i>engl.</i> complete response)
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
DSF	slobodni interval bez bolesti ( <i>engl.</i> disease free survival)
EORTC	Europska organizacija za istraživanje i liječenje karcinoma ( <i>engl.</i> European Organization for Research and Treatment of Cancer)
FIGO	Međunarodno udruženje ginekologa i obstetričara ( <i>franc.</i> Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstetrique)
GCIG	<i>engl.</i> Gynecologic Cancer Intergroup
HGSC	serozni karcinomi visokog gradusa ( <i>engl.</i> high grade serous carcinoma)
HZJZ	Hrvatski zavod za javno zdravstvo
ICON	<i>engl.</i> International Collaborative Ovarian Neoplasm
KRAS	<i>engl.</i> V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LGSC	serozni karcinom niskog gradusa ( <i>engl.</i> low grade serous carcinoma)
LSAB	obilježeni streptavidin biotin
MAPK	proteinske kinaze aktivirane mitogenima ( <i>engl.</i> mitogen activated protein kinase)
MPSC	neinvazivni mikropapilarni serozni karcinom ( <i>engl.</i> micropapillary serous carcinoma)
NCI	Nacionalni institut za rak ( <i>engl.</i> National Cancer Institute)
OR	objektivni odgovor na liječenje ( <i>engl.</i> objective response)
OS	ukupno preživljenje ( <i>engl.</i> Overall Survival)
PCR	lančana reakcija polimeraze ( <i>engl.</i> Polymerase Chain Reaction)
PARP	<i>engl.</i> poly (ADP-ribose) polymerase
PFS	preživljenje bez progresije bolesti ( <i>engl.</i> progression free survival)
PR	djelomičan odgovor na liječenje ( <i>engl.</i> Partial Response)
PTH	papilarna tubarna hiperplazija ( <i>engl.</i> papillary tubal hyperplasia)

SD	stabilna boleŝt ( <i>engl.</i> stable disease)
SEER	( <i>engl.</i> Surveillance Epidemiology and End Results)
SOCceR	( <i>engl.</i> Surgery Ovarian Cancer Recurrence)
STIC	serozni tubarni intraepitelni karcinom ( <i>engl.</i> serous tubal intraepithelial carcinoma)
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
TOPO II $\alpha$	topoizomeraza II $\alpha$ ( <i>engl.</i> topoisomerase II alpha)
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta ( <i>engl.</i> vascular endothelial growth factor)

## 1. UVOD

### 1.1. EPIDEMIOLOGIJA I ETIOLOGIJA

Karcinom jajnika na šestom je mjestu po učestalosti malignih novotvorina u žena. U svijetu se dijagnosticira oko 225 500 novooboljelih žena godišnje, od čega prosječno umire 140 200 žena (1).

Prosječna godišnja stopa učestalosti veća je u industrijaliziranim zemljama s niskim natalitetom, s izuzetkom Japana, te značajno varira ovisno o etničkoj pripadnosti. Kreće se od 5/100 000 žena u zemljama u razvoju do iznad 19/100 000 žena u razvijenim zemljama. Učestalost raste proporcionalno s dobi žene, uz najveći broj bolesnica u dobnoj skupini od 60 do 64 godine (2).

Stopa smrtnosti je, unatoč blagom padu, i dalje visoka. U razvijenim zapadnim zemljama karcinom jajnika je na prvom mjestu u ukupnoj smrtnosti od zloćudnih novotvorina spolnog sustava, iako čini samo 4% zloćudnih novotvorina u žena (3).

U Republici Hrvatskoj karcinom jajnika, jajovoda i adneksa na petom je mjestu po učestalosti malignih oboljenja u žena. Prema podacima Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ), u 2011. godini zabilježeno je 449 novootkrivenih slučajeva, najviše njih u dobnoj skupini od 65-69 godina, uz prosječnu stopu učestalosti od 20.2/100.000 (4).

Etiologija karcinoma jajnika je višestruka. Najznačajniji čimbenik rizika za razvoj ove bolesti je obiteljska anamneza karcinoma jajnika ili dojke, iako je genetska predispozicija (najčešće u obliku nasljedne mutacije BRCA 1 ili BRCA 2 gena) prisutna u samo 5-10% karcinoma jajnika (5-7). Uz BRCA mutaciju u pravilu nastaju serozni karcinomi visokog gradusa (2).

Jedna od najčešće citiranih teorija o etiologiji karcinoma jajnika, temeljena na epidemiološkim istraživanjima, je „hipoteza neprekinutih ovulacija“.

Ovulacija traumatizira površinski epitel jajnika čime se stimulira proliferacija i osigurava mikrookoliš za moguću malignu transformaciju. U čimbenike koji smanjuju rizik nastanka karcinoma jajnika ubrajaju se trudnoća, upotreba oralnih kontraceptiva, te kirurški uvjetovani protektivni čimbenici kao što su podvezivanje jajovoda, te obostrano odstranjivanje jajnika i/ili jajovoda. Rana menarha, kasna menopauza, visoki socio-ekonomski status, nuliparitet te hormonsko nadomjesno liječenje povećavaju rizik nastanka ove bolesti. Manje zastupljene hipoteze o nastanku karcinoma jajnika uključuju gonadotropinsku i androgenu hipotezu. Istraživanja o ostalim potencijalnim čimbenicima rizika, kao što su indeks tjelesne mase, prva trudnoća, dojenje, talk, pušenje, prehrana bogata masnoćama, virusne infekcije u djetinjstvu, ionizirajuće zračenje itd, neujednačena su, neuvjerljiva i proturječnih rezultata (3, 8, 9).

## **1.2. HISTOLOŠKA KLASIFIKACIJA KARCINOMA POKROVNOG EPITELA JAJNIKA**

Tumori pokrovnog epitela čine 80% tumora jajnika. Važeća klasifikacija karcinoma pokrovnog epitela jajnika, prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO), temelji se na morfološkoj procjeni staničnog tipa (10).

Na osnovu staničnog tipa, invazivni karcinomi jajnika dijele se na:

- Serozne
- Mucinozne
- Endometrioidne
- Svjetlostanične
- Maligne Brennerove tumore
- Karcinome prijelaznog epitela
- Karcinome pločastih stanica
- Miješane karcinome
- Nediferencirane karcinome (10)

60-80% karcinoma pokrovnog epitela jajnika čine karcinomi seroznog tipa (1, 3).



### 1.3. KLINIČKA SLIKA

Nespecifični klinički simptomi koji se često zanemaruju ili podcjenjuju, razlog su što se u gotovo dvije trećine bolesnica karcinom jajnika otkrije u proširenom stadiju bolesti. Veliki broj bolesnica ima barem jedan od navedenih simptoma: nadutost, punoća ili pritisak u donjem dijelu trbuha ili zdjelice, bol u truhu ili donjim dijelovima leđa, gubitak energije, često mokrenje, pečenje pri mokrenju, zatvor, nedostatak apetita, proljev i mučninu. Međutim, svi ovi simptomi su nespecifični, pojavljuju se i u drugih oboljenja, a katkada i u zdravih žena. Osim spomenutih općih simptoma, mogu se pojaviti i nepravilnosti ciklusa, bolne menstruacije ili krvarenje u postmenopauzi. Kada bolest uznapreduje, pojavljuju se ascites, subileus, ileus, gubitak na težini i kaheksija (2, 11).

Prve presadnice uglavnom nastaju u zdjelici, na serozi rektuma i peritoneumu Douglasovog prostora ili mjehura. Vrlo često je zahvaćen i omentum. Tumorske presadnice mogu se naći na svim lokacijama unutar peritonealne šupljine i po površini jetre. Karcinom jajnika se širi i limfogeno u ingvinalne, zdjelične i paraaortalne limfne čvorove. Može doći i do zahvaćanja pleure te razvoja hidrotoraksa. Hematogenim putem karcinom jajnika se širi uglavnom u jetru i pluća dok su metastaze u kosti i mozak rjeđe (2, 11).

### 1.4. DIJAGNOSTIKA KARCINOMA JAJNIKA

Preživljenje žena oboljelih od karcinoma jajnika usko je vezano uz stupanj proširenosti bolesti u trenutku njenog otkrivanja. Prosječno ukupno petogodišnje preživljenje za razdoblje od 2003. do 2009. godine, prema SEER analizi (*engl.* Surveillance Epidemiology and End Results), iznosi 44.2%, uz znatne razlike ovisno o kliničkom stadiju bolesti (12).

Zbog svog anatomskog položaja jajnici su teško pristupačni fizikalnom pregledu. Neinvazivne radiološke pretrage nisu dostatne za postavljenje dijagnoze te zahtijevaju patohistološku potvrdu.

Iako su istraživanja usmjerena prema pronalaženju dovoljno osjetljivih i specifičnih dijagnostičkih biomarkera, još uvijek nemamo pouzdanu metodu probira za rano otkrivanje bolesti (13-15).

Dostupne metode probira u zdravih i asimptomatskih žena uključuju određivanje vrijednosti tumorskog markera Ca 125 u krvi te pregled transvaginalnim ultrazvukom (14). Iako metoda određivanja tumorskog markera Ca 125 nije dovoljno osjetljiva i specifična, kretanje njegove vrijednosti je od koristi u praćenju rezultata liječenja i ranom otkrivanju povrata ili progresije bolesti.

Detaljna osobna i obiteljska anamneza, kompletan klinički pregled uz radiološke slikovne metode (UZV, Rtg i CT) te razina Ca 125 tumorskog markera predstavljaju prvi korak prema dijagnozi i procjeni proširenosti bolesti. Čimbenici koji mogu pomoći u procjeni moguće malignosti tumora jajnika su: dob bolesnice, zahvaćanje oba jajnika, fiksacija tumorske tvorbe pri kliničkom pregledu, prisutnost slobodne trbušne tekućine (ascites), ultrazvučna slika kompleksne promjene sa solidnim područjima, CT nalaz metastatskih čvorova te povišeni tumorski marker (3).

Unatoč svim ovim parametrima potrebna je patohistološka potvrda bolesti pa je primarni kirurški zahvat („staging“ laparotomija) slijedeći neophodan korak u potvrdi dijagnoze i procjeni proširenosti bolesti (2).

## **1.5. FIGO KLASIFIKACIJA KARCINOMA JAJNIKA**

U liječenju karcinoma jajnika nužan je multidisciplinarni pristup, a modalitet liječenja ovisi o proširenosti bolesti (16).

Klinički stadij bolesti određuje se prema FIGO klasifikaciji (*franc.* Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstetrique) iz 2006. godine (Tablica 1.) iako Ginekološko-onkološko društvo (Gynecology Oncology Committee of FIGO) radi na njenoj reviziji s ciljem uključivanja karcinoma jajnika, jajovoda i primarnog peritonealnog karcinoma u jedinstveni sustav (2).

**Tablica 1.** FIGO klasifikacija karcinoma jajnika

I	Tumor ograničen na jedan ili oba jajnika
IA	Tumor ograničen na jedan jajnik; bez ascitesa; bez tumora na vanjskoj površini; kapsula intaktna
IB	Tumor ograničen na oba jajnika; bez ascitesa; bez tumora na vanjskoj površini; kapsula intaktna
IC	IA ili IB uz tumor na površini jednog ili oba jajnika i/ili ruptura kapsule ili prisutnost malignih stanica u ispirku ili ascitesu
II	Tumor zahvaća jedan ili oba jajnika uz širenje tumora na organe zdjelice
IIA	Tumor se proširio i/ili metastazirao na maternicu i/ili jajovode
IIB	Tumor se proširio na druge organe zdjelice
IIC	IIA ili IIB uz tumor na površini jednog ili oba jajnika ili rupturom kapsule ili prisutnost malignih stanica u ispirku ili ascitesu
III	Tumor zahvaća jedan ili oba jajnika uz širenje tumora izvan male zdjelice (histološki dokazani peritonealni implantati) i/ili pozitivni retroperitonealni ili ingvinalni limfni čvorovi, površinske metastaze na jetri, histološki dokazane metastaze po tankom crijevu ili omentumu.
IIIA	Histološki potvrđene mikroskopske metastaze po površini peritoneuma ili histološki dokazano širenje na tanko crijevo ili mezenterij, negativni limfni čvorovi
IIB	Metastaze po površini peritoneuma manje od 2 cm u promjeru, limfni čvorovi negativni
IIIC	Metastaze po površini peritoneuma veće od 2 cm u promjeru i/ili pozitivni retroperitonealni ili ingvinalni limfni čvorovi
IV	Tumor zahvaća jedan ili oba jajnika uz udaljene metastaze, maligne stanice u pleuralnom izljevu, parenhimalne metastaze u jetri.

Temeljem saznanja da je gradus tumora ključan čimbenik u kliničkom stadiju I bolesti, GCIG grupa (*engl.* Gynecologic Cancer Intergroup), predlaže promjene u klasifikaciji ovog stadija uz dodatak gradusa tumora za svaki podtip (IA-IC).

U slučaju nepotpunog primarnog kirurškog zahvata kojim se definira klinički stadij bolesti, prema EORTC preporukama (*engl.* European Organization for Research and Treatment of Cancer), klinički stadij I klasificirao bi se kao „stadij Ix“ (17).

Također, kako ostatna bolest nakon primarnog citoreduktivnog kirurškog zahvata predstavlja najvažniji nezavisan prediktivni čimbenik preživljenja (7, 18), autori smatraju da bi količina ostatne bolesti trebala biti uključena u standardnu klasifikaciju kliničkog stadija III (17).

## 1.6. LIJEČENJE KARCINOMA JAJNIKA

### 1.6.1. Kirurško liječenje

Liječenje karcinoma jajnika počinje kirurškim zahvatom. Opseg kirurškog liječenja ovisi o stupnju proširenosti bolesti.

Ukoliko je riječ o bolesnicama mlađe životne dobi koje još nisu rađale preporučuje se, u stadiju IA, adneksetomija s biopsijom suprotnog jajnika uz infrakoličnu omentektomiju, zdjeličnu i paraaortalnu limfadenektomiju (minimalno ipsilateralnu), multiple biopsije peritoneuma te eventualno apendektomiju (2, 7, 19). Kod karcinoma jajnika stadija IB radi se histerektomija s adneksetomijom uz sve spomenuto kod stadija IA (2, 7, 19).

Standardni postupak kod bolesnica u stadiju IC i višem je maksimalno kirurško odstranjenje tumorske mase – primarna citoredukcija, koja uključuje histerektomiju s adneksetomijom, potpunu suprakoličnu ometektomiju, zdjeličnu i paraaortalnu limfadenektomiju, apendektomiju, a zatim eksploraciju svih peritonealnih površina i površina parenhimatoznih organa, biopsiju dijafragme uz mutiple slijepe biopsije, biopsije s mjesta priraslica, ukoliko postoje, kao i odstranjenje svake intraabdominalne tumorske mase, ako je moguće u cijelosti (2, 7, 19).

Postotak bolesnica s proširenim stadijem bolesti u kojem je moguća optimalna citoredukcija (cjelokupno odstranjenje makroskopske bolesti iz abdomena), prema različitim istraživanjima varira od 17-87%, što dijelom ovisi o iskustvu i tehničkoj vještini kirurga, a dijelom o čimbenicima kao što su invazija u vitalne organe ili komorbiditet (19, 20).

Uloga sekundarnog citoreduktivnog kirurškog zahvata u bolesnica s povratom bolesti je dvojbena, iako postoje naznake u poboljšanju ukupnog preživljenja kod bolesnica s kompletnom sekundarnom citoredukcijom. Trenutno su u tijeku tri randomizirane kontrolirane studije (DESKTOP III, GOG231 i SOCceR) koje uspoređuju samu kemoterapiju sa kombinacijom kirurškog zahvata i kemoterapije (21).

### 1.6.2. Liječenje kemoterapijom

Rak jajnika u FIGO I stadiju (A i B) gradusa 1 i 2 ne zahtijeva primjenu kemoterapije. Prema rezultatima dvije studije, ICON (*engl.* International Collaborative Ovarian Neoplasm) i EORTC, u ovih bolesnica dostatan je optimalan kirurški zahvat prema internacionalnim smjernicama. Ove bolesnice zahtijevaju kliničko praćenje, uz vjerojatnost petogodišnjeg preživljenja oko 90%. Za tumore u FIGO I stadiju gradusa 3 i tumore u FIGO IC stadiju kemoterapija je neophodna (2, 5, 22).

Dobra citoredukcija omogućava bolju prognozu i stvara povoljne uvjete za liječenje kemoterapijom. Razlog zbog čega neki od tumora dobro reagiraju na kemoterapiju, a neki loše, nije ustanovljen.

Uvođenjem cisplatine u kemoterapijski protokol postižu se značajniji rezultati u liječenju. Uz terapiju cisplatinom u početku se ordinirao najčešće ciklofosamid. Kasnije se cisplatina zamjenjuje svojim derivatom koji ima manju nefrotoksičnost – karboplatinom, a umjesto ciklofosfamida uvodi se paklitaksel koji se pokazao efikasnijim (7).

Karboplatina i paklitaksel, koji se daju tijekom 6 ciklusa, standardna su terapija kod seroznog karcinoma jajnika. Uz ovaj kemoterapijski protokol oko 65% bolesnica imat će dobar odgovor na liječenje, uz preživljenje bez progresije bolesti (PFS, *engl.* progression free survival) od 16 do 21 mjesec te ukupno preživljenje od 32 do 57 mjeseci (7).

Kod bolesnica u stadiju III seroznog karcinoma jajnika, kojima je napravljena optimalna kirurška citoredukcija (ostatni tumor manji od 1 cm), intraperitonealna terapija pokazuje dobre rezultate (23). Nažalost, razina komplikacija je visoka i samo oko polovine bolesnica uspije dovršiti 6 ciklusa terapije pa se ovakav način liječenja još uvijek ne preporučuje kao novi standard liječenja karcinoma jajnika u stadiju III i IV (2, 5). Terapija zračenjem nije učinkovita u uznapredovanom stadiju tumora. Zbog blizine vitalnih abdominalnih organa ne može se primijeniti optimalna terapijska doza.

Kako se u trenutku postavljanja dijagnoze oko 2/3 bolesnica nalazi u uznapredovaloj fazi bolesti (FIGO III i IV), usprkos dobrom odgovoru na liječenje, preživljenje je loše. Većina bolesnica imaće povrat bolesti uz medijan slobodnog intervala bez bolesti od 16 mjeseci (2).

Izbor modaliteta liječenja i kemoterapijskog protokola kod ovih bolesnica temelji se na inicijalnom kemoterapijskom protokolu i odgovoru na liječenje. Te se bolesnice mogu podijeliti u dvije podskupine ovisno o trajanju slobodnog intervala bez bolesti. Bolesnice s povratom bolesti unutar 6 mjeseci od završetka inicijalnog liječenja spadaju u skupinu rezistentnih na terapiju temeljenu na platini, imaju lošiju prognozu i kandidati su za istraživanje kemorezistencije, uz novi pristup u liječenju. Bolesnice sa slobodnim intervalom bez bolesti duljim od 6 mjeseci odnosno godine dana, smatraju se djelomično osjetljivim odnosno osjetljivim na primijenjeni protokol liječenja (2, 7, 16).

Terapija temeljena na platini standardni je pristup za bolesnice s kemosenzitivnim tumorom, uz medijan preživljenja od 18 do 29 mjeseci. Optimalna terapija bolesnica, koje su djelomično osjetljive, nije jasno definirana. U liječenju povrata bolesti primjenjuju se kombinacije karboplatine s vepesidom, topotekanom, doksorubicinom i ciklofosfamidom (2, 7, 16).

Iako je bolje poznavanje patogeneze karcinoma jajnika omogućilo razvoj novih terapijskih strategija (24-28), rezultati liječenja povrata bolesti nakon prvog kirurškog zahvata i prve linije kemoterapije još uvijek su loši. Inhibitori angiogeneze, monoklonska protutijela i hormonalna terapija nisu se pokazali značajnije uspješnim u liječenju raka jajnika.

Velika očekivanja u poboljšanju prognoze karcinoma jajnika vezana su uz neke biološke lijekove kao što su bevacizumab – Avastin (monoklonalno antitijelo protiv VEGF), PARP inhibitor olaparib, u žena koje su nositelji BRCA mutacije (7) te MEK inhibitor - selumetinib, koji se istražuje u liječenju seroznih karcinoma niskog gradusa (29).

## 1.7. DVOSTRUKI MODEL NASTANKA KARCINOMA JAJNIKA

Nedostatak jasno definiranih prekursora bolesti, uz izostanak ili nespecifičnost kliničkih simptoma u ranoj fazi bolesti, razlog je što se više od dvije trećine karcinoma pokrovnog epitela jajnika dijagnosticira u uznapređovalom kliničkom stadiju. Najveća prepreka u detekciji ranog stadija karcinoma jajnika je nepoznavanje i nerazumijevanje njegove histopatogeneze, a naporu u istraživanju desetljećima su bili usmjereni prvenstveno na jajnike (1).

Prema tradicionalnom shvaćanju karcinomi jajnika nastaju iz njegova pokrovnog epitela i epitelnih inkluzijskih cista (specijalizirani oblik mezotela koji dijeli morfološke i imunohistokemijske karakteristike s epitelom peritoneuma), lokalno se šire u susjedne organe zdjelice i trbušnu šupljinu te konačno daju udaljene metastaze. Ovaj se epitel može diferencirati u različitim pravcima (Mullerova neometaplazija) što rezultira različitim histološkim tipovima karcinoma jajnika (30, 31).

Danas se smatra da serozni karcinomi jajnika nastaju kao rezultat klonalne proliferacije sekretornih stanica iz distalnog fimbrijalnog kraja jajovoda i zahvaćaju jajnik sekundarno (32-39). Kao prekursorske lezije seroznih karcinoma opisuju se „p53 potpis“ (*engl.* „p53 signature“), serozni tubarni intraepitelni karcinom (STIC, *engl.* serous tubal intraepithelial carcinoma) i papilarna tubarna hiperplazija (PTH) (1, 30, 40).

Morfološka, imunohistokemijska i molekularna istraživanja na seroznim tumorima dala su osnovu za prijedlog dualističkog modela karcinogeneze koji karcinome pokrovnog epitela jajnika grupira u dvije glavne kategorije: tip I i tip II. Pojam tip I i tip II tumora, odnosi se isključivo na različiti put nastanka ovih dviju grupa tumora. Serozni karcinomi niskog i visokog gradusa predstavljaju prototip predloženog modela (41).

Karcinomi jajnika tradicionalno su se gradirali prema trostupanjskoj shemi, kao dobro, umjereno i slabo diferencirani, sugerirajući da se radi o homogenoj bolesti sa gledišta patogeneze. Korišteni su različiti sustavi stupnjevanja, uključujući FIGO, WHO, GOG te Silverberg-Shimitzu modifikacija (42).

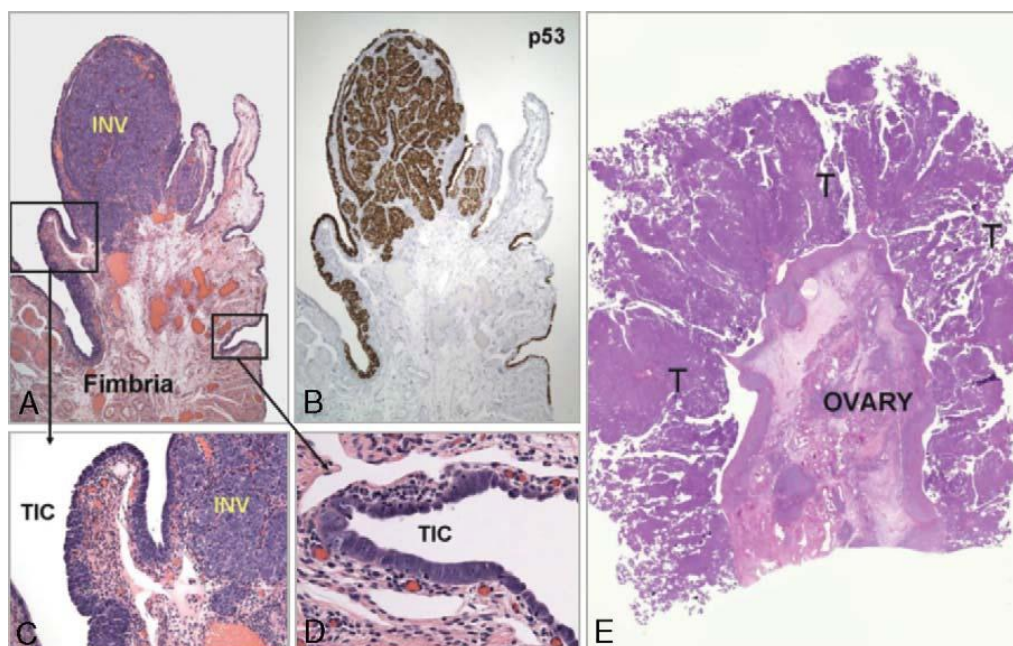
Malpica i suradnici 2004. godine predlažu novi binarni model stupnjevanja prema kojem se serozni karcinomi jajnika dijele na one niskog – LGSC (*engl.* Low Grade Serous Carcinoma) i visokog gradusa – HGSC (*engl.* High Grade Serous Carcinoma), model koji je temeljen prvenstveno na morfološkom stupnju atipije jezgara i broju mitozna na 10VPVP (43). Ovakav model uvažava predložene molekularne razlike među seroznim karcinomima, a pokazao se lako primjenjivim i reproducibilnim (44).

Prema predloženom modelu, serozni karcinomi visokog gradusa (~85% seroznih karcinoma), slijede put karcinogeneze tumora tipa II, predstavljaju klinički vrlo agresivne neoplazme koje nastaju iz seroznih intraepitelnih karcinoma fimbrija jajovoda (STIC), a dijagnosticiraju se u uznapredovalom stadiju bolesti. Mutacija p53 gena rani je događaj u patogenezi ovih tumora, a prisutna je u gotovo 95% slučajeva (30).

Nekoliko činjenica govori u prilog tubarnog porijekla seroznog karcinoma visokog gradusa:

- definitivni prekursori HGSC nisu dokazani sa sigurnošću niti u jajniku niti u peritoneumu
- nalaz STIC-a u odsutnosti karcinoma jajnika, u žena sa i bez BRCA1 mutacije (Slika 1)
- STIC je udružen isključivo s HGSC
- dužina telomera je različita u STIC-u i HGSC jajnika/peritoneuma
- molekularne studije su pokazale da je u bolesnica sa STIC-om i seroznim karcinom visokog gradusa prisutna identična p53 mutacija
- genetsko profiliranje dodatno je prikazalo da je genski izražaj seroznih karcinoma visokog gradusa sličan STIC-u te sličniji epitelu jajovoda nego površinskom epitelu jajnika, a imunohistokemijske studije su pokazale da serozni karcinomi visokog gradusa izražavaju PAX8, HMFG2 i Stathmin 2 (biljege karakteristične za sekretorne stanice jajovoda), a ne kalretinin (mezotelni biljeg) (1, 30).





**Slika 1.** Koegzistencija karcinoma fimbrija jajovoda (A-D) i karcinoma jajnika (E). A, C, D - mikroskopsko žarište intraepitelnog karcinoma (TIC) i invazivnog karcinoma (INV) fimbrija jajovoda. B - pozitivan p53 imunohistokemijski izražaj. E - velika tumorska masa na površini jajnika (preuzeto iz Kindelberger et al. Am J Surg Pathol 2007;31:161-9).

S obzirom na rezultate ovih istraživanja, značajan broj karcinoma klasificiranih kao primarni karcinom jajnika predstavlja sekundarnu bolest, te neki autori smatraju da bi bilo prikladnije napustiti termin „serozni karcinom jajnika“ i umjesto toga nazvati te karcinome „seroznim karcinomima zdjelice“ (2, 45).

Serozni karcinomi niskog gradusa slijede put karcinogeneze tip I, oponašajući adenom-karcinom slijed kolorektalnog karcinoma, uz histološki prepoznatljive prekursorske lezije (adenom – borderline tumor – mikropapilarni borderline tumor – mikropapilarni borderline tumor s mikroinvazijom - serozni karcinom niskog gradusa). Morfološki, u seroznim karcinomima niskog gradusa uz invazivnu komponentu tumora, često je prisutna i benigna i borderline komponenta (44).

Prema najnovijim kliničko-patološkim i imunohistokemijskim studijama, pretpostavlja se da su i serozni karcinomi niskog gradusa također porijekla epitela jajovoda. Papilarna tubarna hiperplazija (PTH) smatra se mogućom prekursorskom lezijom, a odgovara hiperplastičnom epitelu jajovoda koji oblikuje male intraluminalne pupoljke (mikropapile) građene od sekretornih i cilijarnih stanica koji se otkidaju od površine sluznice, plutaju u lumenu jajovoda i implantiraju na površinu jajnika ili peritoneuma. Smatra se da je mehanizam kojim se epitel jajovoda implantira na jajnik povezan s ovulacijom, a stanice koje se implantiraju odgovaraju matičnim stanicama koje se mogu diferencirati u cilindrične stanice s trepetljikama ili sekretorne stanice (30, 40).

Prilikom ovulacije, epitel jajovoda direktno je izložen stromi jajnika i njegovom mikrookolišu - citokinima, slobodnim radikalima i čimbenicima rasta, koji potiču tumorsku progresiju od kortikalne inkluzijske ciste preko seroznog cistadenoma, borderline tumora uobičajenog tipa, mikropapilarnog borderline tumora do invazivnog seroznog karcinoma niskog gradusa. Fenotipske promjene praćene su i molekularnim promjenama, prvenstveno mutacijom KRAS ili BRAF gena koje su specifične za ovu grupu tumora (30, 40).

## **1.8. KLINIČKI ZNAČAJ DVOSTRUKOG MODELA NASTANKA KARCINOMA JAJNIKA**

Koncept prema kojem su serozni karcinomi zapravo porijekla jajovoda ima vrlo važan klinički značaj. Stanice seroznog tubarnog intraepitelnog karcinoma (STIC) mogu se implantirati ne samo na jajnik nego i na peritoneum, što može biti razlog zbog kojeg se serozni karcinomi uglavnom prezentiraju kao proširena bolest. Ova činjenica može objasniti i zašto trenutno dostupne metode rane detekcije, kao što su određivanje serumske razine Ca 125 i UZV, nisu doprinijele otkrivanju ovog tipa tumora u ranom stadiju bolesti, niti smanjile smrtnost (30).

Kako su probir i rana detekcija seroznih karcinoma neuspješni, buduće metode prevencije trebale bi biti usmjerene na jajovod.

Pošteda jajovoda prilikom histerektomije radi benignih stanja nema poznati fiziološki značaj. Ukoliko se jajovod prihvati kao mjesto porijekla većine seroznih karcinoma, tada bi prevencija u smislu odstranjenja jajovoda mogla značajno smanjiti rizik razvoja karcinoma (1, 40).

Žene koje su nositelji BRCA mutacije danas se profilaktički podvrgavaju obostranom odstranjenju jajnika i jajovoda, sa ili bez odstranjenja maternice. S obzirom na predloženu hipotezu, otvara se mogućnost da odstanjenjem jajovoda uz poštedu jajnika smanjimo rizik nastanka karcinoma, a sačuvamo fertilitet i hormonalnu funkciju kod žena u premenopauzi. Također, odstranjenjem jajovoda umjesto podvezivanjem, s ciljem trajne kontracepcije, učinkovito bi se smanjio rizik nastanka ovog tipa karcinoma (30).

U Kanadi je 2010. godine potaknuta javna kampanja od strane ginekoloških onkologa, u sklopu Programa istraživanja karcinoma jajnika, u smislu promjene kirurške prakse s ciljem smanjenja učestalosti karcinoma jajnika. Buduća klinička istraživanja ovakvog tipa potrebna su radi procjene učinkovitosti ovih mjera na smanjenje incidencija karcinoma jajnika (40).

## **1.9. MOLEKULARNE OSOBITOSTI SEROZNIH KARCINOMA JAJNIKA**

Najznačajniju razliku na molekularnoj razini između seroznih karcinoma tip I i tip II predstavljaju mutacije p53 tumor supresorskog gena i BRAF/KRAS onkogen (46, 47).

### **1.9.1. p53 TUMOR SUPRESORSKI GEN**

Gen p53 smješten je na kratkom kraku kromosoma 17, na lokusu 17p13.1 te šifrira 393 aminokiselinski nuklearni p53 fosfoprotein (48). Ima ulogu multifunkcionalnog transkripcijskog čimbenika uključenog u regulaciju kontrole staničnog ciklusa, programirane stanične smrti i očuvanje integriteta DNA (49).

Kao odgovor na oštećenje DNA, posttranslacijskom modifikacijom regulira se stabilnost i transkripcijska aktivnost p53 proteina (50). Akumulirani p53 protein reverzibilno zaustavlja stanični ciklus na razini G1/S ili G2/M kontrolne točke, čime stanica «kupuje» vrijeme potrebno za popravak oštećene DNA (51). Gubitak ili inaktivacija p53 tumor supresorskog gena povećava nestabilnost genoma i osjetljivost stanice na malignu transformaciju.

Imunohistokemijska analiza je brza, efikasna i praktična metoda za kliničku uporabu i analizu velikog broja uzoraka. Metode molekularne dijagnostike mogu pobliže odrediti tip mutacije, ali su mnogo složenije, skuplje i duže traju te ih je teže primijeniti u svakodnevnoj rutinskoj praksi. Stoga se imunohistokemijska analiza često koristi kao surogat za molekularnu analizu.

Inaktivacija p53 gena najčešće nastaje kao posljedica missense mutacije u području egzona 4-9 i vezana je uz posttranslacijsku stabilizaciju i duži poluživot nefunkcionalnog p53 proteina, što omogućuje njegovu imunohistokemijsku detekciju (32, 52-56). Za razliku od mutiranog, nepromijenjeni p53 protein relativno je nestabilna molekula, s kratkim poluvremenom raspada, što je čini nedetektibilnom pri imunohistokemijskoj obradi (56).

Studija koja je usporedila primjenu metode imunohistokemije sa metodama molekularne dijagnostike, razlike u rezultatima pripisuje mutacijama izvan egzona 5-9 (~11% mutacija), koje dovode do stvaranja razgranatog p53 proteina, a koji se ne može otkriti primjenom imunohistokemijske metode (57). Tumori sa ovim tipom mutacije p53 gena pokazuju tendenciju ranijeg recidiva nakon ordinirane kemoterapije i značajno kraće preživljenje u FIGO stadiju III/IV (58, 59).

Funkcionalna mutacija p53 tumor supresorskog gena prisutna je u više od 75% karcinoma visokog gradusa (3, 47, 60). Učestalost ove mutacije znatno je niža u seroznim karcinomima niskog gradusa, a može se naći u oko 8% ovih tumora (61).

Prognostička vrijednost visoke ispoljenosti p53 proteina u karcinomima jajnika, unatoč brojnim studijama, ostaje dvojbeno. Iako su neke studije u univarijantnoj (62, 63) odnosno multivarijantnoj (49, 52, 53, 58, 64) analizi prikazale značajnu korelaciju između mutacije p53 gena i/ili prekomjerne imunohistokemijske ispoljenosti p53 proteina i preživljenja, postoje studije koje takve rezultate nisu mogle potvrditi (57, 65-68).

U većini studija, prekomjerna je ispoljenost p53 proteina vezana uz viši gradus i klinički stadij tumora (69, 70). Lassus i suradnici prikazali su trend kraćeg preživljenja bolesnica s p53 pozitivnim tumorima i u ranom stadiju bolesti, a njegova prekomjerna ispoljenost pokazala se deset puta jačim pokazateljem lošeg kliničkog ishoda od gradusa tumora (54).

### **1.9.2. MITOGENOM - AKTIVIRANA PROTEIN KINAZA (MAPK)**

RAS/RAF/MEK/MAPK signalni put, prototip MAP kinaznog puta aktiviranog mitogenim čimbenicima, ima važnu ulogu u regulaciji staničnog rasta, proliferacije, diferencijacije, apoptoze, angiogeneze i migracije (71). Predstavlja multifunkcionalnu serin / treonin kinazu koja se aktivira kao odgovor na različite izvanstanične podražaje te posreduje prijenosu signala sa stanične površine u jezgru, aktivirajući različite citoplazmatske i nuklearne proteine (72).

Mutacija ili prekomjerni izražaj komponenti ovog signalnog puta, uključujući KRAS i BRAF, aktivira MAPK kaskadu pridonoseći zloćudnoj transformaciji stanice. Aktivacija ove kaskade može se naći u širokom spektru karcinoma uključujući karcinome gušterače, debelog crijeva, pluća, dojke i prostate (73).

Somatska mutacija KRAS ili BRAF gena prisutna je u 65-88% seroznih karcinoma niskog gradusa. Mutacija nastaje u ranoj fazi razvoja tumora i vezana je uz aktivaciju mitogenom-aktivirane protein kinazne (MAPK) kaskade odnosno RAS/RAF/MEK/MAPK(ERK) signalnog puta (74).

Unatoč in vitro studijama o MAPK signalnom putu (75, 76), malo se zna o MAPK ispoljenosti u tkivnim uzorcima karcinoma jajnika te o mogućem utjecaju aktivirane MAPK na tumorsku progresiju ili ishod bolesti. Ispoljenost aktivne MAPK korelira sa KRAS i BRAF mutacijom, ali može biti prisutna i u tumorima niskog gradusa i u karcinomima visokog gradusa bez mutacije KRAS i BRAF gena, sugerirajući da aktivacija nije vezana isključivo uz RAS/RAF/MEK/MAPK signalni put (77).

U istraživanju Givant-Horwitza i suradnika, ispoljenost MAPK u stanicama seroznog karcinoma jajnika u izljevu, vezana je uz pokazatelje povoljnijeg kliničkog ishoda te značajno korelira sa preživljenjem (78).

### **1.9.3. TOPOIZOMERAZA II $\alpha$**

Topoizomeraza II $\alpha$  je nuklearni enzim koji katalizira promjene u sekundarnoj i tercijalnoj strukturi DNA; neophodna je za replikaciju, rekombinaciju i transkripciju DNA te za kondenzaciju i razdvajanje kromosoma u mitozu (79, 80).

Aktivnost topo II gena, smještenog na lokusu q21 kromosoma 17 (81), pod kontrolom je p53 tumor supresorskog gena, koji blokira vezivanje transkripcijskog faktora NF-Y (nuklearni faktor-Y) za topo II $\alpha$  promotor (82). Mutacija p53 gena dovodi do nekontrolirane i neadekvatne ekspresije topoII $\alpha$  enzima što ima za posljedicu povećanu proliferativnu aktivnost tumora (83).

Ispoljenost topoII $\alpha$  proteina niža je u benignim i borderline tumorima nego u invazivnim karcinomima jajnika. Viša razina ispoljenosti opaža se u biološki agresivnim i brzo proliferirajućim tumorima (80, 84), a može se naći u 30-70% karcinoma jajnika (81).

Prema većini studija ispoljenost topoII $\alpha$  proteina korelira sa stadijem i gradusom tumora (85, 86). Međutim, prema Brustmann-u (87), prekomjerna ispoljenost topoII $\alpha$  proteina odgovara agresivnom fenotipu seroznog karcinoma jajnika bez obzira na stadij bolesti.

Novija istraživanja upućuju na potencijalnu važnost topoizomeraze II $\alpha$  ( topo II $\alpha$  ) u nastanku tumora. Visoka ispoljenost topoII $\alpha$  proteina pokazala se kao nezavisan prognostički čimbenik lošeg kliničkog ishoda kod karcinoma dojke i pločastih lezija cerviksa (85) te karcinoma pluća ne-malih stanica (88). Prema studiji Brustmann-a, prekomjerna ispoljenost topoII $\alpha$  proteina odraz je ne samo povećane proliferativne aktivnosti tumora nego i kvalitativne promjene uzrokovane malignom transformacijom (79).

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA

### 2.1. Ciljevi

Cilj ovog istraživanja je, primjenom metode imunohistokemije, na uzorcima seroznih karcinoma jajnika utvrditi:

- postoji li razlika u imunohistokemijskoj ispoljenosti p53 proteina, aktivirane APK i topoII $\alpha$  u morfološki različitim tipovima seroznog karcinoma jajnika
- utvrditi povezanost ispoljenosti p53 proteina, aktivirane MAPK i topoII $\alpha$  sa kliničko-patološkim prognostičkim pokazateljima u seroznim karcinomima jajnika
- utvrditi povezanost ispoljenost p53 proteina, aktivirane MAPK, topoII $\alpha$  i kliničko-patoloških prognostičkih pokazatelja sa dužinom slobodnog intervala bez bolesti, ukupnim preživljenjem i odgovorom na kemoterapiju u seroznim karcinomima jajnika
- utvrditi potencijalnu prognostičku i prediktivnu vrijednost analiziranih pokazatelja

### 2.2. Hipoteza

Serozni karcinomi jajnika heterogena su skupina koja će se na osnovu morfoloških i imunohistokemijskih karakteristika moći razdvojiti u dvije kategorije (tip I i tip II).

- Očekujemo da će tumori tipa I biti niskog gradusa, imunohistokemijski karakterizirani povećanom razinom aktivirane MAPK, niskom razinom topoizomeraze II alfa, a bolesnice s ovim tipom tumora imat će duži slobodni interval bez bolesti i duže ukupno preživljenje.
- Očekujemo da će tumori tipa II biti visokog gradusa, imunohistokemijski karakterizirani povećanom razinom p53 proteina i topoizomeraze II alfa, a bolesnice s ovim tipom tumora imat će kraći slobodni interval bez bolesti i kraće ukupno preživljenje.



### 3. ISPITANICE I METODE ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je provedeno na Kliničkom zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split.

#### 3.1. Ispitanice

Analiziran je operativni materijal (arhivirani parafinski blokovi tumorskog tkiva) 81 seroznog karcinoma jajnika, bolesnica operiranih na Klinici za ženske bolesti i porode KBC Split, u razdoblju od 01.01.1995. – 31.12.2005.godine.

U istraživanje su uključene bolesnice, čiji su uzorci tumorskog tkiva uzeti pri prvom operativnom zahvatu, prije inicijalne kemoterapije. Bolesnice sa seroznim karcinomom čije parafinske kocke tumora više nisu bile dostupne kao i one koje nakon operativnog zahvata nisu imale adekvatno dokumentirano praćenje ili su liječenje nastavile u nekoj drugoj ustanovi, isključene su iz ovog istraživanja.

Uvidom u medicinsku dokumentaciju (povijesti bolesti bolesnica liječenih u Centru za tumore KBC Split i povijesti bolesti bolesnica operiranih u Klinici za ženske bolesti i porode KBC Split) dobiveni su klinički podaci, podaci o primijenjenom kirurškom i onkološkom liječenju, odgovoru na primijenjeno liječenje, tijeku bolesti te kliničkom ishodu bolesti.

Klinički stadij tumora određen je prema FIGO klasifikaciji (2).

Analiza preživljenja napravljena je na temelju dostupnih podataka praćenja bolesnica. Dužinom ukupnog preživljenja (OS, *engl.* Overall Survival) smatrao se vremenski interval između datuma operacije i smrti bolesnice od karcinoma jajnika odnosno datuma posljednje kontrole na Klinici za onkologiju, zaključno sa 01.10.2010.godine.

Slobodnim intervalom bez bolesti (DSF, *engl.* Disease Free Survival), za bolesnice koje nakon kirurškog liječenja nisu imale ostatnu bolest, smatran je vremenski interval između datuma operacije i datuma dijagnoze povrata bolesti.

Podaci o preživljenju dobiveni su iz povijesti bolesti bolesnica, uvidom u smrtne listiće i direktnim kontaktom s liječnicima bolesnica. Bolesnice su praćene prosječno 41.5 mjesec (u rasponu od 2 do 162 mjeseca).

Odgovor na primijenjeno onkološko liječenje (prvu liniju kemoterapije) definiran je, prema RECIST preporukama (*engl.* Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) (89), kao:

- potpuni odgovor - odsustvo svih kliničkih i radioloških pokazatelja bolesti
- djelomičan odgovor - 30%-tno ili veće smanjenje tumora
- stabilna bolest - stanje bez promjene od početka liječenja; smanjenje volumena tumora za manje od 30%; povećanje tumora za manje od 20%
- progresivna bolest - povećanje volumena tumora za više od 20% ili pojava nove lezije

Periodom trajanja potpunog odgovora na kemoterapiju (CR, *engl.* Complete Response), smatran je interval između datuma zadnjeg ciklusa kemoterapije koji je doveo do potpunog odgovora i datuma povrata bolesti.

Periodom praćenja do progresije bolesti (PFS), kod bolesnica koje su imale djelomičan odgovor na liječenje (PR, *engl.* Partial Response) ili stabilnu bolest (SD, *engl.* Stable disease), smatrao se vremenski interval od datuma zadnjeg ciklusa kemoterapije do datuma progresije bolesti.

Periodom trajanja objektivnog odgovora na onkološko liječenje (OR, *engl.* Objective Response) smatrao se vremenski interval od datuma kada je postignut kompletan (CR) ili djelomičan odgovor (PR) na liječenje do datuma recidiva ili progresije bolesti.

Kliničkim odgovorom na liječenje (CBR, *engl.* Clinical Benefit Rate) definiran je postotak žena koje su imale odgovor na liječenje prema RECIST kriterijima u smislu potpunog (CR), djelomičnog odgovora (PR) ili stabilne bolesti (SD).

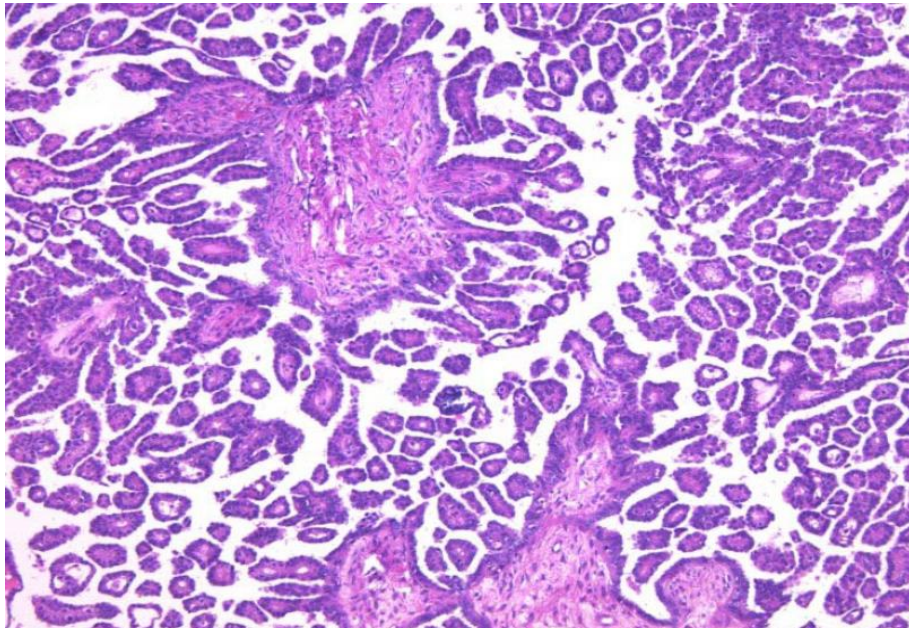
U analizi osjetljivosti ili rezistencije na primjenjeno citostatsko liječenje bolesnice su grupirane ovisno o vremenskom periodu povrata ili progresije bolesti. Bolesnice koje su imale povrat bolesti unutar 6 mjeseci smatrane su kemorezistentnim. Unutar te skupine izdvojili smo bolesnice sa stabilnom bolesti ili progresijom bolesti tijekom prve linije terapije odnosno povratom bolesti unutar mjesec dana od završetka kemoterapije, koje su smatrane kemorefraktnim. U skupini kemosenzitivnih bile su bolesnice s povratom bolesti nakon 6 mjeseci od inicijalnog liječenja.

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. Histološka analiza**

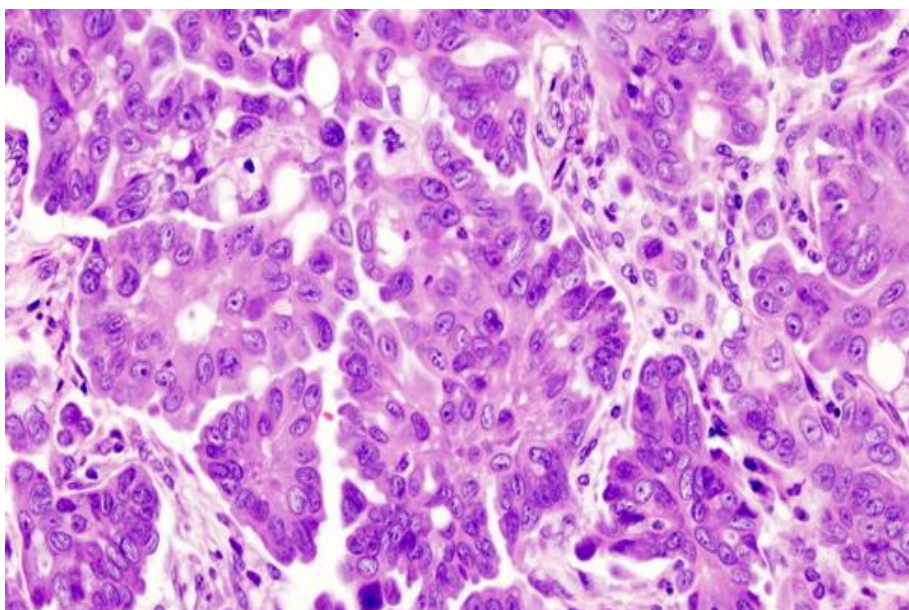
Morfološkom analizom arhiviranih patohistoloških stakala (bojanih standardnom metodom hemalaun eozin), slijedeći predložene kriterije Baltimorskih autora (43, 90), uzorci su podijeljeni u dvije morfološke grupe:

1. grupa karcinoma niskog gradusa odgovarala je invazivnom seroznom karcinomu niskog gradusa najvećim dijelom karakteriziranim mikropapilarnom i kribriformnom slikom sa malim solidnim gnijezdima i tračcima relativno uniformne populacije stanica malih, okruglih jezgara (stupanj atipije jezgara definiran kao gradus 1). Uz nisku mitotsku aktivnost ( $\leq 12$ ) i često prisutna psamomska tjelešca, u ovoj grupi nisu nađena područja nekroze (Slika 2).



**Slika 2.** Serozni karcinom niskog gradusa (H&E, 200x)

2. grupa karcinoma visokog gradusa odgovarala je klasičnoj slici invazivnog seroznog karcinoma sa kompleksnim papilarnim i solidnim uzorkom i izrazitom citološkom atipijom (tumorske stanice velikih pleomorfnih, često multinuklearnih jezgara – atipija jezgara definirana kao gradus 2 i 3). Uz obilnu nekrozu, u ovoj grupi je prisutna visoka razina mitotske aktivnosti (>12 na 10 VPVP) uz česte abnormalne mitotske figure (Slika 3).



**Slika 3.** Serozni karcinom visokog gradusa (H&E, 400x)

Mitotska aktivnost definirana je kao broj mitozna na deset vidnih polja velikog povećanja (x 400), u najaktivnijim područjima tumora.

Vaskularnom invazijom smatralo se prisutstvo tumorskih stanica u endotelom omeđenim prostorima.

### **3.2.2. Imunohistokemijska analiza**

Nakon morfološke analize, reprezentativni rezovi tumorskog tkiva dodatno su bojani primjenom imunohistokemijske LSAB metode, prema standardnom protokolu, u Laboratoriju za imunohistokemiju Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KB Split.

Uzorci tumora za analizu dobiveni su 3-5 $\mu$  rezovima arhiviranih parafinskih blokova te bojani imunohistokemijski, primjenom mišjih monoklonalnih protutijela za p53 protein (DAKO, Glostrup, Denmark, M7001) u razrijeđenju 1:50, zečjeg purificiranog poliklonalnog protutijela za aktivnu MAPK - pTEpY (Promega, Madison, WI, V8031) u razrijeđenju 1:500 i mišjeg monoklonalnog protutijela za topoizomerazu II $\alpha$  (DAKO, Glostrup, Denmark, 7816 ) u razrijeđenju 1:75.

Histološki rezovi su, nakon deparafiniranja i rehidracije, obrađeni zagrijavanjem u mikrovalnoj peći (750 W, 110° C) u citratnom puferu. Ohlađeni su rezovi isprani u destiliranoj vodi i PBS puferu, inkubirani sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> radi blokiranja endogene peroksidaze te inkubirani sa primarnim protutijelima u vlažnoj tamnoj komori. Potom su isprani PBS-om i inkubirani u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi s veznim protutijelom. Slijedi ispiranje s PBS-om i inkubacija sa streptavidinom. Nakon ispiranja u PBS-u preparati su inkubirani sa kromogen diaminobenzidinom (DAKO) u vlažnoj komori, te kontrastno obojani hematoksilinom, dehidrirani u gradijentu alkohola, izbistreni u ksilolu te prekriveni kanada balzomom i pokrovnim stakalcima.

Imunoreaktivnost na p53 procijenjena je nalazom smeđe granularne ili difuzne obojanosti jezgara tumorskih stanica. Pozitivnim rezultatom (prekomjernom ispoljenošću) p53 proteina smatrana je obojanost više od 10 % jezgara (52, 58, 62-64).

Ispoljenost aktivnog (fosforiliranog) oblika MAPK procijenjena je primjenom zečjih poliklonalnih protutijela, pTEpY, koja specifično reagiraju sa fosforiliranim oblikom MAPK. Uzorci u kojima je više od 5% stanica pokazalo imunoreaktivnost (smeđi kromogen u jezgri i/ili citoplazmi) smatrani su pozitivnim (77).

Topoizomeraza II $\alpha$  proliferativni indeks definiran je kao postotak topoII $\alpha$  pozitivnih jezgara (smeđa granularna ili difuzna obojanosti jezgre) brojen na 1000 malignih stanica, u područjima najveće proliferativne aktivnosti tumora. Pozitivnim rezultatom smatrana je obojanost više od 10% jezgara tumorskih stanica (81).

Kod svih imunohistokemijskih bojanja urađena je pozitivna i negativna kontrola.

### **3.2.3. Molekularna analiza**

U Laboratoriju za kliničku i sudsku genetiku Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju KBC-a Split provedena je molekularno-genetička analiza tumorskog tkiva. DNA iz 73 adekvatna parafinska reza izolirana je pomoću kita za izolaciju High Pure PCR Template (Roche Applied Science, Njemačka), prema uputama proizvođača. Za mjerenje koncentracije izolirane DNA koristio se aparat fluorimetar Qubit®Fluorometer (Invitrogene,SAD) i Qubit test -Quant-iT™A dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen,SAD). Kvaliteta izolirane genomske DNA provjerena je na 1.5%-tnom agaroznom gelu.

Za analizu mutacija u genima koristila se lančana reakcija polimeraze (*PCR*, engl.*polymerase chain reaction*), na instrumentu za umnažanje DNA (GeneAmp®PCR System 9700 (Applied Biosystems, SAD), a koji omogućuje eksponencijalno umnažanje ciljanog dijela DNA u in vitro uvjetima.

Uzorci dobiveni umnažanjem provjereni su na horizontalnoj elektroforezi u 2%-tnom agaroznom gelu pripremljenom u puferu 1XTBE uz prisustvo DNA standarda 50 bp DNA Ladder (Invitrogen,SAD).

Za detekciju mutacije u genu *BRAF* korištena je restrikcijska endonukleaza TspRI (FastDigest TspR, Fermentas). Za detekciju mutacija gena *KRAS* korišteni su LightMix<sup>®</sup> Kit *k-ras Mutations Codons 12/13* (TIB MolBiol, Njemačka) i kit LightCycler<sup>®</sup> FastStart DNA Master HybProbe (Roche, Njemačka), prema uputama proizvođača.

### 3.3. Statistički postupci

U analizi podataka korišteni su  $\chi^2$  test, Mann-Whitney U test, log-rank test i Kaplan-Meierove krivulje preživljenja te Cox-ova uninominalna i multinominalna analiza.

Zaključivanje o statističkim hipotezama u ovom radu provedeno je uz razinu značajnosti  $P \leq 0.05$  kod svih primjenjenih testova.

Pri statističkoj obradi podataka koristio se program SPSS verzija 10.0 for Windows.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Obilježja ispitanica

U ispitivanje su uključene žene oboljele od seroznog karcinoma jajnika, operirane na Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Split, u vremenskom razdoblju od 1995. – 2005.g. Samo deset bolesnica (12.3%) dijagnosticirano je u ranom kliničkom stadiju bolesti. 61 bolesnica (75.3%) umrla je od osnovne bolesti (karcinom jajnika).

U Tablici 2. prikazane su ispitanice prema kvalitativnim varijablama i medijanu (minimum-maksimum) kvantitativnih varijabli, ukupno i u odnosu na ishod bolesti.

**Tablica 2.** Prikaz broja (%) žena oboljelih od seroznog karcinoma jajnika prema kvalitativnim varijablama i medijana (min-max) kvantitativne varijable, ukupno i u odnosu na ishod bolesti

VARIJABLE		ŽIVE n=21 (26%)	UMRLE n=60 (74%)	UKUPNO n=81
Dob (godine)		55 (40-71)	61,0 (37-89)	60,0 (37-89)
Klinički stadij:	I-II	10(47,6)	0(0)	10 (12,3)
	III-IV	11 (52,4)	60 (100)	71 (87,7)
Gradus tumora	niski	5(45.5)	6(54.5)	11(12.3)
	visoki	15(21.4)	55(78.6)	70(86.4)
Vaskularna invazija	da	7(33.3)	44(73.3)	51(63.0)
	ne	14(66.7)	16(26.7)	30(37.0)
	nema	13(61.9)	6(10.3)	19(24.1)
Ostatni tumor	≤ 2cm	5(23.8)	10(17.2)	15(19.0)
	> 2cm	3(14.3)	42(72.4)	45(57.0)
p53	pozitivan	12(57,1)	47(78,3)	59 (72,8)
	negativan	9(42,9)	13(21,7)	22(27,2)
MAPK	pozitivan	9(42,9)	10(16,7)	19(23,5)
	negativan	12(57,1)	50(83,3)	62(76,5)
Topoizomeraza 2-alfa	pozitivan	15(75)	46(75)	61(75,3)
	negativan	5(25)	15(25)	20(24,7)



## 4.2. Patohistološka obilježja tumora

Prema prethodno definiranim patohistološkim kriterijima, 13.6% (11/81) uzoraka seroznih karcinoma zadovoljavalo je morfološke kriterije za karcinom niskog gradusa (prototip tip I tumora) dok je 86.4% (70/81) uzoraka odgovaralo karcinomu visokog gradusa (prototip tipa II tumora).

U Tablici 3. prikazane su kvalitativne i kvantitativne varijable u odnosu na gradus tumora.

**Tablica 3.** Prikaz broja (%) kvalitativnih varijabli i medijana (min-max) kvantitativnih varijabli u odnosu na gradus tumora

VARIJABLE		Serozni karcinom niskog gradusa n=11 (13.6%)	Serozni karcinom visokog gradusa n=70 (86.4%)	<i>P</i>
Dob (godine)		52 (44-71)	63.5 (37-89)	0.028*
Klinički stadij	I-II	4 (36.4)	6 (8.6)	0.026 <sup>†</sup>
	III-IV	7 (63.6)	64 (91.5)	
Ostatni tumor	nema	7 (63.6)	12 (17.1)	0.019 <sup>†</sup>
	≤ 2 cm	1 (9.1)	14 (20.2)	
	≥ 2 cm	3 (27.3)	44 (62.9)	
Mitoze (broj/10VPVP)		9 (1-12)	27 (13-65)	< 0.001*
Vaskularna invazija	ne	10 (90.9)	20 (28.6)	< 0.001 <sup>†</sup>
	da	1 (9.1)	50 (71.4)	

\*Mann-Whitney U test

<sup>†</sup> $\chi^2$  test

Raspon dobi bolesnica u grupi karcinoma niskog gradusa bio je od 44 do 71 godine (medijan, 52), dok je raspon u grupi bolesnica s karcinomom visokog gradusa bio od 37 do 89 godina (medijan, 63.5). Prisutna je statistički značajna povezanost gradusa tumora s dobi bolesnica ( $Z=2.2$ ;  $P=0.028$ ).

7/11 (63.6%) bolesnica u grupi niskog gradusa i 64/70 (91.5%) bolesnica u grupi visokog gradusa imale su proširenu bolest (FIGO stadij III/IV). Bolest je otkrivena u ranoj fazi (FIGO stadij I/II) u 35.4% bolesnica iz grupe niskog gradusa te samo 8.6% bolesnica iz grupe visokog gradusa ( $\chi^2 = 4.5$ ;  $P = 0.026$ ).

Nakon kirurškog zahvata, 63.6% bolesnica u grupi niskog gradusa te samo 17.1% bolesnica iz grupe visokog gradusa je bilo bez ostatnog tumora.

Ostatni tumor veći od 2 cm bio je prisutan u 62.9% bolesnica u grupi visokog gradusa i 27.3% bolesnica iz grupe niskog gradusa ( $\chi^2 = 9.9$ ;  $P = 0.019$ ).

Samo nemjerljiva lezija (pretežno ascites), bez ostatnog solidnog tumora, bila je prisutna u dvije od sedam bolesnica u grupi niskog gradusa i dvije od dvanaest bolesnica s karcinomom visokog gradusa.

32% karcinoma niskog gradusa imalo je manje od 2 mitoze/10 VPVP uz medijan od 9 mitoz/10 VPVP (min-max, 1-12). U grupi karcinoma visokog gradusa, umjerenu nuklearnu atipiju (gradus 2) imalo je 31%, a tešku (gradus 3) 69% karcinoma.

Medijan mitoz/10 VPVP u grupi visokog gradusa bio je 27 (min-max, 13-65) i za tri puta je veći u odnosu na karcinome niskog gradusa ( $Z=4.6$ ;  $P<0.001$ ).

Vaskularna invazija je bila prisutna u 71.4% karcinoma visokog gradusa i samo 9.1% karcinoma niskog gradusa ( $\chi^2 = 13.3$ ;  $P < 0.001$ ).

### 4.3. Imunohistokemijska analiza

Rezultati imunohistokemijske analize p53 proteina, MAPK proteina i topoizomeraze II $\alpha$  u seroznim karcinomima niskog i visokog gradusa prikazani su u Tablici 4.

**Tablica 4.** Prikaz broja (%) žena prema kategorijama imunohistokemijskih varijabli i medijana (min-max) Ki 67, u odnosu na gradus tumora

VARIJABLE		Serozni karcinomi niskog gradusa N = 11 (13.6%)	Serozni karcinomi visokog gradusa N=70 (86.4%)	<i>P</i>
P53	-	11 (100)	10 (14.3)	< 0.001 <sup>†</sup>
	+	0 (0)	60 (85.7)	
MAPK	-	4 (36.4)	58 (82.9)	0.003 <sup>†</sup>
	+	7 (63.6)	12 (17.1)	
Topo II $\alpha$	-	7 (63.6)	13 (18.6)	0.001 <sup>†</sup>
	+	4 (36.4)	57 (81.4)	
Ki67	medijan (min-max)	19 (7-54)	56.5 (18-98)	<0.001*

<sup>†</sup>  $\chi^2$  test

\*Mann-Whitney test

Niti jedan uzorak seroznog karcinoma niskog gradusa nije pokazao pozitivan imunohistokemijski izražaj p53 proteina.

U skupini karcinoma visokog gradusa, 85.7% uzoraka pokazuje difuznu, jaku nuklearnu obojenost na p53 protein, dok je 14.3% tumora iz ove skupine negativno.

Postoji statistički značajna razlika u izražaju p53 proteina između ove dvije skupine seroznih karcinoma ( $P < 0.001$ ).

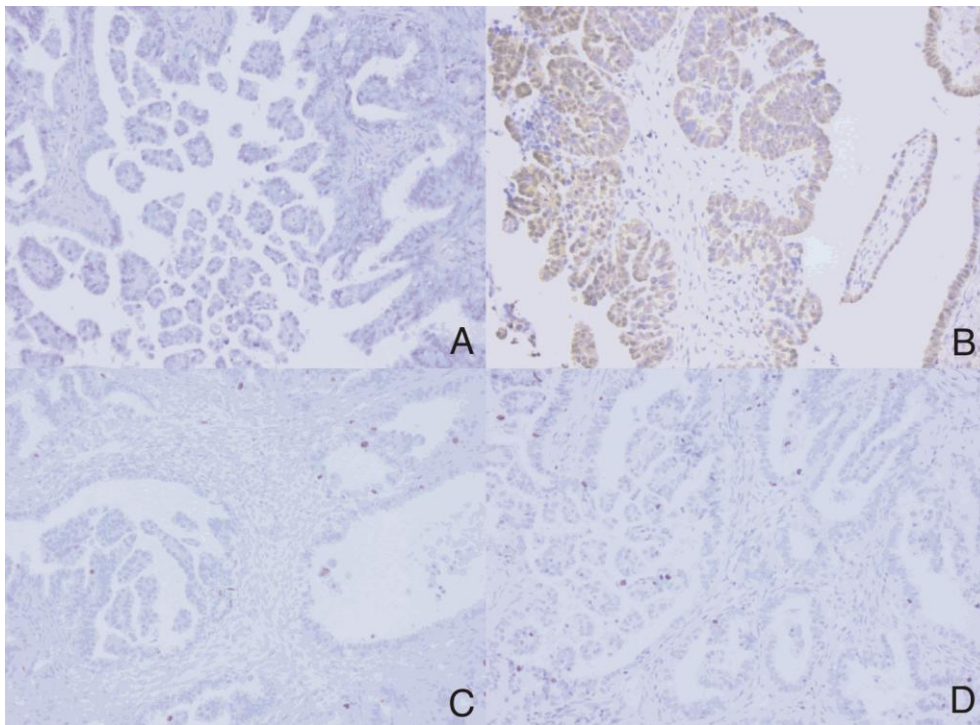
U skupini MAPK pozitivnih tumora 63.6% čine serozni karcinomi niskog gradusa za razliku od skupine visokog gradusa na koju otpada svega 17.1% ( $\chi^2=9.0$ ,  $P=0.003$ ).

Serozni karcinomi visokog gradusa predstavljaju 82.9% MAPK negativnih tumora. U skupini seroznih karcinoma visokog gradusa 14,3% uzoraka (10/70) pokazalo je pozitivan izražaj i MAPK i p53 proteina.

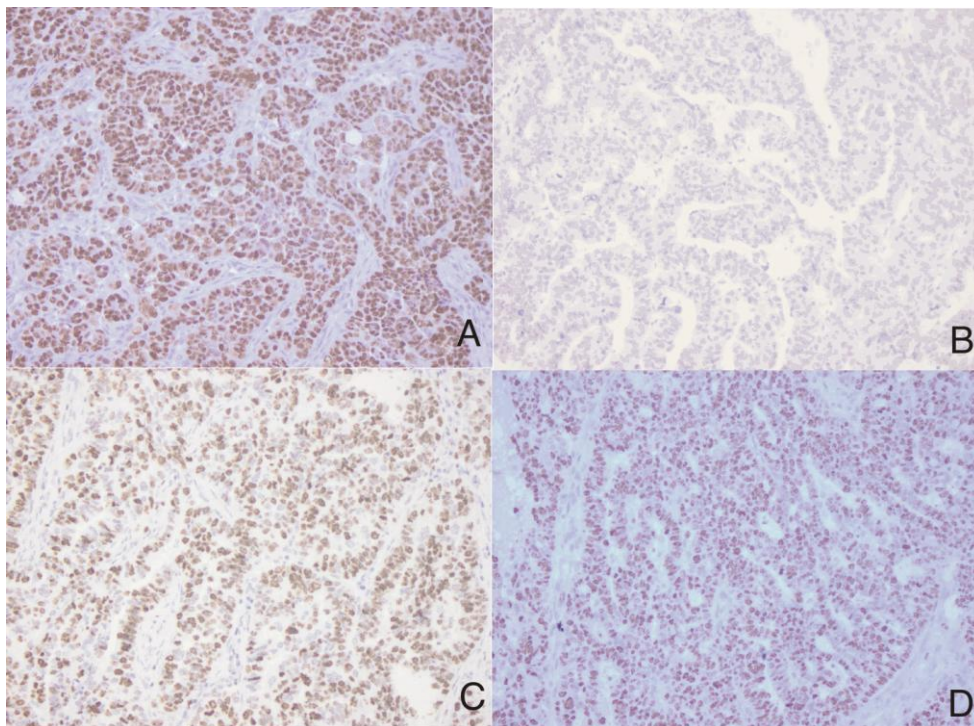
Uočen je statistički značajno veći izražaj topoizomeraze II $\alpha$  u grupi seroznih karcinoma visokog gradusa ( $\chi^2=11.2$ ,  $P=0.001$ ). Serozni karcinomi visokog gradusa predstavljaju 81,4% topoizomeraza 2 alfa pozitivnih tumora dok na karcinome niskog gradusa otpada svega 18,6%.

Statistički značajna razlika uočena je i u izražaju Ki67 proteina između ove dvije skupine ( $z = 4.4$ ,  $P < 0.001$ ). U skupini seroznih karcinoma niskog gradusa medijan je bio 19 (min-max, 7-54) za razliku od skupine karcinoma visokog gradusa u kojoj je median bio 56.5 (min-max, 18-98).

Reprezentativno imunohistokemijsko bojanje analiziranih parametara prikazano je na slici 4A-D za serozne karcinome niskog gradusa i slici 5A-D za serozne karcinome visokog gradusa.



**Slika 4.** Imunohistokemijske karakteristike seroznih karcinoma niskog gradusa (tip I tumori): A negativan p53 izražaj (200x), B pozitivan MAPK izražaj (200x), C negativan topoiI $\alpha$  izražaj (200x), D niska Ki67 proliferativna aktivnost (200x).



**Slika 5.** Imunohistokemijske karakteristike seroznih karcinoma visokog gradusa (tip II tumori): A pozitivan p53 izražaj (200x), B negativan MAPK izražaj (200x), C pozitivan topoiI $\alpha$  izražaj (200x), D visoka Ki67 proliferativna aktivnost (200x).

U Tablici 5. prikazane su ispitivane varijable i rezultati logističke regresije u odnosu na imunohistokemijski izražaj p53 proteina.

**Tablica 5.** Prikaz broja (%) ispitivanih varijabli i rezultata logističke regresije u odnosu na imunohistokemijski izražaj p53 proteina

VARIJABLE		p53-	p53+	P	OR(95%CI)	P
Dob	≤ 60	14 (63.6)	23 (40.4)	0.108	2,6(0,94-7,2)	0.067
	> 60	8 (36.4)	34(59.6)			
Klinički stadij	I i II	5 (22.7)	5 (8.8)	0.195	3.1(0.79-11,9)	0.016*
	III i IV	17 (77.3)	52 (91.2)			
Gradus	niski	11(100)	0(0)	<0.001*		
	visoki	10(14,3)	60(85.7)			
Ostatni tumor	nema	8(36.4)	11(19.3)	0.282	1.45(0.82-2.6)	0.202
	≤ 2cm	3(13.6)	12(21.1)			
	> 2 cm	11(50.0)	34(59.6)			
Vaskularna invazija	-	12(54.5)	16(28.1)	0.027*	3.1(1.1-8.5)	0.031*
	+	10(45.5)	41(71.9)			

p<0,05\*

Logističkom se regresijom nađe da je omjer izgleda za pozitivan imunohistokemijski izražaj p53 proteina 3.1 puta veći u skupini bolesnica s proširenom bolešću ( $\chi^2=1.7$ ;  $P=0.016$ ) te 3.1 puta veći u bolesnica sa nalazom tumora u vaskularnim prostorima ( $\chi^2=4.9$ ;  $P=0.031$ ). Niti jedan tumor niskog gradusa (tip I tumor) nije pokazao pozitivan izražaj p53 proteina.

Nije dokazana statistički značajna povezanost dobi bolesnica ( $\chi^2=2.6$ ;  $P=0.108$ ) i ostatnog tumora ( $\chi^2=2.5$ ;  $P=0.282$ ) sa imunohistokemijskim izražajem p53 proteina.

U Tablici 6. prikazane su ispitivane varijable i rezultati logističke regresije u odnosu na imunohistokemijski izražaj MAPK proteina.

**Tablica 6.** Prikaz broja (%) ispitivanih varijabli i rezultata logističke regresije u odnosu na imunohistokemijski izražaj MAPK proteina.

VARIJABLE		MAPK-	MAPK+	P	OR(95%CI)	P
Dob	≤ 60	30(50.0)	7(36.8)	0.317	1.7(0.59-4.9)	0.319
	> 60	30(50.0)	12(63.2)			
Gradus	niski	4(36.4)	7(63.6)	0.003	6.45(1.6-16.3)	0.009*
	visoki	58(82.9)	12(17.1)			
Ostatni tumor	nema	13(21.7)	6(31.6)	0.668	0.81(0.441-1.5)	0.162
	≤ 2cm	12 (20.0)	3 (15.8)			
	> 2 cm	35 (58.3)	10(52.6)			
Klinički stadij	I-II	6 (10.0)	4(21.1)	0.207	2.4(0.6-9.6)	0.217
	III-IV	54(90.0)	15(78.9)			
Vaskularna invazija	-	42(70.0)	9(47.4)	0.072	2.6(0.9-7.5)	0.077
	+	18(30.0)	10(52.6)			

p<0,05\*

Logističkom se regresijom nađe da je omjer izgleda za pozitivan MAPK imunohistokemijski izražaj 6.45 puta veći u skupini karcinoma niskog gradusa (tip I tumori) ( $\chi^2=9$ ;  $P=0.009$ ).

Nije dokazana statistički značajna povezanost dobi bolesnica ( $\chi^2=1.0$ ;  $P=0.319$ ), kliničkog stadija ( $\chi^2=1.6$ ;  $P=0.217$ ), ostatnog tumora ( $\chi^2=0.8$ ;  $P=0.162$ ) i nalaza tumora u vaskularnim prostorima ( $\chi^2=3.2$ ;  $P=0.077$ ) sa imunohistokemijskim izražajem MAPK proteina.

U Tablici 7. prikazane su ispitivane varijable i rezultati logističke regresije u odnosu na imunohistokemijski izražaj topoizomeraze II $\alpha$ .

**Tablica 7.** Prikaz broja (%) ispitivanih varijabli i rezultata logističke regresije u odnosu na imunohistokemijski izražaj topoizomeraze II $\alpha$

VARIJABLE		Topo II $\alpha$ -	Topo II $\alpha$ +	<i>P</i>	OR(95%CI)	<i>P</i>
Dob	≤ 60	12(60.0)	25(42.4)	0.172	2(0.73-5.7)	0.176
	> 60	8(40.0)	34(57.6)			
Gradus	niski	7(35.0)	4(18.6)	0.001*	6.45(1.6-26.3)	0.002*
	visoki	13(65.0)	57(81.4)			
Ostatni tumor	Ne	7(35.0)	12(20.3)	0.364	1.5(0.84-2.7)	0.162
	≤ 2cm	4(20.0)	11(18.6)			
Klinički stadij	> 2 cm	9(45.0)	36(61.0)	0.253	2.2(0.55-8.8)	0.262
	I-II	4(20.0)	6(10.2)			
Vaskularna invazija	III-IV	16(80.0)	53(89.8)	0.115	2.3(0.81-6.4)	0.12
	-	10(50.0)	18(30.5)			
	+	10(50.0)	41(69.5)			

p<0,05\*

Logističkom se regresijom nađe da je omjer izgleda za negativan topo II $\alpha$  imunohistokemijski izražaj 6.45 puta veći u skupini karcinoma niskog gradusa (tip I tumori) ( $\chi^2=12.1$ ;  $P=0.002$ ).

Nije dokazana statistički značajna povezanost dobi bolesnica ( $\chi^2=1.9$ ;  $P=0.176$ ), kliničkog stadija ( $\chi^2=1.3$ ;  $P=0.262$ ), ostatnog tumora ( $\chi^2=2.0$ ;  $P=0.162$ ) i nalaza tumora u vaskularnim prostorima ( $\chi^2=2.5$ ;  $P=0.12$ ) sa imunohistokemijskim izražajem topo II $\alpha$  proteina.



Zbog izrazito skromnih podataka u dostupnoj literaturi, a s ciljem da se utvrdi moguća vrijednost imunohistokemijske analize MAPK izražaja, istraživanje je nadopunjeno molekularnom analizom KRAS/BRAF gena.

Mutacija KRAS gena dokazana je u 54,5% seroznih karcinoma niskog gradusa i u samo 13,8% seroznih karcinoma visokog gradusa ( $\chi^2=7.4$ ,  $P=0.006$ ). Ni u jednom od analiziranih uzoraka nije bila prisutna BRAF mutacija.

Sedam uzoraka seroznih karcinoma visokog gradusa (11,7%) pokazalo je i KRAS mutaciju i p53 imunopozitivnost. U pet od sedam ovih tumora, uz područja koja morfološki odgovaraju karcinomima visokog gradusa, nađeni su i dijelovi koji odgovaraju borderline tumorima i seroznim karcinomima niskog gradusa.

Nadalje, u istraživanju je uspoređen KRAS mutacijski status sa imunohistokemijskim MAPK izražajem.

Usporedba imunohistokemijskog MAPK izražaja i KRAS mutacijskog statusa u seroznim karcinomima visokog i niskog gradusa prikazana je u Tablici 8.

**Tablica 8.** Prikaz broja bolesnica prema imunohistokemijskom MAPK izražaju i KRAS mutacijskom statusu u odnosu na gradus tumora.

VARIJABLE	Serozni karcinomi niskog gradusa, n	Serozni karcinomi visokog gradusa, n
KRAS mutacija	5	1
MAPK +	1	7
MAPK -		
KRAS "divlji tip"		
MAPK +	2	11
MAPK -	3	43
Ukupno	11	62

Povezanost između imunohistokemijskog MAPK izražaja i KRAS statusa tumora nije dovoljno statistički značajna da bi imunohistokemijska analiza mogla pouzdano otkriti KRAS mutaciju. Pet od šest uzoraka u skupini seroznih karcinoma niskog gradusa pokazala su pozitivan imunohistokemijski MAPK izražaj uz KRAS mutaciju.

Međutim, sedam od osam uzoraka iz skupine karcinoma visokog gradusa, uz KRAS mutaciju nije pokazala imunohistokemijski MAPK pozitivan izražaj. Također, 40% seroznih karcinoma niskog gradusa i 20.4% karcinoma visokog gradusa sa „divljim tipom“ KRAS gena pokazuju pozitivan imunohistokemijski MAPK izražaj.

Dobiveni rezultati analize pokazuju da imunohistokemijsko određivanje MAPK izražaja ima samo ograničenu vrijednost u predviđanju KRAS mutacije, uz osjetljivost metode od 0.43, specifičnost od 0.78, pozitivnom prediktivnom vrijednošću od 0.32 i negativnom prediktivnom vrijednošću od 0.85.

#### 4.4. Analize preživljenja

Analiza preživljenja Log rank testom za slobodni interval bez bolesti (DFS) prema ispitivanim pokazateljima prikazana je u Tablici 9.

**Tablica 9.** Analiza preživljenja Log rank testom za slobodni interval bez bolesti (DFS) prema ispitivanim pokazateljima

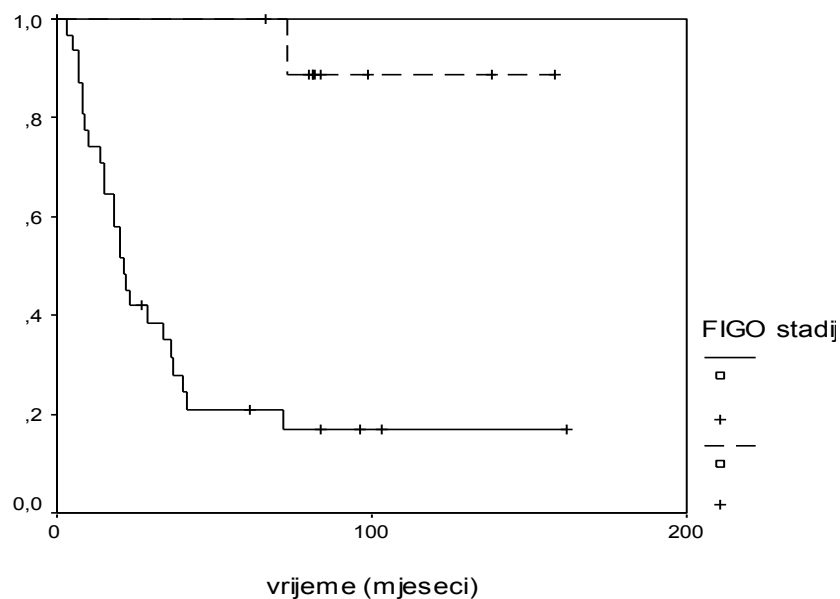
VARIJABLA		Prosjek DSF (mjeseci)	SE	95% CI	Medijan	LR	<i>P</i>
P53	-	64	10	44-84	73	1.58	0.209
	+	65	13	39-90	21		
MAPK	-	57	11	36-79	22	6.7	0.0135*
	+	85	11	63-107	81		
Topo II $\alpha$	-	69	19	32-107	29	0.02	0.876
	+	73	13	48-98	37		
Klinički stadij	I-II	149	9	131-166		14.5	<0.001*
	III-IV	46	10	26-65	21		
Gradus	niski	94	24	47-140		1	0.317
	visoki	66	12	43-89	29		
Vaskularna invazija	-	87	15	58-116	73	2.1	0.150
	+	56	14	29-83	22		
Dob (g)	$\leq 60$	62	12	38-86	23	2.14	0.144
	$> 60$	94	19	56-131			

Skupina bolesnica dijagnosticiranih u ranom kliničkom stadiju imala je slobodan interval bez bolesti (DFS) 149 mjeseci, za razliku od bolesnica dijagnosticiranih u kasnom kliničkom stadiju koje su imale DFS samo 46 mjeseci. Slobodni interval bez bolesti je 3.24 puta kraći kod bolesnica u kasnom stadiju u odnosu na rani stadij bolesti (LR=14.5,  $P < 0.001$ ).

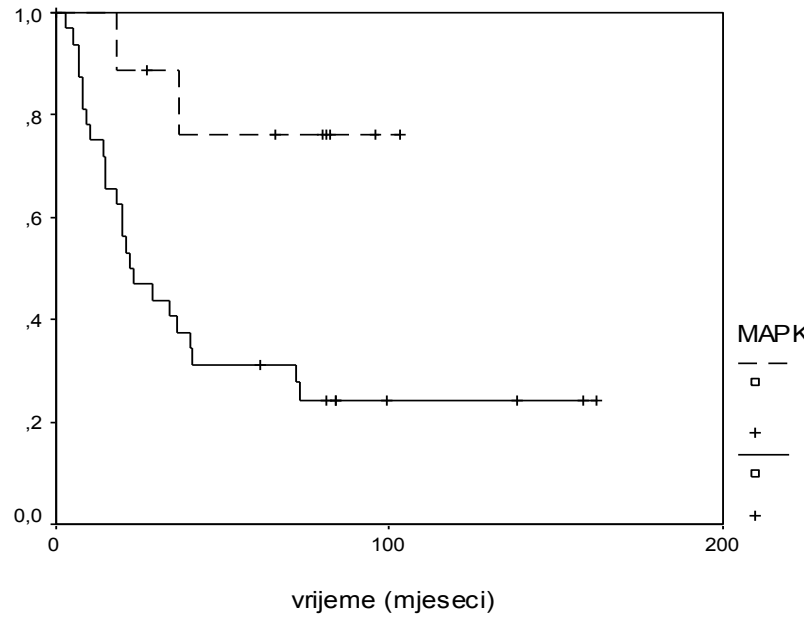
Bolesnice u skupini MAPK pozitivnih tumora imaju 1.49 puta duži DFS (85 mjeseci) u odnosu na bolesnice sa negativnim MAPK izražajem u tumorskom tkivu (57 mjeseci) (LR=6.7,  $P=0.0135$ ).

Nije dokazano da su dob bolesnica ( $P=0.144$ ), nalaz vaskularne invazije ( $P=0.150$ ), gradus tumora ( $P=0.317$ ), imunohistokemijski izražaj p53 proteina ( $P=0.209$ ) i topoizomeraze II $\alpha$  ( $P=0.876$ ) statistički značajno povezani s dužinom preživljavanja bez bolesti.

Pokazatelji kod kojih su se dokazale statistički značajne razlike u DFS prikazani su grafički Kaplan-Meierovim krivuljama (Slike 6 i 7).



**Slika 6.** Prikaz Kaplan-Meierove krivulje preživljenja za slobodni interval bez znakova bolesti (DFS) prema kliničkom stadiju I-II (isprekidana linija) i kliničkom stadiju III-IV (puna linija) (LR 14.5,  $P<0.001$ ).



**Slika 7.** Prikaz Kaplan-Meierove krivulje preživljenja za slobodni interval bez znakova bolesti (DFS) prema pozitivnom (isprekidana linija) i negativnom izražaju MAPK proteina (puna linija) (LR 6.7,  $P=0.0135$ ).

Rezultati Coxove regresijske uninominalne analize za slobodni interval bez bolesti (DFS) prikazani su u Tablici 10.

**Tablica 10.** Coxove regresijske uninominalne analize za slobodni interval bez bolesti (DFS)

VARIJABLE		RR	95%CI	P
P53	-*	1.73	0.725-4.1	0.217
	+			
MAPK	-*	5.1	1.2-21.7	0.027*
	+			
Topo II $\alpha$	-*	0.936	0.405-2.2	0.877
	+			
gradus	niski*	1.7	0.59-4.96	0.325
	visoki			
vaskularna	ne*	1.76	0.80-3.85	0.158
invazija	da			
klinički	I-II*	18.3	2.2-148	0.007*
stadij	III-IV			
dob	$\leq 60$ *	0.97	0.93-1	0.146
	$> 60$			

Cox-ovom regresijskom uninominalnom analizom za slobodni interval bez bolesti (DFS), relativni rizik za povrat bolesti u bolesnica sa MAPK negativnim tumorom je 5 puta veći u odnosu na skupinu bolesnica sa MAPK pozitivnim tumorom (RR=5.1; 95%CI=1.2-21.7;  $P=0.027$ ).

U bolesnica s proširenom bolešću (klinički stadij III-IV), relativni rizik za povrat bolesti je 18.3 puta veći u odnosu na bolesnice s ranim kliničkim stadijem bolesti (RR=18.3; 95%CI=2.2-148;  $P=0.007$ ).

Rezultati multinominalne Coxove regresijske analize za slobodni interval bez bolesti (DFS) prikazani su u Tablici 11.

**Tablica 11.** Multinominalna Cox regresijska analiza za slobodni interval bez bolesti (DSF)

VARIJABLE	RR	95% CI	<i>P</i>
MAPK -*	3.7	0.77-17.8	0.1015
Klinički stadij + I-II* III-IV	21.6	2.7-171	0.004*

U multinominalnoj Coxovoj regresijskoj analizi, u koju smo uključili sve istraživane varijable, rizik za povrat bolesti je 21.6 puta veći u skupini bolesnica s kliničkim stadijem III-IV, u odnosu na bolesnice s kliničkim stadijem I-II (RR=21.6; 95%CI=2.7-171; *P*=0.004).

Rizik za povrat bolesti u bolesnica s MAPK negativnim tumorom je 3.7 puta veći, na nivou značajnosti od 90%, u odnosu na bolesnice sa MAPK pozitivnim tumorom (RR=3.7; 95% CI=0.77-17.8; *P*=0.1015).

Klinički stadij i MAPK potvrdili su se kao dva potencijalno nezavisna prediktora slobodnog intervala bez povrata bolesti. Ostale varijable uključene u ovu analizu nisu pokazale statistički značajnu povezanost sa slobodnim intervalom bez povrata bolesti.

Ukoliko zbog malog uzorka i velikog rasapa 95% CI isključimo klinički stadij koji je dominantan, a ostavimo sve ostale varijable, kao jedina bitna varijabla u procjeni rizika povrata bolesti ostaje MAPK. U skupini bolesnica s MAPK negativnim tumorom, na nivou značajnosti od 92%, rizik za povrat bolesti je 4.3 puta veći u odnosu na bolesnice s MAPK pozitivnim tumorom (RR=4.3; 95% CI=0.83-22.2; *P*=0.077) (Tablica 12).

**Tablica 12.** Multinominalna Cox regresijska analiza za slobodni interval bez bolesti (DSF), bez kliničkog stadija

VARIJABLE	RR	95% CI	<i>P</i>
MAPK -*	4.3	0.83-22.2	0.077
+			

Analiza preživljenja Log rank testom za ukupno preživljenje (OS) prema ispitivanim pokazateljima prikazana je u Tablici 13.

**Tablica 13.** Analiza preživljenja Log rank testom za ukupno preživljenje (OS) prema ispitivanim pokazateljima

VARIJABLE		Prosjek OS (mjeseci)	SE	95% CI	Medijan	LR	<i>P</i>
P53	-	55	9	39-72	38	2.42	0.12
	+	50	7	36-65	25		
MAPK	-	51	7	38-65	29	0.89	0.345
	+	51	10	30-71	21		
Topo II $\alpha$	-	61	13	35-86	37	0.14	0.707
	+	56	8	40-71	26		
Klinički stadij	I-II						
	III-IV	42	6	30-54	24	18.8	<0.001*
Gradus	niski	104	20	65-144			
	visoki	51	7	37-64	25	4.53	0.033*
Vaskularna invazija	Ne	84	12	60-107	48	8,44	0.004*
	Da	41	7	27-55	23		
Ostatni tumor	Ne	123	13	97-149		31.6	<0.001*
	≤2 cm	51	8	36-66	40		
	>2 cm	26	4	18-34	19		
Dob	≤60	69	10	50-88	40	4.12	0.042*
	>60	43	9	26-61	19		

Niti jedna bolesnica iz ovog istraživanja, dijagnosticirana u ranom kliničkom stadiju bolesti, nije umrla. Bolesnice dijagnosticirane u kasnom kliničkom stadiju žive u prosjeku 42 mjeseca (LR=18.8,  $P=<0.001$ ). Ukupno preživljenje duže je 1.6 puta u bolesnica mlađih od 60 godina (LR=4.12,  $P=0.042$ ).

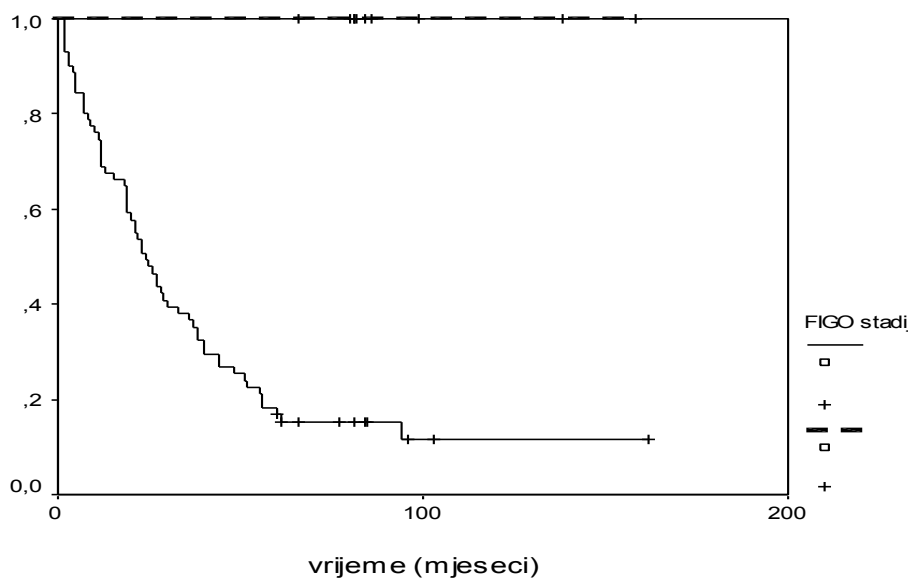


Bolesnice sa karcinomom visokog gradusa imaju 2,04 puta kraće preživljenje u odnosu na bolesnice s karcinomom niskog gradusa (LR=4.53,  $P=0.033$ ).

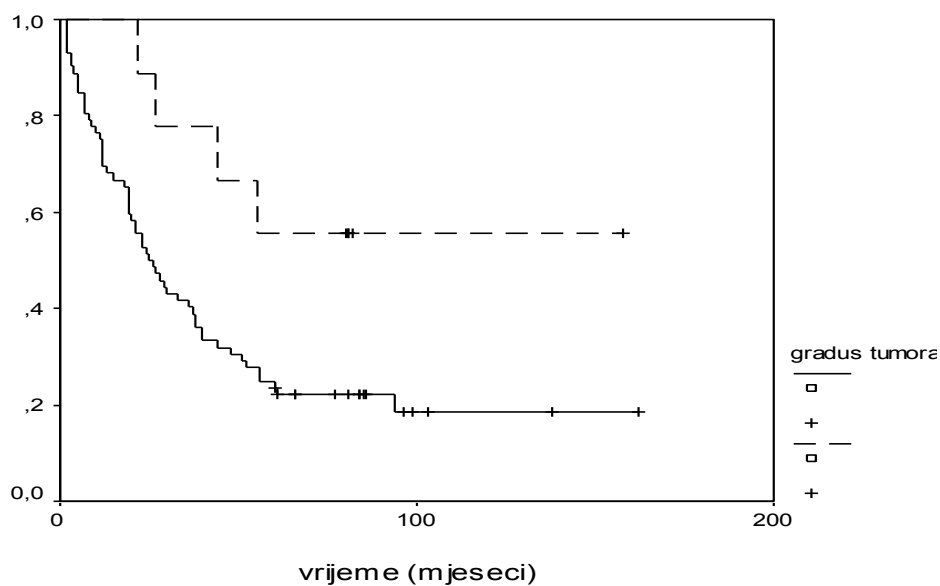
Analizirajući skupinu bolesnica s nalazom tumora u vaskularnim prostorima, OS je bio 2,05 puta kraći u odnosu na bolesnice bez vaskularne invazije (41 naspram 84 mjeseci) (LR=8.44,  $P=0.004$ ).

Nije dokazano da je izražaj p53 proteina, MAPK i topoizomeraze II $\alpha$  statistički značajno povezan s dužinom preživljenja.

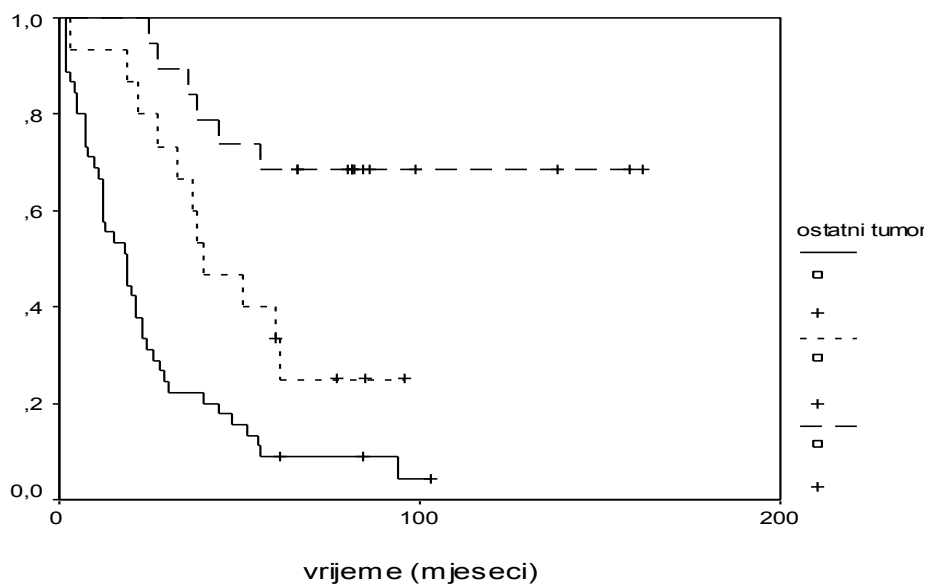
Pokazatelji kod kojih su se dokazale statistički značajne razlike u OS prikazani su grafički Kaplan-Meierovim krivuljama (Slike 8-12).



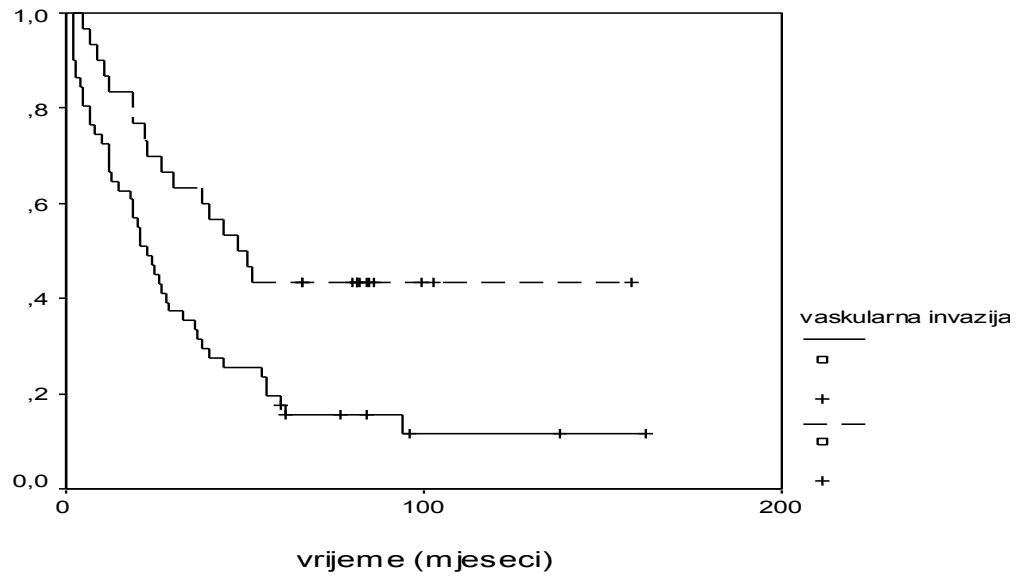
**Slika 8.** Prikaz Kaplan-Meierove krivulje ukupnog preživljenja (OS) prema kliničkom stadiju I-II (isprekidana linija) i stadiju III-IV (puna linija) (LR=18.8,  $P=<0.001$ ).



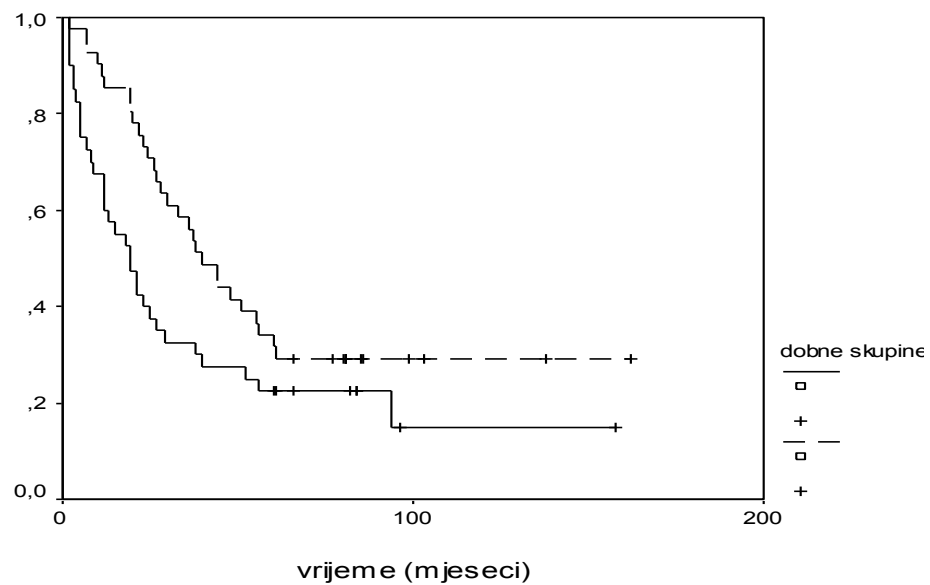
**Slika 9.** Prikaz Kaplan-Meierove krivulje ukupnog preživljenja (OS) prema niskom gradusu (isprekidana linija) i visokom gradusu tumora (puna linija) (LR=4.53,  $P=0.033$ ).



**Slika 10.** Prikaz Kaplan-Meierove krivulje ukupnog preživljenja (OS) prema ostatnom tumoru; bez ostatnog tumora (isprekidana linija), ostatni tumor  $\leq 2$  cm (točkana linija) i ostatni tumor  $> 2$  cm (puna linija) (LR=31.6,  $P=<0.001$ ).



**Slika 11.** Prikaz Kaplan-Meierove krivulje ukupnog preživljenja (OS) u odnosu na tumor bez vaskularne invazije (isprekidana linija) i tumor s vaskularnom invazijom (puna linija) (LR=8.44,  $P=0.004$ ).



**Slika 12.** Prikaz Kaplan-Meierove krivulje ukupnog preživljenja (OS) prema dobnoj skupini  $\leq 60$  godina (isprekidana linija) i skupini  $>60$  godina (puna linija) (LR=4.12,  $P=0.042$ ).

Rezultati Coxove regresijske uninominalne analize za ukupno preživljenje (OS) prikazani su u Tablici 14.

<b>Tablica 14.</b> Coxove regresijske uninominalne analize za ukupno preživljenje (OS)				
VARIJABLE		RR	95% CI	P
Dob	≤60*	1.7	1-2.8	0.044*
	>60			
P53	-*	1.64	0.89-3	0.115
	+			
MAPK	-*	0.74	0.38-1.5	0.389
	+			
Topo IIα	-*	1.2	0.68-2.25	0.492
	+			
Vaskularna invazija	Ne*	2.5	1.4-4.4	0.002*
	Da			
Klinički stadij	I-II*	32.8	2.3-459	0.010*
	III-IV			
Gradus	niski*	3.8	1.2-12	0.025*
	visoki			
Ostatni tumor	0*	2.8	1.9-4	<0.001*
	≤ 2 cm			
	>2 cm			

\*referentni nivo

Relativni rizik smrtnog ishoda u bolesnica starijih od 60 godina veći je 1.7 puta u odnosu na bolesnice mlađe od 60 godina (RR=1.7; 95%CI=1.4-4.4;  $P=0.002$ ).

Prisutnost vaskularne invazije povećava relativni rizik smrtnog ishoda 2.5 puta (RR=2.5; 95%CI=1.4-4.4;  $P=0.002$ ).

Relativni rizik smrtnog ishoda veći je 3.8 puta u bolesnica s karcinomom visokog gradusa u odnosu na karcinomom niskog gradusa (RR=3.8; 95% CI=1.2-12,  $P=0.025$ ).

Nalaz ostatnog tumora nakon primarnog kirurškog zahvata povećava relativni rizik smrtnog ishoda 2.8 puta (RR=2.8; 95%CI=1.9-4;  $P=<0.001$ ).

Niti jedna bolesnica iz ovog istraživanja, dijagnosticirana u kliničkom stadiju I-II, nije umrla. Relativni rizik smrtnog ishoda u bolesnica s kliničkim stadijem III-IV veći je 32.8 puta u odnosu na bolesnice s kliničkim stadijem I-II (RR=32.8; 95%CI=2.3-459;  $P=0.010$ ). Zbog velikog rasapa 95% CI, klinički stadij nije uzet u obzir u daljnjoj analizi.

Nije dokazano da su ostali analizirani pokazatelji: izražaj p53 proteina, MAPK i topoizomeraze II $\alpha$  te gradus tumora statistički značajno povezni s većim relativnim rizikom smrtnog ishoda.

Rezultati multinominalne Coxove regresijske analize za ukupno preživljenje (OS) prikazani su u Tablici 15.

<b>Tablica 15.</b> Multinominalna Cox regresijska analiza za ukupno preživljenje (OS)				
VARIJABLE		RR	95% CI	p
Dob	$\leq 60^*$	1.21	0.72-2.0	0.471
	>60			
Vaskularna invazija	ne	1.7	0.93-2.9	0.084
	da			
Gradus	niski*	1.56	0.47-5.2	0.463
	visoki			
	nema*			
Ostatni tumor	$\leq 2$ cm	2.6	1.7-3.9	<0,001*
	>2 cm			

\*referentni nivo

Multinominalnom Coxovom regresijskom analizom nađeno je da je rizik za smrtni ishod u bolesnica s ostatnim tumorom 2.6 puta veći u odnosu na bolesnice bez ostatnog tumora nakon primarnog kirurškog zahvata (RR=2.6; 95% CI=1.7-3.9;  $P<0,001$ ) i potencijalni je nezavisni prediktor smrtnog ishoda.

Rizik za smrtni ishod bolesnica sa vaskularnom invazijom u tumorskom tkivu 1.7 puta je veći, na nivou značajnosti od 92%, u odnosu na bolesnice bez prisutne vaskularne invazije (RR=1.75; 95% CI=0.96-3.2;  $P=0.069$ ) što ovu varijablu čini potencijalnim nezavisnim prediktorom smrtnog ishoda.

#### 4.5. Odgovor tumora na kemoterapiju

U analizu je uključeno 57 bolesnica s kliničkim stadijem III i IV. Isključene su bolesnice koje su imale proširenu bolest, a nisu primile kemoterapiju zbog starije dobi i/ili lošeg općeg stanja ili su primile manje od 4 ciklusa u prvoj liniji kemoterapije.

Sve bolesnice primale su kemoterapiju temeljenu na platini. 34 bolesnice (60%) dobile su kombinaciju platine i taksola. Dvije bolesnice liječene su samo platinom, a 23 bolesnice kombinacijom platine s drugim lijekovima (etopozid, ciklofosamid, doxorubicin, gencitabin, epirubicin, farmarubicin).

U Tablici 16. prikazane su bolesnice prema gradusu i odgovoru tumora na liječenje, prema RECIST kriterijima 89).

Tablica 16. Prikaz broja (n) bolesnica prema gradusu i odgovoru tumora na liječenje						
VARIJABLE	Potpuni odgovor (CR)	Djelomičan odgovor (PR)	Stabilna bolest (SD)	Progresija bolesti (PD)	Ukupno	
Gradus	niski	5	0	1	1	7
	visoki	25	5	6	14	50
Ukupno	30	5	7	15	57	

Potpuni odgovor na liječenje imalo je 53% bolesnica (30/57). Među bolesnicama koje su uključene u analizu samo sedam je imalo tumor niskog gradusa (tip I tumor). Pet od sedam bolesnica iz ove skupine imalo je potpuni odgovor na prvu liniju kemoterapije.

61.4% bolesnica imalo je objektivni odgovor na liječenje, dok je njih 74% imalo klinički odgovor na primjenjeno liječenje.

U Tablici 17. prikazane su ispitivane varijable u odnosu na potpuni, objektivni i klinički odgovor na liječenje.

**Tablica 17.** Prikaz broja (%) bolesnica prema ispitivanim varijablama u odnosu na potpuni, objektivni i klinički odgovor na liječenje.

VARIJABLE		CR <sup>1</sup> n(%)	<i>P</i>	OR <sup>2</sup> n(%)	<i>P</i>	CBR <sup>3</sup> n(%)	<i>P</i>
P53	-	8(26.7)	0.804	9(25.7)	0.844	11(26.2)	0.846
	+	22(73.3)		26(74.3)		31(73.8)	
MAPK	-	25(83.3)	0.596	30(85.7)	0.212	35(83.3)	0.322
	+	5(16.7)		5(14.3)		7(16.7)	
Topo II $\alpha$	-	9(30)	0.486	10(28.6)	0.568	10(23.8)	0.825
	+	21(70)		25(71.4)		32(76.2)	
Ostatni tumor	ne	8(26.7)	<0.001*	8(22.9)	<0.001*	8(19)	0.003*
	$\leq 2$ cm	12(40)		13(37.1)		13(31)	
	> 2cm	10(33.3)		14(40)		21(50)	
Vaskularna invazija	ne	12(40)	0.248	13(37.1)	0.397	14(33.3)	0.878
	da	18(60)		22(62.9)		28(66.6)	
gradus	niski	5(16.7)	0.510	5(14.3)		6(14.3)	
	visoki	25(83.3)		30(85.7)		36(85.7)	

CR<sup>1</sup> potpuni odgovor; OR<sup>2</sup> objektivni odgovor; CBR<sup>3</sup> klinički odgovor na liječenje

Prisutna je statistički značajna razlika među bolesnicama sa i bez ostatnog tumora, u odnosu na potpuni ( $\chi^2 = 24$ ,  $P < 0.001$ ), objektivni ( $\chi^2 = 20.9$ ,  $P < 0.001$ ) i klinički odgovor na kemoterapiju ( $\chi^2 = 11.9$ ,  $P = 0.003$ ).

Nije dokazano da ostale ispitivane varijable imaju utjecaj na potpuni, objektivni ili klinički odgovor na liječenje.



U Tablici 18. prikazane su ispitivane varijable u odnosu na dužinu perioda bez povrata bolesti (DSF) u bolesnica koje su imale potpuni odgovor na prvu liniju kemoterapije (CR).

**Tablica 18.** Prikaz vremena do pojave povrata bolesti (DSF) u bolesnica sa potpunim odgovorom na liječenje (CR), u odnosu na ispitivane varijable

VARIJABLA		CR		95% CI	Medijan	LR	P
		prosjek (mjeseci)	SE				
P53	-	44	12	22-67	36	0.55	0.457
	+	49	13	24-74	22		
MAPK	-	40	10	21-60	22	3.53	0.060
	+	69	16	38-100			
Topo II $\alpha$	-	22	6	10-35	18	2.38	0.123
	+	60	13	33-86	31		
Ostatni tumor	nema	38	16	6-70	20	0.75	0.686
	$\leq 2$ cm	36	9	19-53	29		
	$> 2$ cm	49	12	24-73	28		

Postoji statistički značajna razlika, na nivou značajnosti od 94%, da će bolesnice s potpunim odgovorom na kemoterapiju, uz MAPK negativni tumor, imati kraće vrijeme do pojave povrata bolesti (LR=3.53,  $P=0.060$ ). Nije dokazan utjecaj ostalih ispitivanih varijabli na trajanje potpunog odgovora na kemoterapiju.

U Tablici 19. prikazano je vrijeme objektivnog odgovora do pojave povrata bolesti ili progresije, u odnosu na ispitivane varijable.

**Tablica 19.** Prikaz vremena do pojave povrata ili progresije bolesti u bolesnicima sa objektivnim odgovorom na liječenje (OR), u odnosu na ispitivane varijable

VARIJABLA		OR		95% CI	Medijan	LR	P
		prosjek (mjeseci)	SE				
P53	-	37	10	17-56	31	0.5	0.459
	+	31	7	17-45	20		
MAPK	-	27	6	16-39	20	3.33	0.068
	+	62	16	31-93	68		
Topo II $\alpha$	-	21	6	8-33	9	2.5	0.114
	+	37	8	22-52	28		
Ostatni tumor	nema	38	17	4-72	20	0.22	0.894
	$\leq 2$ cm	32	7	17-46	28		
	$> 2$ cm	32	9	15-49	20		

Postoji statistički značajna razlika, na nivou značajnosti od 93%, da će bolesnice s objektivnim odgovorom na terapiju te MAPK negativnim tumorom imati kraće vrijeme do pojave povrata bolesti (LR=3.33,  $P=0.068$ ).

Nije dokazan utjecaj ostalih ispitivanih varijabli na trajanje potpunog odgovora na kemoterapiju.

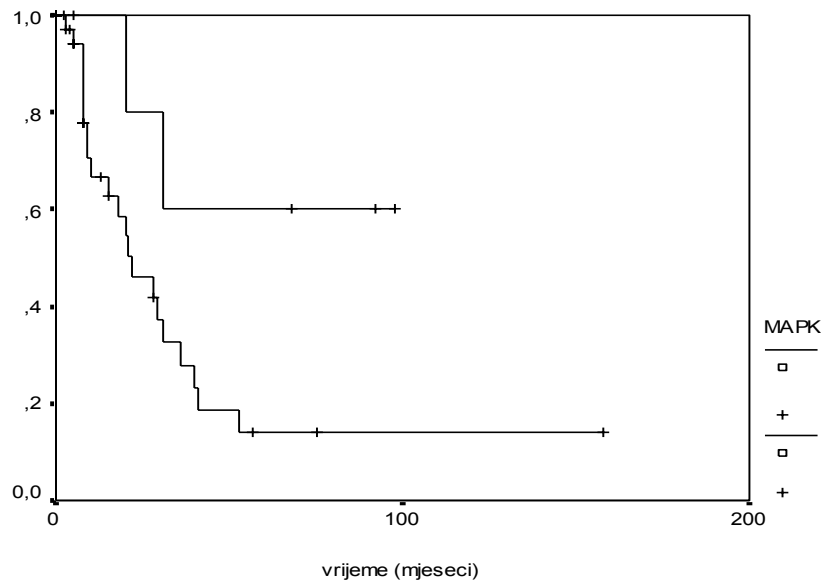
Za bolesnice koje su imale djelomičan odgovor na kemoterapiju ili stabilnu bolest prikazali smo vrijeme do progresije bolesti (PFS), u odnosu na ispitivane varijable (Tablica 20).

Tablica 20. Prikaz vremena do progresije bolesti (PFS) u bolesnica sa djelomičnim odgovorom (PR) i stabilnom bolesti (SD), u odnosu na ispitivane varijable

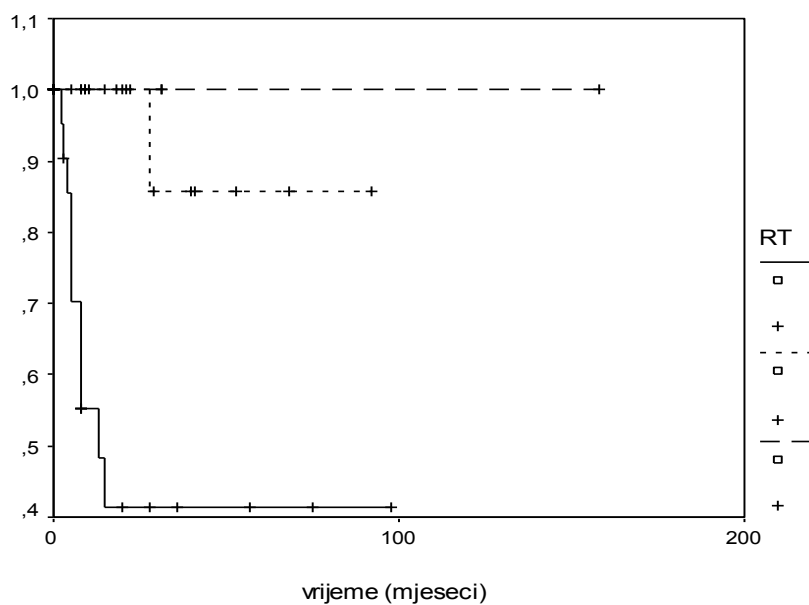
VARIJABLE		Prosjek			medijan	LR	<i>P</i>
		PSF (mj)	SE	95% CI			
P53	-	106	15	76-135	13	0.07	0.797
	+	72	13	48-97			
MAPK	-	71	16	39-103	13	0.01	0.942
	+	105	14	78-133			
Topo II $\alpha$	-	100	14	73-128	13	1.52	0.217
	+	61	7	48-74			
Ostatni tumor	$\leq 2$ cm	83	8	66-99	13	12.8	0.002*
	$> 2$ cm	45	11	24-66			
Vaskularna invazija	ne	99	15	69-128	13	2.12	0.145
	da	82	10	62-102			

Bolesnice s ostatnim tumorom manjim od 2 cm imaju gotovo dvostruko duži period bez progresije bolesti (LR=12.8,  $P=0.002$ ). Iako se može uočiti da bolesnice s MAPK pozitivnim, a p53 i topo II $\alpha$  negativnim tumorom imaju nešto duži period bez progresije bolesti, ova razlika nije dosegla statističku značajnost.

Pokazatelji, kod kojih je prisutna statistički značajna razlika u trajanju perioda bez recidiva ili progresije bolesti, nakon primjenjenog onkološkog liječenja, prikazani su grafički Kaplan-Meierovim krivuljama (Slike 13, 14).



**Slika 13.** Prikaz Kaplan-Meierove krivulje preživljenja za slobodni interval bez znakova bolesti (DFS) u bolesnica s potpunim odgovorom (CR) na kemoterapiju, prema pozitivnom (isprekidana linija) i negativnom izražaju MAPK proteina (puna linija) (LR 3.53,  $P=0.060$ ).



**Slika 14.** Prikaz Kaplan-Meierove krivulje preživljenja bez progresije bolesti (PFS) prema ostatnom tumoru; bez ostatnog tumora (isprekidana linija), ostatni tumor  $\leq 2$  cm (točkana linija) i ostatni tumor  $> 2$  cm (puna linija) (LR=12.8,  $P=0.002$ ).

U Tablici 21. prikazane su bolesnice u odnosu na gradus tumora i osjetljivost tumora na primijenjenu kemoterapiju.

Tablica 21. Prikaz broja bolesnica (n) prema gradusu tumora i osjetljivosti tumora na kemoterapiju

VARIJABLE	Osjetljivi	Rezistentni	Refraktorni	Ukupno	
Gradus	niski	4	2	1	7
	visoki	20	16	14	50
Ukupno	24	18	15	57	

Dvije od sedam bolesnica s tumorom niskog gradusa (tip I tumori) bile su rezistentne, a jedna refraktorna na primjenjeno liječenje. U skupini bolesnica s tumorom visokog gradusa, ukupno 60% tumora nije bilo osjetljivo na primjenjenu terapiju: 32% (16/50) tumora bilo je rezistentno, a 25% (14/50) refrakterno. U daljnjoj analizi, zbog malog broja uzorka, rezistentni i refraktorni tumori definirani su kao jedna skupina. Ispitivane varijable u odnosu na osjetljivost tumora na primjenjeno liječenje prikazane su u Tablici 22.

Tablica 22. Prikaz broja (%) bolesnica prema ispitivanim varijablama u odnosu na osjetljivost tumora na kemoterapiju temeljenu na platini

VARIJABLE		Kemoosjetljivi tumori, n(%)	Kemorezistentni tumori, n(%)	<i>P</i>
P53	-	8(33.3)	8(24.2)	0.649
	+	16(66.7)	25(75.8)	
MAPK	-	19(79.2)	26(78.8)	0.972
	+	5(20.8)	7(21.2)	
Topo II $\alpha$	-	7(29.2)	7(21.2)	0.491
	+	17(70.8)	26(78.8)	

Nije dokazana statistički značajna povezanost imunohistokemijskog izražaja p53 proteina ( $\chi^2=0.208$ ;  $P=0.649$ ), MAPK ( $\chi^2=0.001$ ;  $P=0.972$ ) i topo II $\alpha$  ( $\chi^2=0.474$ ;  $P=0.491$ ) sa osjetljivošću tumora na primjenjeno liječenje.

## 5. RASPRAVA

Karcinom jajnika ima najveću stopu smrtnosti među karcinomima ženskog spolnog sustava. Porijeklo i patogeneza karcinoma jajnika, unatoč dugogodišnjim istraživanjima, još uvijek su velikim dijelom nepoznanica 30).

Prema istraživanjima posljednjih godina, čini se da karcinom jajnika nije jedinstvena bolest već se sastoji od tumora koji se mogu klasificirati na osnovu različite morfološke slike i molekularno-genetskih karakteristika. Slijedom ovih istraživanja Kurman i suradnici predložili su dualistički model koji različite histološke tipove karcinoma pokrovnog epitela jajnika kategorizira u dvije skupine označene kao tip I i tip II (41, 44).

Serozni karcinomi niskog i visokog gradusa predstavljaju prototip predloženog modela. Iako su imenovani kao karcinom niskog i visokog gradusa, važno je naglasiti da ne predstavljaju dva gradusa unutar homogene skupine seroznih tumora, već da su morfološke razlike među njima odraz bioloških i genetskih različitosti odnosno puta karcinogeneze, što ima za posljedicu i različito kliničko ponašanje te prognozu u ove dvije skupine (41, 44).

Udio seroznih karcinoma niskog gradusa među seroznim neoplazmama je nizak i prosječno iznosi 10% (61, 91). Slijedeći jasno definirane morfološke kriterije prema Malpici i suradnicima (43), u ovom istraživanju bilo je 13.6% seroznih karcinoma niskog gradusa (tip I tumori). 86.4% seroznih karcinoma morfološki je odgovaralo karcinomu visokog gradusa (tip II tumori).

Prema dosadašnjim saznanjima, epidemiologija seroznih karcinoma niskog gradusa značajno je različita od one visokog gradusa, što ide u prilog konceptu da serozni karcinomi niskog gradusa čine različit klinički i biološki entitet.

U velikoj epidemiološkoj studiji objavljenoj 2008. g., u koju je bilo uključeno 12 400 bolesnica, 6.3% seroznih karcinoma bilo je niskog gradusa. Dob pojavnosti bolesti (55.5 g. u odnosu na 62.6 g.), trend godišnje stope učestalosti (-3.8% u odnosu na 1.4%) te prosječno ukupno preživljenje u bolesnica s proširenom bolešću (85 u odnosu na 36 mjeseci) značajno su se razlikovali u skupini bolesnica sa seroznim karcinomom niskog gradusa u odnosu na one visokog gradusa (92). Slične rezultate prikazali su Malpica i suradnici (43), Bodurka i suradnici (93) te Seidman i suradnici (91), za bolesnice sa seroznim karcinomom niskog gradusa (41, 51 i 57 godina) te bolesnice s karcinomom visokog gradusa (55, 57 i 65 godina). I u ovom istraživanju, sukladno do sada objavljenim rezultatima, karcinomi niskog gradusa javljaju se u mlađoj životnoj dobi (52 u odnosu na 63.5 godine).

Rezultati epidemioloških istraživanja i predloženi model karcinogeneze imaju značajne posljedice na dosadašnje metode ranog probira i način liječenja. Probir koji uključuje klinički pregled, Ca 125 i transvaginalni UZV, gotovo je u potpunosti neučinkovit za karcinome visokog gradusa dok je primjenjiv za one niskog gradusa koji se razvijaju postupno iz jasno definiranih prekurorskih lezija, ali koji čine tek mali udio karcinoma jajnika. Prema rezultatima epidemiološke studije iz 2008. godine (92), trećina bolesnica sa karcinomom niskog gradusa otkrije se u kliničkom stadiju I, uz prosjek ukupnog preživljenja od 123 mjeseci. Tek 9% bolesnica sa karcinomom visokog gradusa otkrije se u ovom kliničkom stadiju, što je u skladu s rezultatima našeg istraživanja prema kojem je bolest otkrivena u ranoj fazi (klinički stadij I i II) u samo 8.6% bolesnica iz skupine visokog gradusa te u 35.4% bolesnica iz skupine niskog gradusa ( $P = 0.026$ ).

Prema rezultatima našeg istraživanja, sukladno podacima iz literature, serozni karcinomi visokog gradusa imali su lošije kliničko – patološke karakteristike u usporedbi s karcinomima niskog gradusa: proširenu bolest ( $P=0.026$ ), ostatni tumor veći od 2 cm nakon citoreduktivnog operativnog zahvata ( $P=0.019$ ), veći mitotski indeks ( $P<0.001$ ) te prisutnu vaskularnu invaziju ( $P<0.001$ ), što je odraz agresivnog fenotipa ove skupine tumora.

Klinički stadij, ostatna bolest nakon kirurškog zahvata i gradus tumora u nekoliko su se studija pokazali kao važan nezavisni prognostički čimbenik ukupnog preživljenja (52, 54, 68, 70, 94-98), iako su rezultati ovih studija teško usporedivi jer koriste različit model stupnjevanja uz uključivanje različitih stadija bolesti.

Prema velikoj studiji na 4317 žena u Danskoj, predloženi binarni model pokazao se kao nezavisan prognostički čimbenik preživljenja (99). Ove rezultate potvrđuju dvije studije (43, 93), prema kojima bolesnice s karcinomom niskog gradusa imaju značajno bolje preživljenje, dok jedna studija (91) naglašava potrebu analize većeg broja uzoraka da bi se procjenila prognostička vrijednost. U našem istraživanju, bolesnice sa seroznim karcinomom visokog gradusa imale su 2,04 puta kraće preživljenje u odnosu na bolesnice s karcinomom niskog gradusa ( $P=0.033$ ); niti jedna bolesnica dijagnosticirana u ranom kliničkom stadiju bolesti nije umrla, dok su bolesnice dijagnosticirane u kasnom kliničkom stadiju živjele u prosjeku 42 mjeseca ( $P<0.001$ ); ukupno preživljenje bilo je 1.6 puta duže u bolesnica mlađih od 60 godina ( $P=0.042$ ).

Volumen ostatne bolesti nakon citoreduktivnog kirurškog zahvata vrlo je važan prognostički pokazatelj. Opsežan primarni kirurški zahvat prema FIGO smjernicama (2) temelj je terapije karcinoma jajnika. Kod 10 do 25% bolesnica s pretpostavljenim ranim stadijem bolesti ograničenim na jajnike i zdjelicu, nakon ovakvog zahvata, doći će do revizije kliničke proširenosti bolesti, velikim dijelom zbog prisutnih metastaza u zdjelične limfne čvorove (100). Prema ovim autorima, bolesnice koje imaju klinički stadij IIIc, isključivo zbog zahvaćanja limfnih čvorova, imaju povoljniju prognozu u usporedbi s ostalim bolesnicama u stadiju IIIc.

Napretkom kirurških tehnika, optimalnom citoredukcijom smatra se minimalni ostatni tumor manji od 1 cm (7, 18, 100, 101). U našem istraživanju nismo mogli definirati ostatnu bolest na razini od 1 cm već smo se koristili starom granicom razdvajanja od 2 cm. Zaključivanje na ovoj razini bilo je vjerodostojnije jer su arhivirani podaci o ostatnoj bolesti dijelom bili izraženi numerički, a dijelom opisno. Prema rezultatima našeg istraživanja, 37.1% bolesnica u skupini seroznih karcinoma visokog gradusa i 72.7% bolesnica u skupini niskog gradusa imalo je optimalan citoreduktivni kirurški zahvat, definiran granicom razdvajanja od 2 cm.



Prema predloženim EORTC-GCG indikatorima kvalitete za primarni citoreduktivni kirurški zahvat (19), prihvatljivim standardom smatra se ukoliko je  $\geq 50\%$  citoreduktivnih operacija završilo kompletnom citoredukcijom, definiranom nepostojanjem makroskopski vidljive ostatne bolesti pri operativnom zahvatu.

Bristow i suradnici (96), na 51 uzorku karcinoma niskog gradusa, zaključuju da je optimalan citoreduktivni zahvat povezan uz bolje ukupno preživljenje te bi trebao biti primarni cilj u liječenju bolesnica s ovim tipom tumora. Medijan ukupnog preživljenja za bolesnice s optimalnom citoredukcijom (ostatni tumor manji od 1 cm) iznosio je 115.4 mjeseci u odnosu na 43.1 mjesec kod bolesnica s ostatnim tumorom većim od 1 cm ( $P < 0.0002$ ). Ova razlika prisutna je i u našem istraživanju, iako je uzorak premali za adekvatnu statističku analizu: medijan ukupnog preživljenja u bolesnica bez ostatnog tumora ili s tumorom manjim od 2 cm iznosio je 81 mjesec (27-158 mjeseci) u odnosu na 30 mjeseci (7-55) kod bolesnica s ostatnim tumorom većim od 2 cm.

Prema našim rezultatima, suboptimalna citoredukcija povećava relativni rizik smrtnog ishoda 2.6 puta ( $P < 0.001$ ), a ostatni tumor se u multinominalnoj analizi potvrdio kao potencijalno nezavisan prediktor smrtnog ishoda, s čime su u skladu i rezultati drugih studija (7, 18, 100).

Unatoč saznanjima o centralnoj ulozi p53 signalnog puta u različitim vrstama tumora, procjena uloge p53 statusa u uzorcima tumora ostaje bez odgovora, uz zbunjujuće i često proturiječne navode u literaturi (50, 102). Dio autora svoje zaključke temelji na molekularnoj analizi p53 statusa (55, 57-59, 67, 103). Određeni broj studija povezuje p53 mutaciju sa lošijim ishodom bolesti (55, 57, 58, 103) i vjerojatnošću kemorezistencije (55). Dvije studije (59, 67) nisu potvrdile ova zapažanja.

Metodološke razlike u interpretaciji rezultata imunohistokemijske analize u različitim istraživanjima doprinose neujednačenim rezultatima (54, 63, 84, 104). U dijelu studija korišten je složeniji semikvantitativni sustav analize koji je uzimao u obzir postotak obojenih jezgara uz intenzitet obojanosti (47, 49, 53, 54, 65, 69, 70, 97, 105-107), dok je dio autora koristio jednostavniji sustav uz granicu razdvajanja od 10% (52, 62-64, 66, 68, 84, 108).

Razlike u imunohistokemijskim protokolima i nedostatak jedinstvenog sustava procjene imunohistokemijskog izražaja, onemogućavaju adekvatnu analizu i usporedbu ovih studija.

Razlika u imunohistokemijskom izražaju p53 proteina u karcinomima niskog i visokog gradusa mogla bi biti dijagnostički korisna (47, 54, 108). Tek nekoliko studija istraživalo je p53 imunohistokemijski izražaj u seroznim karcinomima niskog i visokog gradusa (84, 108). Ove studije su pokazale da postoji značajna razlika u imunohistokemijskom izražaju među tumorima niskog (tip I) i visokog gradusa (tip II) (16.7% vs 53.6% i 18% vs 64%). S tim su u skladu i rezultati ovog istraživanja koji su potvrdili visoki p53 izražaj u grupi karcinoma visokog gradusa (85.7% karcinoma visokog gradusa imalo je pozitivan izražaj p53 proteina). Mutacija p53 gena može biti prisutna u oko 8% seroznih karcinoma niskog gradusa (47). U našem istraživanju, pozitivan izražaj p53 proteina nije zabilježen niti u jednom uzorku seroznih karcinoma niskog gradusa.

Prema studiji Ikede i suradnika (94), imunohistokemijski izražaj p53 proteina nije se pokazao značajnim kao prediktor ukupnog preživljenja. S tim u skladu su i rezultati našeg istraživanja u kojem nismo dokazali da je imunohistokemijski izražaj p53 proteina značajno povezan sa preživljenjem bez povrata bolesti niti s ukupnim preživljenjem. Ovakvi rezultati potvrdili su se i u drugim istraživanjima (59, 65-68). Međutim, prema nekim studijama, pozitivan izražaj p53 proteina vezan je uz lošije preživljenje i kraći period bez povrata bolesti u univarijantnoj analizi (52, 62-64, 105, 109, 110), dok su se u dijelu studija izražaj p53 proteina ili mutacija p53 gena pokazali kao nezavisni prognostički čimbenici ukupnog preživljenja i preživljenja bez znakova bolesti (49, 53, 54, 58, 70, 97, 98, 106, 111).

Unatoč istraživanjima koja podupiru predloženi dualni model karcinogeneze (46, 60, 112, 113), ostaje otvoreno pitanje mogu li se serozni karcinomi visokog gradusa razviti iz seroznih borderline tumora ili seroznih karcinoma niskog gradusa, koji slijede tip I put karcinogeneze (44, 90, 114).

Prema istraživanju Singera i suradnika (47), p53 mutacija je rani događaj kod karcinoma visokog gradusa, dok je kod malog broja karcinoma niskog gradusa, koji imaju p53 mutaciju, ova mutacija kasni događaj uključen u tumorsku progresiju.

Također, još uvijek ne postoji siguran dokaz da se svi serozni karcinomi niskog gradusa razvijaju adenom-karcinom slijedom. Veća učestalost BRAF mutacije u seroznim borderline tumorima u usporedbi sa seroznim karcinomima niskog gradusa, uz činjenicu da se KRAS i BRAF mutacija međusobno isključuju, otvara mogućnost da dio seroznih karcinoma niskog gradusa ne nastaje ovim slijedom (61, 115).

Osim prikaza sporadičnih slučajeva (116, 117), ova problematika do sada je proučavana samo u nekoliko studija na malom broju uzoraka (118, 119). Ove studije su pokazale da, u rijetkim slučajevima, serozni karcinomi niskog i visokog gradusa mogu biti prisutni istovremeno te da karcinomi visokog gradusa mogu dijeliti sličan genetski profil s karcinomima niskog gradusa. Prema istraživanju Boyda i McCluggagea (118), istovremena prisutnost seroznog karcinoma niskog i visokog gradusa ili nediferenciranog karcinoma, može predstavljati dediferencijaciju, a dodatna p53 mutacija može biti razlog transformacije seroznih karcinoma niskog gradusa u serozne karcinome visokog gradusa.

Za razliku od seroznih karcinoma visokog gradusa (prototip karcinoma tipa II) koji su karakterizirani mutacijom p53 i BRCA1 gena uz naznačenu kromosomsku i molekularnu nestabilnost, osnovna molekularna osobitost seroznih karcinoma niskog gradusa (prototip karcinoma tipa I) je poremećaj RAS/RAF/MEK/MAPK(ERK) signalnog puta (61, 90, 115). Stoga smo na našem uzorku istražili postoji li različit imunohistokemijski izražaj aktivirane MAPK u skupini seroznih karcinoma niskog i visokog gradusa.

Aktivirana MAPK posreduje u prijenosu signala sa stanične površine u jezgru gdje biva inaktivirana defosforilacijom (120), što se odražava i u raspodjeli imunohistokemijskog bojanja. U ovom istraživanju, svi MAPK pozitivni uzorci pokazali su nuklearnu i citoplazmatsku raspodjelu, što je u skladu s prijašnjim istraživanjima (77, 121).

Iako je objavljeno dosta studija o ulozi MAPK signalnog puta u regulaciji staničnog ciklusa (71, 72, 75) i karcinogenezi (76, 122, 123), imunohistokemijski izražaj aktivirane MAPK u seroznim karcinomima do sada je analiziran samo u dvije studije (77, 78). Hsu i suradnici (77), prikazali su različitu učestalost aktivirane MAPK u karcinomima niskog (81%) u odnosu na visoki gradus (41%). Razlika je prisutna i u našem istraživanju gdje je 63.3% karcinoma niskog gradusa i samo 17.1% karcinoma visokog gradusa imalo pozitivan imunohistokemijski izražaj MAPK proteina ( $P=0.003$ ). Autori iz gore navedene studije navode da nisu našli povezanost MAPK izražaja s kliničkim stadijem niti sa kemorezistencijom, što smo potvrdili i u rezultatima našeg istraživanja ( $P=0.217$ ;  $P=0.972$ ).

Analizom preživljenja, prikazali smo da bolesnice sa MAPK pozitivnim tumorom imaju značajno duži period slobodnog intervala bez povrata bolesti ( $P=0.0135$ ) te da je relativni rizik za povrat bolesti u bolesnica s MAPK negativnim tumorom 5 puta veći u odnosu na MAPK pozitivne tumore ( $P=0.027$ ). Multinomialnom analizom, MAPK se potvrdio kao potencijalno nezavisan prediktor slobodnog intervala bez povrata bolesti. Ova značajnost izgubila se u analizi ukupnog preživljenja ( $P=0.345$ ). Hsu i suradnici (77) prikazali su značajnu razliku u ukupnom preživljenju u odnosu na izražaj aktivirane MAPK samo na razini dvogodišnjeg preživljenja.

Rezultati studije, u kojoj se analizirala MAPK (p-ERK) aktivnost na 24 uzorka svježe smrznutih stanica seroznog karcinoma jajnika iz ascitesa, upućuju na bolje ukupno preživljenje bolesnica s pozitivnim izražajem ( $P=0.014$ ) (78).

Istraživanje smo nadopunili KRAS i BRAF mutacijskom analizom. Usporedili smo KRAS/BRAF mutacijski status s imunohistokemijskim izražajem aktivirane MAPK, što je do sada napravljeno u samo jednoj studiji (77).

KRAS mutacija značajno je češća u seroznim karcinomima niskog gradusa koji slijede tip I put karcinogeneze (45, 61, 115). U našem istraživanju, učestalost KRAS mutacije odgovara navodima u literaturi (44), prema kojoj KRAS/ BRAF mutacija može biti prisutna u dvije trećine ovih tumora. 54.5% seroznih karcinoma niskog gradusa te 13% karcinoma visokog gradusa imalo je KRAS mutaciju.

Niti jedan uzorak iz našeg istraživanja nije imao BRAF mutaciju, što je u skladu s istraživanjima drugih autora. U studiji Wong-a i suradnika (124) te Grishama i suradnika (125), BRAF mutacija bila je prisutna u 2% odnosno 5.3% seroznih karcinoma niskog gradusa. Autori navode da bi ova mutacija, zbog više učestalosti u seroznim borderline tumorima (28% do 48%) u odnosu na serozne karcinome niskog gradusa, mogla imati ulogu povoljnog prognostičkog biomarkera. Prema Grishamu i suradnicima (125), BRAF mutacija bi izdvojila bolesnice sa seroznim borderline tumorom kod kojih se ne očekuje progresija u serozni karcinom niskog gradusa.

Hsu i suradnici (77) nisu zabilježili niti jedan slučaj KRAS ili BRAF mutacije u skupini karcinoma visokog gradusa. Prema Romeru i suradnicima (61), KRAS mutacija može se naći u 0% do 14% seroznih karcinoma visokog gradusa. U našem istraživanju, KRAS mutacija bila je prisutna u 13% seroznih karcinoma visokog gradusa.

Kod sedam uzoraka karcinoma koji su morfološki odgovarali karcinomima visokog gradusa, zabilježili smo i mutaciju KRAS gena koja je obilježje puta karcinogeneze tip I i pozitivan imunohistokemijski izražaj p53 proteina, obilježje puta karcinogeneze tip II. Slična opažanja do sada su zabilježena u još dvije studije (118, 119), Iako je i u našoj studiji, kao i u preostale dvije studije, mali broj uzoraka u kojima je primijećeno morfološko, imunohistokemijsko i molekularno preklapanje između seroznih karcinoma niskog i visokog gradusa, ovi rezultati govore u prilog mogućem postojanju prelaska tumora tipa I u tip II, vjerojatno kroz dodatno sticanje p53 mutacije.

Prema rezultatima našeg istraživanja, pozitivan MAPK izražaj bio je prisutan u nekim uzorcima seroznih karcinoma niskog i visokog gradusa koji su bili negativni na KRAS mutaciju (dva od pet uzoraka niskog gradusa i 11 od 54 uzorka visokog gradusa), što govori u prilog činjenici da aktivacija MAPK signalnog puta nije isključivo vezana uz KRAS mutaciju. Slične rezultate prikazali su Hsu i suradnici (77) koji su zabilježili MAPK pozitivnost uz KRAS/BRAF negativnu mutaciju u pet od devet seroznih karcinoma niskog gradusa i u 9 od 25 karcinoma visokog gradusa.

Hsu i suradnici (77) navode da je imunohistokemijski izražaj aktivirane MAPK dovoljno osjetljiv i specifičan da predvidi KRAS mutaciju, što je u suprotnosti s rezultatima našeg istraživanja. Prema našim rezultatima, imunohistokemijski MAPK izražaj nije dovoljno osjetljiv (0.43) niti specifičan (0.78), iako je dovoljno pouzdan (0.85) da isključi KRAS mutaciju u slučaju negativnog imunohistokemijskog MAPK izražaja.

Topoizomeraza II $\alpha$  pokazala se kao pouzdan indikator stanične proliferacije u nekim vrstama tumora kao što su vulvarne skvamozne lezije (126), oralne skvamozne lezije (127) te astrocitom (128). Imunohistokemijski izražaj topoizomeraze II $\alpha$  u karcinomima jajnika analiziran je u malom broju studija, a njihove rezultate nemoguće je usporediti prvenstveno zbog različite metodologije i upotrebe različitih vrijednosti razgraničenja u određivanju visokog i niskog topo II $\alpha$  izražaja, što je osnovni nedostatak dosadašnjih studija (79, 81, 86, 87, 129).

Prema našim saznanjima, potencijalna razlika u topoizomeraza II $\alpha$  ispoljenosti unutar grupe seroznih tumora niskog i visokog gradusa u odnosu na predloženi model ovarijalne karcinogeneze te njezina potencijalna prognostička vrijednost, do sada nije istraživana. Prema našim rezultatima, prisutna je statistički značajna razlika u imunohistokemijskom topo II $\alpha$  izražaju između skupine seroznih karcinoma niskog i visokog gradusa ( $P=0.001$ ). Pozitivan izražaj topo II $\alpha$  proteina prisutan je kod 81.4% karcinoma visokog gradusa, a omjer izgleda za negativan imunohistokemijski izražaj 6.45 puta je veći u skupini karcinoma niskog gradusa ( $P=0.002$ ), čime smo potvrdili značajnost ovog markera u razdvajanju ove dvije skupine tumora.

Rezultati studija, u kojima je analizirana imunohistokemijska razina topo II $\alpha$  izražaja, upućuju da je porast razine ovog proteina uglavnom vezan uz mitotsku aktivnost, gradus tumora te viši FIGO stadij bolesti, ali i da može biti odraz agresivnijeg fenotipa tumora bez obzira na stadij bolesti (79, 85, 87). Dio rezultata je u skladu s našim istraživanjem: pozitivan imunohistokemijski topo II $\alpha$  izražaj vezan je uz visoki gradus tumora ( $P=0.002$ ), međutim nismo dobili značajnu razliku u izražaju topo II $\alpha$  proteina u odnosu na klinički stadij bolesti.

Visoki imunohistokemijski izražaj topoII $\alpha$  pokazao se prediktorom kraćeg ukupnog preživljenja kod bolesnika s karcinomom pluća ne-malih stanica (88). Tri studije proučavale su prognostičku ulogu imunohistokemijskog izražaja topoII proteina u karcinomima jajnika (79, 86, 87), uz različite granice razdvajanja. Prema dvijema studijama Brustmann-a (79, 87), zabilježen je statistički značajan utjecaj imunohistokemijskog izražaja topo II $\alpha$  proteina na preživljenje ( $P=0.0182$ ;  $P=0.0011$ ). Uz vrijednost razgraničenja od 10%, u ovoj studiji nije pronađena povezanost topoizomeraze II $\alpha$  sa ukupnim preživljenjem niti preživljenjem bez povrata bolesti. U budućim istraživanjima potrebno je ujednačiti metodologiju i definirati granice razdvajanja, što bi omogućilo donošenje zaključaka primjenjivih u kliničkoj praksi.

Morfološka razlika između seroznog karcinoma niskog i visokog gradusa može ponekad predstavljati diferencijalno dijagnostički problem. Ponekad serozni karcinom može arhitekturno oponašati karcinom niskog gradusa, a dio njih može imati gradus 2 nuklearnu atipiju po Silverbergu, pri čemu je potrebno napomenuti da je procjena stupnja nuklearne atipije podložna subjektivnoj procjeni patologa. S obzirom na rezultate naše analize, morfološki problematični serozni karcinomi s pozitivnim topo II $\alpha$  i p53 imunohistokemijskim izražajem vjerojatnije slijede tip II put karcinogeneze, stoga ovi markeri mogu (pored nuklearne atipije i broja mitozu) biti koristan dodatni alat u razlikovanju karcinoma niskog gradusa (tip I) od onih visokog gradusa (tip II).

Trenutno ne postoje rutinski dijagnostički testovi uz koje bi se mogao predvidjeti odgovor na određene kemoterapijske protokole.

Posljednja tri desetljeća, radikalno kirurško odstranjenje tumora nakon kojeg slijedi kemoterapija temeljena na platini i taksanima predstavlja standard u terapiji karcinoma jajnika. Unatoč visokoj stopi odgovora na inicijalno liječenje, učinak je ograničen razvojem kemorezistencije (130).

Prema rezultatima našeg istraživanja, klinički odgovor na prvu liniju kemoterapije (CBR) imalo je 74% bolesnica u stadiju III i IV, uz medijan ukupnog preživljenja od 42 mjeseca (10-162) i medijan preživljenja bez povrata bolesti od 20.5 mjeseci, što je u skladu s dostupnom literaturom (7, 131). Kod bolesnica s kliničkim odgovorom na terapiju, medijan preživljenja bez progresije bolesti (PFS) bio je 5 mjeseci (2-28 mjeseca).

Uz manji volumen ostatnog tumora djelotvornost kemoterapije je veća (101), što potvrđuju i rezultati našeg istraživanja. Analizirajući povezanost ostatnog tumora s odgovorom na prvu liniju kemoterapije, nađena je statistički značajna razlika u bolesnica s optimalnom u odnosu na bolesnice sa suboptimalnom citoredukcijom ( $P < 0.001$ ).

U ovom istraživanju nismo dokazali statistički značajnu povezanost imunohistokemijskih varijabli (p53 proteina, MAPK i topo II $\alpha$ ) s osjetljivošću tumora na primijenjenu kemoterapiju.

Prema rezultatima dviju studija, mutacija p53 gena učestalija je u bolesnica koje ne postižu kompletan odgovor na kemoterapiju (83% nasuprot 16%). Autori navode da p53 genski status utječe na osjetljivost tumora na cisplatinu, dok nema utjecaja na osjetljivost tumora na taksane (130, 132). Ovakva zapažanja potvrđena su u još nekoliko studija (54, 55, 133). Do jednakih saznanja došli su Gadducci i suradnici (134), koji navode da taksani potiču apoptozu signalnim putem koji ne uključuje p53 gen. Prema autorima, kod bolesnica koje imaju tumor s prisutnom mutacijom p53 gena manja je vjerojatnost da će postići kompletan odgovor na standardnu terapiju, a određivanje p53 mutacijskog statusa može biti koristan prediktor odgovora na liječenje. U drugoj studiji istih autora (135) opisan je jasan trend prema boljem odgovoru na kemoterapiju, dužem periodu bez progresije bolesti i ukupnom preživljenju bolesnica sa seroznim karcinomom jajnika i "divljim" tipom p53 gena.



Rezultati našeg istraživanja nisu u skladu s ovim studijama. 22/30 (73%) bolesnica u našem istraživanju imale su kompletan odgovor na terapiju i pozitivan imunohistokemijski izražaj p53 proteina. Slične rezultate prikazali su Lavarino i suradnici (136), Hashiguchi i suradnici (65), Mano i suradnici (137) te Yakirevich i suradnici (68), u čijim studijama izražaj p53 proteina nije vezan uz odgovor na kemoterapiju. U istraživanju Wonga i suradnika (138), čini se da bolesnice sa nepromijenjenim p53 genom, iako je on rijedak u karcinomima visokog gradusa, imaju lošije ukupno preživljenje uz veći stupanj kemorezistencije u odnosu na bolesnice s mutiranim p53 genom.

Uloga standardne kemoterapije u liječenju seroznih karcinoma niskog gradusa je dvojbena. U ovom trenutku ne postoji specifičan način liječenja za serozne karcinome niskog i visokog gradusa, jer protokoli standardnog liječenja ne razlikuju ove dvije grupe tumora. Prema istraživanju Gershensona i sur., temeljenom na analizi 112 uzoraka bolesnica sa seroznim karcinomom niskog gradusa i proširenom bolesti, autori zaključuju da su serozni tumori niskog gradusa manje osjetljivi na standardno liječenje od seroznih karcinoma visokog gradusa (139). Iako se prema radovima još nekoliko autora (140-143) smatra da su tip I tumori rezistentniji na uobičajeno liječenje (platina/taksani), broj uzoraka ove skupine tumora u našem istraživanju premali je da bismo mogli izvući vjerodostojne zaključke.

Preklinička istraživanja biološkog profila seroznih karcinoma niskog gradusa (144) te istraživanja na transgenim mišjim modelima i kulturama epitelnih stanica jajovoda (145) imaju za cilj bolje razumijevanje patogeneze seroznih karcinoma, što vodi prema racionalnom istraživanju novih ciljanih lijekova. Istraživanja koja govore u prilog visokoj učestalosti KRAS/BRAF mutacije u karcinomima niskog gradusa čine ovaj put karcinogeneze atraktivnom metom (74, 146-149).

MAPK signalni put ima važnu ulogu ne samo u karcinogenezi nego i u odgovoru tumora na liječenje (123). Pokazao se potencijalnim prognostičkim čimbenikom kod ne-malih karcinoma pluća (121) i dojke (150). Ovaj signalni put je moguće uključen u rezistenciju na tamoxifen, doxorubicin i paclitaxel, u karcinomima dojke (151).

Prema rezultatima našeg istraživanja, karcinomi s negativnim izražajem MAPK proteina i potpunim odgovorom na prvu liniju kemoterapije imaju kraći period bez povrata bolesti u odnosu na one s pozitivnim izražajem MAPK proteina. U dostupnoj literaturi nismo mogli naći objašnjenje za ovaj trend. Ono što smo uočili u ovom istraživanju je da su svi MAPK pozitivni tumori iz skupine bolesnica kliničkog stadija III i IV, koje su dobile kemoterapiju, ujedno imali negativan imunohistokemijski izražaj p53 proteina. Daljnja istraživanja uz uključivanje većeg broja bolesnica potrebna su da bismo mogli donijeti vjerodostojne zaključke primjenjive u kliničkoj praksi.

Nedavno su objavljeni preliminarni rezultati faze II kliničkog istraživanja AZD6244 (selumetinib) iz skupine MEK inhibitora koji su obećavajući (29). U skladu s ovim rezultatima bilo bi zanimljivo u budućim studijama procijeniti vrijednost imunohistokemijskog određivanja razine MAPK proteina u procjeni odgovora na liječenje selumetinibom.

Topoizomeraza II $\alpha$  potencijalna je meta za ciljanu terapiju topo II inhibitorima. Uloga ovih inhibitora u karcinomima jajnika ostaje nejasna. Dingemans i suradnici (85) nisu našli nedvojbenu povezanost aktivnosti topo II gena i kliničke rezistencije na terapiju. Međutim, prema studiji Koshiyame i suradnika (152), topo II $\alpha$  indeks tumora odraz je njegove kemosenzitivnosti na lijekove koji djeluju na topo II gen. Njegov indeks u jajnicima značajno korelira sa in vitro inhibicijom tumorskog rasta, za doxorubicin i etopozid. Visoki izražaj topoII $\alpha$  proteina moguć je indikator osjetljivosti na topoII inhibitore, pri čemu bi se izdvojila skupina bolesnica koje bi mogle imati korist od individualnog pristupa terapiji.

Prema rezultatima jedne studije (86), pozitivan topo II $\alpha$  izražaj ima prediktivno značenje u ukupnom preživljenju bolesnica liječenih standardnom terapijom na bazi platine. Rezultati našeg istraživanja ne mogu potvrditi ova zapažanja; imunohistokemijski izražaj topo II $\alpha$  proteina nije se pokazao značajnim kao prediktor odgovora na standardnu terapiju.

Razdvajanje seroznih karcinoma jajnika u dvije skupine koje se osim po morfologiji razlikuju i po mehanizmu nastanka, molekularnim osobitostima, prekursorskim lezijama te biološkom tijeku, što je potvrđeno i u ovoj studiji, u budućnosti bi trebalo utjecati na potencijalne metode prevencije i probira uz različit pristup liječenju bolesnica sa seroznim karcinoma jajnika niskog i visokog gradusa.

## 6. ZAKLJUČCI:

1. Serozni karcinomi niskog gradusa (tip I tumori) i visokog gradusa (tip II tumori) statistički se značajno razlikuju prema imunohistokemijskom izražaju p53 proteina ( $P < 0.001$ ), MAPK ( $P = 0.003$ ), i topoizomeraze II $\alpha$  ( $P = 0.001$ ), te se imunohistokemijsko bojanje na navedene biljege može koristiti u razdvajanju morfološki dvojbjenih uzoraka.
2. Mutacija KRAS gena nađena je u 54.5% karcinoma niskog gradusa i u samo 13.8% karcinoma visokog gradusa ( $P = 0.006$ ). BRAF mutacija nije nađena ni u jednom uzorku. Pozitivna imunohistokemijska reakcija na p53 protein nađena je u 85.7% karcinoma visokog gradusa i ni u jednom karcinomu niskog gradusa.
3. Pozitivan MAPK izražaj bio je prisutan u dva od pet uzoraka niskog gradusa i u 11 od 54 uzorka visokog gradusa koji su bili negativni na KRAS mutaciju, što govori u prilog činjenici da aktivacija MAPK signalnog puta nije isključivo vezana uz KRAS mutaciju.
4. Imunohistokemijsko određivanje MAPK izražaja dovoljno je pouzdano (0.85) da isključi KRAS mutaciju u slučaju negativnog imunohistokemijskog MAPK izražaja.
5. Kod sedam (11.7%) uzoraka karcinoma, koji su morfološki odgovarali karcinomima visokog gradusa, zabilježili smo i mutaciju KRAS gena koja je obilježje puta karcinogeneze tip I i pozitivan imunohistokemijski izražaj p53 proteina, obilježje puta karcinogeneze tip II. U pet od sedam ovih uzoraka nađeni su i morfološki dijelovi koji odgovaraju seroznom borderline tumoru i/ili seroznom karcinomu niskog gradusa. Prema rezultatima ove studije, postoje morfološka, imunohistokemijska i molekularna prekapanja koja upućuju na mogućnost transformacije karcinoma niskog gradusa u karcinome visokog gradusa, vjerojatno potaknuta mutacijom p53 gena.

6. Prema rezultatima uninominalne analize, klinički stadij bolesti ( $P=0.007$ ) i pozitivan imunohistokemijski izražaj MAPK proteina ( $P=0.027$ ) vezani su uz duži slobodni interval bez bolesti (DSF), dok su dob bolesnica iznad 60 godina ( $P=0.044$ ), veličina ostatnog tumora ( $P<0.001$ ), nalaz vaskularne invazije ( $P=0.002$ ), viši gradus tumora ( $P=0.025$ ) te klinički stadij III-IV ( $P=0.010$ ) povezani s kraćim ukupnim preživljenjem (OS).
7. Prema rezultatima multinominalne analize, ostatni tumor ( $P<0.001$ ) i vaskularna invazija ( $P=0.084$ ) nezavisni su predskazatelji kraćeg preživljenja bolesnica sa seroznim karcinomom jajnika, dok su se klinički stadij bolesti ( $P=0.004$ ) i pozitivan imunohistokemijski izražaj MAPK proteina ( $P=0.077$ ) potvrdili kao nezavisni predskazatelji slobodnog intervala bez povrata bolesti.
8. Imunohistokemijski izražaj p53 proteina, MAPK i topoizomeraze II $\alpha$  nije povezan s odgovorom na kemoterapiju temeljenu na platini.
9. Ostatna bolest povezana je s potpunim ( $P<0.001$ ), objektivnim ( $P<0.001$ ) i kliničkim odgovorom na prvu liniju kemoterapije ( $P=0.003$ ) odnosno s dužinom vremena do progresije bolesti ( $P=0.002$ ) u bolesnica s djelomičnim odgovorom ili stabilnom bolesti nakon prve linije kemoterapije.
10. Bolesnice sa MAPK negativnim karcinomom i potpunim odgovorom na prvu liniju kemoterapije imaju kraće vrijeme do pojave recidiva bolesti, na nivou značajnosti od 94% ( $P=0.060$ ).

## 7. SAŽETAK

**Cilj istraživanja.** Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi razinu imunohistokemijske ispoljenosti p53 proteina, MAPK i topoizomeraze II $\alpha$  u seroznim karcinomima jajnika niskog i visokog gradusa, te utvrditi njihovu povezanost sa kliničko-patološkim prognostičkim pokazateljima, dužinom slobodnog intervala bez bolesti i ukupnim preživljenjem te odgovorom na kemoterapiju.

**Materijali i metode.** U istraživanje je uključena 81 bolesnica sa seroznim karcinomom jajnika, operirana u razdoblju od 1995. do 2005. godine. Uzorci tumora bojani su imunohistokemijski primjenom protutijela za p53, MAPK i topo II $\alpha$ . Učinjena je i KRAS/BRAF mutacijska analiza na uzorcima 73 tumora.

**Rezultati.** Deset bolesnica (12.3%) dijagnosticirano je u ranom kliničkom stadiju bolesti. Od 81 seroznog karcinoma, 13.6% morfološki je odgovaralo karcinomu niskog gradusa (tip I tumori), a 86.4% karcinomu visokog gradusa (tip II tumori). Serozni karcinomi niskog i visokog gradusa statistički se značajno razlikuju prema imunohistokemijskom izražaju p53 proteina ( $P < 0.001$ ), MAPK ( $P = 0.003$ ), i topoizomeraze II $\alpha$  ( $P = 0.001$ ). Pozitivna imunohistokemijska reakcija na p53 protein nađena u 85.7% karcinoma visokog gradusa i u niti jednom karcinomu niskog gradusa. Mutacija KRAS gena nađena je u 54.5% karcinoma niskog gradusa i u samo 13.8% karcinoma visokog gradusa ( $P = 0.006$ ). BRAF mutacija nije nađena ni u jednom uzorku. Pozitivan MAPK izražaj bio je prisutan u dva od pet uzoraka niskog gradusa i u 11 od 54 uzorka visokog gradusa koji su bili negativni na KRAS mutaciju, što govori u prilog činjenici da aktivacija MAPK signalnog puta nije isključivo vezana uz KRAS mutaciju. Kod sedam (11.7%) uzoraka karcinoma koji su morfološki odgovarali karcinomima visokog gradusa, zabilježili smo i mutaciju KRAS gena koja je obilježje puta karcinogeneze tip I i pozitivan imunohistokemijski izražaj p53 proteina, obilježje puta karcinogeneze tip II. U pet od sedam ovih uzoraka nađeni su i morfološki dijelovi koji odgovaraju seroznom borderline tumoru i/ili seroznom karcinomu niskog gradusa.

Prema rezultatima uninominalne analize, klinički stadij bolesti ( $P=0.007$ ) i pozitivan imunohistokemijski izražaj MAPK proteina ( $P=0.027$ ) vezani su uz duži slobodni interval bez bolesti (DSF), dok su dob bolesnica iznad 60 godina ( $P=0.044$ ), veličina ostatnog tumora ( $P<0.001$ ), nalaz vaskularne invazije ( $P=0.002$ ), viši gradus tumora ( $P=0.025$ ) te klinički stadij III-IV ( $P=0.010$ ) povezani s kraćim ukupnim preživljenjem (OS). Prema rezultatima multinominalne analize, ostatni tumor ( $P<0.001$ ) i vaskularna invazija ( $P=0.084$ ) nezavisni su predskazatelji kraćeg preživljenja bolesnica sa seroznim karcinomom jajnika, dok su se klinički stadij bolesti ( $P=0.004$ ) i pozitivan imunohistokemijski izražaj MAPK proteina ( $P=0.077$ ) potvrdili kao nezavisni predskazatelji slobodnog intervala bez povrata bolesti. Imunohistokemijski izražaj p53 proteina, MAPK i topoizomeraze II $\alpha$  nije povezan s odgovorom na kemoterapiju temeljenu na platini. Bolesnice sa MAPK negativnim karcinomom i potpunim odgovorom na prvu liniju kemoterapije imaju kraće vrijeme do pojave recidiva bolesti ( $P=0.060$ ).

**Zaključak:** Iako je istraživanje ograničeno malim brojem seroznih karcinoma niskog gradusa, dokazali smo da se karcinomi niskog i visokog gradusa značajno razlikuju prema imunohistokemijskom izražaju p53 proteina, MAPK, i topoizomeraze II $\alpha$  te se imunohistokemijsko bojanje na navedene biljege može koristiti u razdvajanju morfološki dvojbjenih uzoraka. Postoje morfološka, imunohistokemijska i molekularna prekapanja između ove dvije skupine karcinoma, koja upućuju na mogućnost transformacije karcinoma niskog gradusa u karcinome visokog gradusa, vjerojatno potaknuta mutacijom p53 gena. Razdvajanje seroznih karcinoma jajnika u dvije grupe u budućnosti bi trebalo utjecati na potencijalne metode prevencije i probira, uz različit pristup liječenju bolesnica sa seroznim karcinoma jajnika niskog i visokog gradusa.

## 8. SUMMARY

**Background:** The aim of this study was to assess the immunohistochemical expression of p53, MAPK and topoisomerase II alpha in ovarian serous carcinomas (OSCs), and their relation with clinicopathological prognostic factors, disease free and overall survival and chemotherapy response.

**Methods:** The study included 81 patients with OSCs who underwent surgery between 1995 and 2005. Formalin fixed paraffin embedded tumour sections were reviewed and examined immunohistochemically using antibodies against p53, MAPK and topoII alpha. KRAS and BRAF mutational analysis was performed on 73 available microdissected samples.

**Results:** Ten patients (12.3%) were diagnosed in early stage of disease. Of 81 cases of OSCs, 13.6% were of low-grade (Type I) and 86.4% were of high-grade (Type II) morphology. We have found statistically significant differences in the immunohistochemical expression of p53 ( $P<0.001$ ), MAPK ( $P=0.003$ ) and topo II $\alpha$  ( $P=0.001$ ) between these two groups. In the high-grade group, 85.7% of cases showed positive p53 immunoexpression, but none of the low-grade samples was p53 positive. KRAS mutation was found in 54.5% of low-grade and 13.8% of high-grade OSCs ( $P=0.006$ ). None of the samples had BRAF mutation. MAPK positivity showed two of five low-grade carcinomas and 11 of 54 high-grade carcinomas with wild-type KRAS, suggesting that activation of MAPK pathway is not ultimately related to KRAS mutation. We identified seven (11.7%) high-grade samples that showed both KRAS mutation, which is a hallmark of Type I pathway of carcinogenesis, and p53 immunopositivity, which is a hallmark of Type II pathway. In five of seven high-grade samples we have found elements of serous borderline tumour and/or low-grade serous carcinoma. On univariate analysis, early FIGO stage ( $P=0.007$ ) and positive MAPK immunoexpression ( $P=0.027$ ) were significantly associated with longer disease free survival (DFS), while age over 60 ( $P=0.044$ ), residual disease ( $P<0.001$ ), vascular invasion ( $P=0.002$ ), high-grade morphology ( $P=0.025$ ) and FIGO stage III-IV ( $P=0.010$ ) were related to significantly shorter overall survival (OS).



Multinomial analysis revealed that residual disease ( $P<0.001$ ) and vascular invasion ( $P=0.084$ ) were independent predictors of shorter survival, while early FIGO stage ( $P=0.004$ ) and positive MAPK immunoexpression ( $P=0.077$ ) were independent predictors of disease free survival. Positive p53, MAPK and topo II $\alpha$  immunoexpression was not associated with response to platinum-based chemotherapy. Patients with MAPK negative carcinomas and complete response to first-line chemotherapy have significantly shorter disease free interval ( $P=0.060$ ).

**Conclusions:** Although this study is limited by its humble number of low-grade samples, we have found statistically significant differences in the immunohistochemical expression of p53, MAPK and topo II $\alpha$  between low-grade and high-grade carcinomas, therefore immunohistochemical staining with these markers could be a useful additional tool in distinguishing morphologically questionable samples. There are morphological, immunohistochemical and molecular overlaps between these two groups, which indicate the possibility of transformation of low-grade into high-grade carcinomas, probably triggered by p53 gene mutation. Separation of ovarian serous carcinomas in two groups in the future should influence the potential methods of prevention and screening, with a different approach to treatment of patients with low-grade and high-grade serous carcinomas.

## 9. LITERATURA

1. Li J, Fadare O, Xiang L, Kong B, Zheng W. Ovarian serous carcinoma: recent concepts on its origin and carcinogenesis. *J Hematol Oncol* 2012;5:8.
2. Berek JS, Crum C, Friedlander M. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynaecol Obstet* 2012;119:118-29.
3. Seidman JD, Cho, K.R., Ronnett, B.M. i sur. *Surface Epithelial Tumors of the Ovary*. U: Kurman RJ, Hedrick Ellenson L, Ronnett BM. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract* (6<sup>th</sup> ed.). New York: Springer;2011, str.680-735.
4. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Incidencija raka u Hrvatskoj 2011. Bilten br.36.
5. Hennessy BT, Coleman RL, Markman M. Ovarian cancer. *Lancet* 2009;374:1371-82.
6. King MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 2003;302:643-6.
7. Kim A, Ueda Y, Naka T, Enomoto T. Therapeutic strategies in epithelial ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2012;31:14.
8. Khan MM, Khan A, Nojima M i sur. Ovarian cancer mortality among women aged 40-79 years in relation to reproductive factors and body mass index: latest evidence from the Japan Collaborative Cohort study. *J Gynecol Oncol* 2013;24:249-57.
9. Schlumbrecht MP, Sun CC, Wong KN, Broaddus RR, Gershenson DM, Bodurka DC. Clinicodemographic factors influencing outcomes in patients with low-grade serous ovarian carcinoma. *Cancer* 2011;117:3741-9.
10. Tavassoli FA, Devilee P, ur. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon: IARC Press; 2003, str.117-45.
11. Lurie G, Thompson PJ, McDuffie KE, Carney ME, Goodman MT. Prediagnostic symptoms of ovarian carcinoma: a case-control study. *Gynecol Oncol* 2009;114:231-6.
12. SEER Stat Fact Sheets: Ovary. <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>. Assessed on: 22.10.2013.

13. Rapkiewicz AV, Espina V, Petricoin EF, 3rd, Liotta LA. Biomarkers of ovarian tumours. *Eur J Cancer* 2004;40:2604-12.
14. Pavlik EJ, van Nagell JR, Jr. Early detection of ovarian tumors using ultrasound. *Womens Health* 2013;9:39-57.
15. Reade CJ, Riva JJ, Busse JW, Goldsmith CH, Elit L. Risks and benefits of screening asymptomatic women for ovarian cancer: A systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol* 2013;130:674-81.
16. Matković V, Haller H, Vrdoljak E i sur. Kliničke upute za dijagnostiku, liječenje i praćenje bolesnica oboljelih od raka jajnika Hrvatskog onkološkog društva i Hrvatskog društva za ginekologiju i opstetriciju Hrvatskog liječničkog zbora te Hrvatskog ginekološkoonkološkog društva. *Liječ Vijesn* 2013;135:235-41.
17. Petru E, Luck HJ, Stuart G, Gaffney D, Millan D, Vergote I. Gynecologic Cancer Intergroup (GCIG) proposals for changes of the current FIGO staging system. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;143:69-74.
18. Vergote I, Trope CG, Amant F i sur. Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIC or IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 2010;363:943-53.
19. Verleye L, Ottevanger PB, van der Graaf W, Reed NS, Vergote I. EORTC-GCG process quality indicators for ovarian cancer surgery. *Eur J Cancer* 2009;45:517-26.
20. Ramirez I, Chon HS, Apte SM. The role of surgery in the management of epithelial ovarian cancer. *Cancer Control* 2011;18:22-30.
21. van de Laar R, Zusterzeel PL, Van Gorp T, Ottevanger PB, Massuger LF, Kruitwagen RF. The role of surgery in the management of patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: Survey among Dutch gynecologists and medical oncologists. *Gynecol Oncol* 2013; doi:10.1016/j.ygyno.2013.09.016.
22. Trimbos JB, Parmar M, Vergote I i sur. International Collaborative Ovarian Neoplasm trial 1 and Adjuvant ChemoTherapy In Ovarian Neoplasm trial: two parallel randomized phase III trials of adjuvant chemotherapy in patients with early-stage ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:105-12.
23. Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L i sur. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N Engl J Med* 2006;354:34-43.

24. Bookman MA. First-line chemotherapy in epithelial ovarian cancer. *Clin Obstet Gynecol* 2012;55:96-113.
25. Noguera IR, Sun CC, Broaddus RR i sur. Phase II trial of imatinib mesylate in patients with recurrent platinum- and taxane-resistant low-grade serous carcinoma of the ovary, peritoneum, or fallopian tube. *Gynecol Oncol* 2012;125:640-5.
26. Tillmanns TD, Lowe MP, Walker MS, Stepanski EJ, Schwartzberg LS. Phase II clinical trial of bevacizumab with albumin-bound paclitaxel in patients with recurrent, platinum-resistant primary epithelial ovarian or primary peritoneal carcinoma. *Gynecol Oncol* 2013;128:221-8.
27. Wenham RM, Lapolla J, Lin HY i sur. A phase II trial of docetaxel and bevacizumab in recurrent ovarian cancer within 12 months of prior platinum-based chemotherapy. *Gynecol Oncol* 2013;130:19-24.
28. del Carmen MG, Micha J, Small L, Street DG, Londhe A, McGowan T. A phase II clinical trial of pegylated liposomal doxorubicin and carboplatin plus bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer. *Gynecol Oncol* 2012;126:369-74.
29. Farley J, Brady WE, Vathipadiekal V i sur. Selumetinib in women with recurrent low-grade serous carcinoma of the ovary or peritoneum: an open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2013;14:134-40.
30. Kuhn E, Kurman RJ, Shih IM. Ovarian Cancer Is an Imported Disease: Fact or Fiction? *Curr Obstet Gynecol Rep* 2012;1:1-9.
31. Damjanov I. Ovarij (jajnik). U: Jukić i sur. *Patologija ženskog spolnog sustava* (3. izd.). Zagreb: AGM; 1999, str. 178-95.
32. Roh MH, Yassin Y, Miron A i sur. High-grade fimbrial-ovarian carcinomas are unified by altered p53, PTEN and PAX2 expression. *Mod Pathol* 2010;23:1316-24.
33. Li J, Abushahin N, Pang S i sur. Tubal origin of 'ovarian' low-grade serous carcinoma. *Mod Pathol* 2011;24:1488-99.
34. Xuyin Z, Jingxin D, Xiang T, Luoqi J, Keqin H. Biomarker expression in normal fimbriae: Comparison of high- and low-grade serous ovarian carcinoma. *Oncol Lett* 2012;4:1008-12.

35. Fukumura Y, Masaoka A, Naito T, Kimura M, Yao T. A case of non-invasive serous adenocarcinoma at unilateral fimbria with spread to the peritoneal/uterine cavity: case report. *Diagn Pathol* 2009;4:43.
36. Kindelberger DW, Lee Y, Miron A i sur. Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship. *Am J Surg Pathol* 2007;31:161-9.
37. Pentheroudakis G, Pavlidis N. Serous papillary peritoneal carcinoma: unknown primary tumour, ovarian cancer counterpart or a distinct entity? A systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010;75:27-42.
38. Seidman JD, Zhao P, Yemelyanova A. "Primary peritoneal" high-grade serous carcinoma is very likely metastatic from serous tubal intraepithelial carcinoma: Assessing the new paradigm of ovarian and pelvic serous carcinogenesis and its implications for screening for ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2010;120:470-3.
39. Seidman JD, Wang BG. Evaluation of normal-sized ovaries associated with primary peritoneal serous carcinoma for possible precursors of ovarian serous carcinoma. *Gynecol Oncol* 2007;106:201-6.
40. Vang R, Shih Ie M, Kurman RJ. Fallopian tube precursors of ovarian low- and high-grade serous neoplasms. *Histopathology* 2013;62:44-58.
41. Shih Ie M, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 2004;164:1511-8.
42. Silverberg SG. Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. *Int J Gynecol Pathol* 2000;19:7-15.
43. Malpica A, Deavers MT, Lu K, Bodurka DC, Atkinson EN, Gershenson DM, et al. Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. *Am J Surg Pathol* 2004;28:496-504.
44. Vang R, Shih Ie M, Kurman RJ. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Adv Anat Pathol* 2009;16:267-82.
45. Ricciardelli C, Oehler MK. Diverse molecular pathways in ovarian cancer and their clinical significance. *Maturitas* 2009;62:270-5.

46. Singer G, Kurman RJ, Chang HW, Cho SK, Shih Ie M. Diverse tumorigenic pathways in ovarian serous carcinoma. *Am J Pathol* 2002;160:1223-8.
47. Singer G, Stohr R, Cope L i sur. Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis: a mutational analysis with immunohistochemical correlation. *Am J Surg Pathol* 2005;29:218-24.
48. Matias-Guiu X, Prat J. Molecular pathology of ovarian carcinomas. *Virchows Arch* 1998;433:103-11.
49. Tachibana M, Watanabe J, Matsushima Y i sur. Independence of the prognostic value of tumor suppressor protein expression in ovarian adenocarcinomas: A multivariate analysis of expression of p53, retinoblastoma, and related proteins. *Int J Gynecol Cancer* 2003;13:598-606.
50. Feng L, Lin T, Uranishi H, Gu W, Xu Y. Functional analysis of the roles of posttranslational modifications at the p53 C terminus in regulating p53 stability and activity. *Mol Cell Biol* 2005;25:5389-95.
51. D'Andrilli G, Kumar C, Scambia G, Giordano A. Cell cycle genes in ovarian cancer: steps toward earlier diagnosis and novel therapies. *Clin Cancer Res* 2004;10:8132-41.
52. Nakayama K, Takebayashi Y, Nakayama S i sur. Prognostic value of overexpression of p53 in human ovarian carcinoma patients receiving cisplatin. *Cancer Lett* 2003;192:227-35.
53. Geisler JP, Geisler HE, Miller GA, Wiemann MC, Zhou Z, Crabtree W. p53 and bcl-2 in epithelial ovarian carcinoma: their value as prognostic indicators at a median follow-up of 60 months. *Gynecol Oncol* 2000;77:278-82.
54. Lassus H, Leminen A, Lundin J, Lehtovirta P, Butzow R. Distinct subtypes of serous ovarian carcinoma identified by p53 determination. *Gynecol Oncol* 2003;91:504-12.
55. Kang HJ, Chun SM, Kim KR, Sohn I, Sung CO. Clinical Relevance of Gain-Of-Function Mutations of p53 in High-Grade Serous Ovarian Carcinoma. *PLoS One* 2013;8:e72609.

56. Yemelyanova A, Vang R, Kshirsagar M i sur. Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Mod Pathol* 2011;24:1248-53.
57. Havrilesky L, Darcy KM, Hamdan H i sur. Prognostic significance of p53 mutation and p53 overexpression in advanced epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2003;21:3814-25.
58. Høgdall EV, Kjaer SK, Blaakaer J i sur. P53 mutations in tissue from Danish ovarian cancer patients: from the Danish "MALOVA" ovarian cancer study. *Gynecol Oncol* 2006;100:76-82.
59. Fallows S, Price J, Atkinson RJ, Johnston PG, Hickey I, Russell SE. P53 mutation does not affect prognosis in ovarian epithelial malignancies. *J Pathol* 2001;194:68-75.
60. Bell DA. Origins and molecular pathology of ovarian cancer. *Mod Pathol* 2005;18:19-32.
61. Romero I, Sun CC, Wong KK, Bast RC Jr., Gershenson DM. Low-grade serous carcinoma: New concepts and emerging therapies. *Gynecol Oncol* 2013;130:660-6.
62. Bali A, O'Brien PM, Edwards LS, Sutherland RL, Hacker NF, Henshall SM. Cyclin D1, p53, and p21Waf1/Cip1 expression is predictive of poor clinical outcome in serous epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:5168-77.
63. Dogan E, Saygili U, Tuna B i sur. p53 and mdm2 as prognostic indicators in patients with epithelial ovarian cancer: a multivariate analysis. *Gynecol Oncol* 2005;97:46-52.
64. Hawes D, Liu PY, Muggia FM i sur. Correlation of p53 immunostaining in primary and residual ovarian cancer at the time of positive second-look laparotomy and its prognostic role: a Southwest Oncology Group ancillary study. *Gynecol Oncol* 2002;87:17-23.
65. Hashiguchi Y, Tsuda H, Inoue T, Nishimura S, Suzuki T, Kawamura N. Alteration of cell cycle regulators correlates with survival in epithelial ovarian cancer patients. *Hum Pathol* 2004;35:165-75.

66. Camilleri-Broet S, Hardy-Bessard AC, Le Tourneau A i sur. HER-2 overexpression is an independent marker of poor prognosis of advanced primary ovarian carcinoma: a multicenter study of the GINECO group. *Ann Oncol* 2004;15:104-12.
67. Kringen P, Wang Y, Dumeaux V i sur. TP53 mutations in ovarian carcinomas from sporadic cases and carriers of two distinct BRCA1 founder mutations; relation to age at diagnosis and survival. *BMC Cancer* 2005;5:134.
68. Yakirevich E, Sabo E, Naroditsky I, Sova Y, Lavie O, Resnick MB. Multidrug resistance-related phenotype and apoptosis-related protein expression in ovarian serous carcinomas. *Gynecol Oncol* 2006;100:152-9.
69. Lee H, Park G, Jung JH i sur. Diagnostic approach using the expression profiling of the P53 tumor suppressor gene and its related proteins in ovarian epithelial tumors. *Int J Gynecol Cancer* 2005;15:453-61.
70. Skirnisdottir I, Seidal T, Sorbe B. A new prognostic model comprising p53, EGFR, and tumor grade in early stage epithelial ovarian carcinoma and avoiding the problem of inaccurate surgical staging. *Int J Gynecol Cancer* 2004;14:259-70.
71. Wilkinson MG, Millar JB. Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *Faseb J* 2000;14:2147-57.
72. Meloche S, Pouyssegur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 2007;26:3227-39.
73. Hoshino R, Chatani Y, Yamori T i sur. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 1999;18:813-22.
74. Pohl G, Ho CL, Kurman RJ, Bristow R, Wang TL, Shih Ie M. Inactivation of the mitogen-activated protein kinase pathway as a potential target-based therapy in ovarian serous tumors with KRAS or BRAF mutations. *Cancer Res* 2005;65:1994-2000.
75. Liu X, Yan S, Zhou T, Terada Y, Erikson RL. The MAP kinase pathway is required for entry into mitosis and cell survival. *Oncogene* 2004;23:763-76.
76. Welch DR, Sakamaki T, Pioquinto R i sur. Transfection of constitutively active mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase confers tumorigenic and metastatic potentials to NIH3T3 cells. *Cancer Res* 2000;60:1552-6.



77. Hsu CY, Bristow R, Cha MS i sur. Characterization of active mitogen-activated protein kinase in ovarian serous carcinomas. *Clin Cancer Res* 2004;10:6432-6.
78. Givant-Horwitz V, Davidson B, Lazarovici P i sur. Mitogen-activated protein kinases (MAPK) as predictors of clinical outcome in serous ovarian carcinoma in effusions. *Gynecol Oncol* 2003;91:160-72.
79. Brustmann H. Expression of cellular apoptosis susceptibility protein in serous ovarian carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study. *Gynecol Oncol* 2004;92:268-76.
80. Kwon Y, Shin BS, Chung IK. The p53 tumor suppressor stimulates the catalytic activity of human topoisomerase IIalpha by enhancing the rate of ATP hydrolysis. *J Biol Chem* 2000;275:18503-10.
81. Mano MS, Awada A, Di Leo A i sur. Rates of topoisomerase II-alpha and HER-2 gene amplification and expression in epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004;92:887-95.
82. Joshi AA, Wu Z, Reed RF, Suttle DP. Nuclear factor-Y binding to the topoisomerase IIalpha promoter is inhibited by both the p53 tumor suppressor and anticancer drugs. *Mol Pharmacol* 2003;63:359-67.
83. Wang Q, Zambetti GP, Suttle DP. Inhibition of DNA topoisomerase II alpha gene expression by the p53 tumor suppressor. *Mol Cell Biol* 1997;17:389-97.
84. O'Neill CJ, Deavers MT, Malpica A, Foster H, McCluggage WG. An immunohistochemical comparison between low-grade and high-grade ovarian serous carcinomas: significantly higher expression of p53, MIB1, BCL2, HER-2/neu, and C-KIT in high-grade neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2005;29:1034-41.
85. Dingemans AM, Pinedo HM, Giaccone G. Clinical resistance to topoisomerase-targeted drugs. *Biochim Biophys Acta* 1998;1400:275-88.
86. Costa MJ, Hansen CL, Holden JA, Guinee D, Jr. Topoisomerase II alpha: prognostic predictor and cell cycle marker in surface epithelial neoplasms of the ovary and peritoneum. *Int J Gynecol Pathol* 2000;19:248-57.
87. Brustmann H. Vascular endothelial growth factor expression in serous ovarian carcinoma: relationship with topoisomerase II alpha and prognosis. *Gynecol Oncol* 2004;95:16-22.

88. Dingemans AC, van Ark-Otte J, Span S i sur. Topoisomerase IIalpha and other drug resistance markers in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001;32:117-28.
89. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA i sur. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:205-16.
90. Kurman RJ SI. Pathogenesis of Ovarian Cancer. Lessons from Morphology and Molecular Biology and their Clinical Implications. *Int J Gynecol Pathol* 2008;27:151-160.
91. Seidman JD, Horkayne-Szakaly I, Cosin JA i sur. Testing of two binary grading systems for FIGO stage III serous carcinoma of the ovary and peritoneum. *Gynecol Oncol* 2006;103:703-8.
92. Plaxe SC. Epidemiology of low-grade serous ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2008;198:459.e1-459.e9.
93. Bodurka DC, Deavers MT, Tian C i sur. Reclassification of serous ovarian carcinoma by a 2-tier system: a Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer* 2012;118:3087-94.
94. Ikeda K, Sakai K, Yamamoto R i sur. Multivariate analysis for prognostic significance of histologic subtype, GST-pi, MDR-1, and p53 in stages II-IV ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2003;13:776-84.
95. Berchuck A, Iversen ES, Lancaster JM i sur. Patterns of gene expression that characterize long-term survival in advanced stage serous ovarian cancers. *Clin Cancer Res* 2005;11:3686-96.
96. Bristow RE, Gossett DR, Shook DR, Zahurak ML, Tomacruz RS, Armstrong DK, et al. Micropapillary serous ovarian carcinoma: surgical management and clinical outcome. *Gynecol Oncol* 2002;86:163-70.
97. Skirnisdottir I, Seidal T. Association of p21, p21 p27 and p21 p53 status to histological subtypes and prognosis in low-stage epithelial ovarian cancer. *Cancer Genomics Proteomics* 2013;10:27-34.
98. Skirnisdottir IA, Sorbe B, Lindborg K, Seidal T. Prognostic impact of p53, p27, and C-MYC on clinicopathological features and outcome in early-stage (FIGO I-II) epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2011;21:236-44.

99. Hannibal CG, Vang R, Junge J, Kjaerbye-Thygesen A, Kurman RJ, Kjaer SK. A binary histologic grading system for ovarian serous carcinoma is an independent prognostic factor: a population-based study of 4317 women diagnosed in Denmark 1978-2006. *Gynecol Oncol* 2012;125:655-60.
100. Baek SJ, Park JY, Kim DY i sur. Stage IIIC epithelial ovarian cancer classified solely by lymph node metastasis has a more favorable prognosis than other types of stage IIIC epithelial ovarian cancer. *J Gynecol Oncol* 2008;19:223-8.
101. Kurman RJ, Visvanathan K, Roden R, Wu TC, Shih Ie M. Early detection and treatment of ovarian cancer: shifting from early stage to minimal volume of disease based on a new model of carcinogenesis. *Am J Obstet Gynecol* 2008;198:351-6.
102. Hall PA, McCluggage WG. Assessing p53 in clinical contexts: unlearned lessons and new perspectives. *J Pathol* 2006;208:1-6.
103. Nadkarni NJ, Geest KD, Neff T i sur. Microvessel density and p53 mutations in advanced-stage epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett* 2013;331:99-104.
104. Ozer H, Yenicesu G, Ar CS, Cetin M, Tuncer E, Cetin A. Immunohistochemistry with apoptotic-antiapoptotic proteins (p53, p21, bax, bcl-2), c-kit, telomerase, and metallothionein as a diagnostic aid in benign, borderline, and malignant serous and mucinous ovarian tumors. *Diagn Pathol* 2012;7:124.
105. Zhang C, Li XP, Cui H, Shen DH, Wei LH. Advanced primary peritoneal carcinoma: clinicopathological and prognostic factor analyses. *J Zhejiang Univ Sci B* 2008;9:435-40.
106. Skirnisdottir I, Seidal T. The apoptosis regulators p53, bax and PUMA: Relationship and impact on outcome in early stage (FIGO I-II) ovarian carcinoma after post-surgical taxane-based treatment. *Oncol Rep* 2012;27:741-7.
107. Leitao MM, Soslow RA, Baergen RN, Olvera N, Arroyo C, Boyd J. Mutation and expression of the TP53 gene in early stage epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004;93:301-6.
108. Mishra SK, Crasta JA. An immunohistochemical comparison of P53 and Bcl-2 as apoptotic and MIB1 as proliferative markers in low-grade and high-grade ovarian serous carcinomas. *Int J Gynecol Cancer* 2010;20:537-41.

109. Skirnisdottir I, Seidal T. Prognostic impact of concomitant p53 and PTEN on outcome in early stage (FIGO I-II) epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2011;21:1024-31.
110. Tomić S, Ilić Forko J, Babić D, Šundov D, Kuret S, Andelinović Š. c-erbB-2, p53, nm 23 proteins as prognostic factors in patients with epithelial carcinoma. *Croat Med J* 2013;44:429-34.
111. Vartiainen J, Lassus H, Lehtovirta P i sur. Combination of serum hCG beta and p53 tissue expression defines distinct subgroups of serous ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 2008;122:2125-9.
112. Carlson J, Roh MH, Chang MC, Crum CP. Recent advances in the understanding of the pathogenesis of serous carcinoma: the concept of low- and high-grade disease and the role of the fallopian tube. *Diagn Histopathol* 2008;14:352-365.
113. Gilks CB, Prat J. Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances. *Hum Pathol* 2009;40:1213-23.
114. May T, Virtanen C, Sharma M i sur. Low malignant potential tumors with micropapillary features are molecularly similar to low-grade serous carcinoma of the ovary. *Gynecol Oncol* 2010;117:9-17.
115. Gershenson DM. The life and times of low-grade serous carcinoma of the ovary. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2013:e195-e199.
116. Parker RL, Clement PB, Chercover DJ, Sornarajah T, Gilks CB. Early recurrence of ovarian serous borderline tumor as high-grade carcinoma: a report of two cases. *Int J Gynecol Pathol* 2004;23:265-72.
117. Garg K, Park KJ, Soslow RA. Low-grade serous neoplasms of the ovary with transformation to high-grade carcinomas: a report of 3 cases. *Int J Gynecol Pathol* 2012;31:423-8.
118. Boyd C, McCluggage WG. Low-grade ovarian serous neoplasms (low-grade serous carcinoma and serous borderline tumor) associated with high-grade serous carcinoma or undifferentiated carcinoma: report of a series of cases of an unusual phenomenon. *Am J Surg Pathol* 2012;36:368-75.

119. Dehari R KR, Logani S, Shih IM. The Development of High-grade Serous Carcinoma From Atypical Proliferative (Borderline) Serous Tumors and Low-grade Micropapillary Serous Carcinoma. A Morphologic and Molecular Genetic Analysis. *Am J Surg Pathol* 2007;31:1007-12.
120. Smith ER, Smedberg JL, Rula ME, Xu XX. Regulation of Ras-MAPK pathway mitogenic activity by restricting nuclear entry of activated MAPK in endoderm differentiation of embryonic carcinoma and stem cells. *J Cell Biol* 2004;164:689-99.
121. Vicent S, Garayoa M, Lopez-Picazo JM i sur. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is overexpressed in non-small cell lung cancer and is an independent predictor of outcome in patients. *Clin Cancer Res* 2004;10:3639-49.
122. Wu GS. Role of mitogen-activated protein kinase phosphatases (MKPs) in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:579-85.
123. Morgan MA, Dolp O, Reuter CW. Cell-cycle-dependent activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK-1/2) in myeloid leukemia cell lines and induction of growth inhibition and apoptosis by inhibitors of RAS signaling. *Blood* 2001;97:1823-34.
124. Wong KK, Tsang YT, Deavers MT i sur. BRAF mutation is rare in advanced-stage low-grade ovarian serous carcinomas. *Am J Pathol* 2010;177:1611-7.
125. Grisham RN, Iyer G, Garg K, DeLair D, Hyman DM, Zhou Q, et al. BRAF mutation is associated with early stage disease and improved outcome in patients with low-grade serous ovarian cancer. *Cancer* 2013;119:548-54.
126. Brustmann H, Naude S. Expression of topoisomerase IIalpha, Ki-67, proliferating cell nuclear antigen, p53, and argyrophilic nucleolar organizer regions in vulvar squamous lesions. *Gynecol Oncol* 2002;86:192-9.
127. Shamaa AA, Zyada MM, Wagner M, Awad SS, Osman MM, Abdel Azeem AA. The significance of Epstein Barr virus (EBV) & DNA topoisomerase II alpha (DNA-Topo II alpha) immunoreactivity in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasia (OED) and oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Diagn Pathol* 2008;3:45.
128. Habberstad AH, Gulati S, Torp SH. Evaluation of the proliferation markers Ki-67/MIB-1, mitotin, survivin, pHH3, and DNA topoisomerase IIalpha in human anaplastic astrocytomas--an immunohistochemical study. *Diagn Pathol* 2011;6:43.

129. Faggad A, Darb-Esfahani S, Wirtz R i sur. Topoisomerase IIalpha mRNA and protein expression in ovarian carcinoma: correlation with clinicopathological factors and prognosis. *Mod Pathol* 2009;22:579-88.
130. Takahashi M, Kigawa J, Minagawa Y i sur. Sensitivity to paclitaxel is not related to p53-dependent apoptosis in ovarian cancer cells. *Eur J Cancer* 2000;36:1863-8.
131. Dinh P, Harnett P, Piccart-Gebhart MJ, Awada A. New therapies for ovarian cancer: cytotoxics and molecularly targeted agents. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;67:103-12.
132. Kigawa J, Sato S, Shimada M i sur. p53 gene status and chemosensitivity in ovarian cancer. *Hum Cell* 2001;14:165-71.
133. Jiang L, Siu MK, Wong OG i sur. iASPP and chemoresistance in ovarian cancers: effects on paclitaxel-mediated mitotic catastrophe. *Clin Cancer Res* 2011;17:6924-33.
134. Gadducci A, Cosio S, Muraca S, Genazzani AR. Molecular mechanisms of apoptosis and chemosensitivity to platinum and paclitaxel in ovarian cancer: biological data and clinical implications. *Eur J Gynaecol Oncol* 2002;23:390-6.
135. Gadducci A, Di Cristofano C, Zavaglia M i sur. P53 gene status in patients with advanced serous epithelial ovarian cancer in relation to response to paclitaxel- plus platinum-based chemotherapy and long-term clinical outcome. *Anticancer Res* 2006;26:687-93.
136. Lavarino C, Pilotti S, Oggionni M i sur. p53 gene status and response to platinum/paclitaxel-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 2000;18:3936-45.
137. Mano Y, Kikuchi Y, Yamamoto K i sur. Bcl-2 as a predictor of chemosensitivity and prognosis in primary epithelial ovarian cancer. *Eur J Cancer* 1999;35:1214-9.
138. Wong KK, Izaguirre DI, Kwan SY i sur. Poor survival with wild-type TP53 ovarian cancer? *Gynecol Oncol* 2013;130:565-9.
139. Gershenson DM, Sun CC, Lu KH i sur. Clinical behavior of stage II-IV low-grade serous carcinoma of the ovary. *Obstet Gynecol* 2006;108:361-8.
140. Gershenson DM, Sun CC, Bodurka D i sur. Recurrent low-grade serous ovarian carcinoma is relatively chemoresistant. *Gynecol Oncol* 2009;114:48-52.

141. Santillan A, Kim YW, Zahurak ML i sur. Differences of chemoresistance assay between invasive micropapillary/low-grade serous ovarian carcinoma and high-grade serous ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2007;17:601-6.
142. Schmeler KM, Gershenson DM. Low-grade serous ovarian cancer: a unique disease. *Curr Oncol Rep* 2008;10:519-23.
143. Schmeler KM, Sun CC, Bodurka DC i sur. Neoadjuvant chemotherapy for low-grade serous carcinoma of the ovary or peritoneum. *Gynecol Oncol* 2008;108:510-4.
144. May T, Shoni M, Crum CP i sur. Low-grade and high-grade serous Mullerian carcinoma: review and analysis of publicly available gene expression profiles. *Gynecol Oncol* 2013;128:488-92.
145. Karst AM, Drapkin R. The new face of ovarian cancer modeling: better prospects for detection and treatment. *F1000 Med Rep* 2011;3:22.
146. Despierre E, Lambrechts D, Neven P, Amant F, Lambrechts S, Vergote I. The molecular genetic basis of ovarian cancer and its roadmap towards a better treatment. *Gynecol Oncol* 2010;117:358-65.
147. Diaz-Padilla I, Malpica AL, Minig L, Chiva LM, Gershenson DM, Gonzalez-Martin A. Ovarian low-grade serous carcinoma: a comprehensive update. *Gynecol Oncol* 2012;126:279-85.
148. Montagut C, Settleman J. Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy. *Cancer Lett* 2009;283:125-34.
149. Faratian D, Um I, Wilson DS, Mullen P, Langdon SP, Harrison DJ. Phosphoprotein pathway profiling of ovarian carcinoma for the identification of potential new targets for therapy. *Eur J Cancer* 2011;47:1420-31.
150. Rojo F, Gonzalez-Navarrete I, Bragado R i sur. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in human breast cancer independently predicts prognosis and is repressed by doxorubicin. *Clin Cancer Res* 2009;15:3530-9.
151. Haagenson KK, Wu GS. The role of MAP kinases and MAP kinase phosphatase-1 in resistance to breast cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev* 2010;29:143-9.

152. Koshiyama M, Fujii H, Kinezaki M, Yoshida M. Correlation between Topo II alpha expression and chemosensitivity testing for Topo II-targeting drugs in gynaecological carcinomas. *Anticancer Res* 2001;21:905-10.



## 10. ŽIVOTOPIS

### OPĆI PODACI

Ime i prezime: Dinka Šundov, dr. med.  
Datum rođenja: 15. svibnja 1969.  
Adresa: Kijevska 9, 21 000 Split  
Telefon: +385 21 782190  
Mobitel: +385 91 2509097

### ŠKOLOVANJE

1984. – 1988. Srednja medicinska škola (smjer farmaceutski tehničar), Split  
1988. – 1994. Medicinski fakultet Zagreb, Studij medicine u Splitu  
2000. – 2004. Specijalizacija iz Kliničke citologije  
2003. Stručni poslijediplomski studij iz Medicinske citologije  
2001. – 2004. Poslijediplomski doktorski znanstveni studij Temeljne i kliničke medicinske znanosti, smjer Klinička medicina Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

### RADNO ISKUSTVO

1995. – 1996. KBC SPLIT, dvogodišnji liječnički pripravnički staž  
1997. DOM ZDRAVLJA ČAKOVEC, Ambulanta Prelog, liječnik opće prakse  
1998. Turistička ambulanta Hotel Elaphusa, Bol, liječnik opće prakse  
2000. – 2004. specijalizacija iz Kliničke citologije  
Od 2004. KBC SPLIT, Klinički zavod za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Odjel za kliničku citologiju; od 2005. pročelnica Odjela za kliničku citologiju

## OBJAVLJENI ZNANSTVENI RADOVI

Radovi objavljeni u časopisima koji se indeksiraju u Current Contentsu:

1. Tomić S, Ilić Forko J, Babić D, Šundov D, Kuret S, Anđelinović S. c-erbB-2, p53, and nm23 proteins as prognostic factors in patients with epithelial ovarian carcinoma. *Croat Med J.* 2003 Aug;44(4):429-34.
2. Beljan R, Šundov D, Lukšić B, Šoljić V, Burazer MP. Diagnosis of visceral leishmaniasis By fine needle aspiration cytology of an isolated cervical lymph node: case report. *Coll Antropol.* 2010 Mar;34(1):237-9.
3. Štambuk S, Šundov D, Kuret S, Beljan R, Anđelinović S. Future perspectives of personalized oncology. *Coll Antropol.* 2010 Jun;34(2):763-9. Review.
4. Šundov D, Čarić A, Mrklič I, Gugić D, Čapkun V, Hofman ID, Miše BP, Tomić S. P53, MAPK, topoisomerase II alpha and Ki67 immunohistochemical expression and KRAS/BRAF mutation in ovarian serous carcinomas. *Diagn Pathol* 2013;8:21.

## KONGRESNA PRIOPĆENJA:

Šundov D, Balarin L, Krželj V. Tvrdochorni proljev u dojenčadi liječene na Odjelu za dječje bolesti KB Split u razdoblju od 1983. do 1993. godine. *Paediatrica Croatica*, Zagreb, travanj 1996.,. Suplement 1,114.

## SUDJELOVANJE U KLINIČKIM STUDIJAMA:

Ova disertacija izrađena je u sklopu projekta „Dvostruki model ovarijalne karcinogeneze: morfološka, molekularna i klinička studija“ – voditelj projekta prof.dr.sc. Snježana Tomić

KONGRESI

- III. Hrvatski kongres patologije i sudske medicine, Opatija 2005.  
 I. Kongres hrvatskog društva za štitnjaču: Rak štitnjače, Split 2007.  
 IV. Hrvatski kongres kliničke citologije, Split 2009.  
 II. Hrvatski simpozij citotehnologije, Split 2009.  
 37. Europski kongres citologije, Cavtat 2012.

TEČAJEVI

- The second European-American intensive course in clinical and forensic genetics, Dubrovnik 2001.  
 Poslijediplomski tečaj I kategorije: Suvremena patohistološka i molekulska dijagnostika raka dojke, Zagreb 2003.  
 “Vještina medicinske edukacije i znanstvenog rada”, Split 2008.  
 Liquid-based cytology (LBC) for cervical screening course, London 2009.  
 Liquid-based cytology (LBC) for non – gynaecological cytology, Split 2009.

STRUČNI/ZNANSTVENI SKUPOVI

- Simpozij „The 20<sup>th</sup> anniversary of stem cell transplantation in Zagreb, Zagreb 2003.  
 Znanstveni sastanci „Bolesti dojke“, Zagreb, 2007, 2009, 2012.  
 Simpozij „Dijagnostika i liječenje raka dojke i vrata maternice, Zagreb 2006.  
 Suvremena dijagnostika I terapija doštitnih žlijezda, Split 2006.  
 Dijagnostika i liječenje limfoma – Hrvatski konsenzus, Zagreb 2006.  
 Ne Hodgkinov limfom (NHL), Split 2006.  
 International Workshop on Human Papillomaviruses and Consensus Recommendations for Cervical Cancer Prevention, Dubrovnik 2007.  
 Clinical Oncology in Croatia, International Workshop, Zagreb 2007.  
 Simpozij “Klinički citolozi u multidisciplinarnim klinički – dijagnostičkim timovima”, Zagreb 2008.  
 I. Hrvatski simpozij analitičke citologije s međunarodnim sudjelovanjem, Split 2009.  
 Simpozij “Marin Nola”, Split 2010  
 Adriatic Society of Pathology, 24<sup>th</sup> Meeting, Split 2012.  
 KROHEM, 2010, 2011, 2012.  
 30. Hrvatska pedijatrijska proljetna škola, Split 2013.

## ORGANIZACIJA ZNANSTVENIH SKUPOVA I TEČAJEVA

Liquid-based cytology (LBC) for non – gynaecological cytology, Split 2009 – član Organizacijskog odbora

IV. Hrvatski kongres kliničke citologije, Split 2009. - dopredsjednica organizacijskog odbora.

## NASTAVNA DJELATNOST

Naslovni asistent na Katedri za patologiju te Katedri za ginekologiju i porodništvo.

## AKTIVNOSTI

Od 1997. član Hrvatskog liječničkog zbora

Od 1998. član Hrvatske liječničke komore

Od 2001. član Hrvatskog društva kliničkih citologa

2007. predstavnik Dekanske konferencije Medicinskog fakulteta Split u radnoj grupi za specijalističko usavršavanje liječnika i prilagodbu programa specijalizacije iz kliničke citologije, patologije i sudske medicine standardima EU

2012. član radne skupine za izradu postupnika “Cervikalne intraepitelne lezije” - 2012.

## VJEŠTINE

Aktivno znanje engleskog jezika

ECDL diploma za rad na računalu

Vozačka dozvola B kategorije