

## MARKERY PROGRESE A VZNIKU METASTÁZ U OVARIÁLNÍHO KARCINOMU SLEDOVANÉ NA ZÁKLADĚ GENOVÝCH EXPRESNÍCH PROFILŮ

R. Václavíková<sup>1</sup>, K. Elsnerová<sup>1,2,3</sup>, B. Mohelníková-Duchoňová<sup>1,4</sup>,  
A. Bartáková<sup>5</sup>, L. Rob<sup>6</sup>, P. Škapa<sup>7</sup>, M. Hruša<sup>6</sup>, J. Bouda<sup>5</sup>, P. Vodička<sup>8</sup>,  
P. Souček<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Oddělení Toxikogenomiky, Státní zdravotní ústav, Praha, <sup>2</sup>3. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze, <sup>3</sup>Biomedicínské centrum, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze, <sup>4</sup>Onkologická klinika, Lékařská fakulta Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice, Olomouc, <sup>5</sup>Gynekologicko-porodnická klinika, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice v Plzni, Univerzita Karlova v Praze, <sup>6</sup>Gynekologicko-porodnická klinika, 2. lékařská fakulta a Fakultní nemocnice Motol, Univerzita Karlova v Praze, <sup>7</sup>Ústav patologie a molekulární medicíny 2. lékařské fakulty a Fakultní nemocnice Motol, Univerzita Karlova v Praze, <sup>8</sup>Oddělení molekulární biologie nádorů, Ústav experimentální medicíny AV ČR, Praha

Maligní epiteliální ovariální nádory (EOC) jsou nejčastější příčinou úmrtí na gynekologické malignity. Onemocnění je kvůli absenci efektivního screeningu prediktivních markerů u obecné populace diagnostikováno u více než 70 % žen až v pokročilém stádiu (FIGO III a IV). Pravděpodobnost pětiletého přežití se pak pohybuje pouze 20–40 % (1, 2), protože nádor bývá již diseminovaný a léčba je komplikována častým výskytem recidiv spojených s rezistencí vůči použité chemoterapii (3). Diagnostika ovariálních karcinomů zahrnuje určení subjektivních potíží pacientek a gynekologické vyšetření, největší význam však má stanovení nádorových markerů (CA125 a HE4) a expertní ultrazvukové vyšetření (4).

Genetická povaha EOC není dosud důkladně prostudována a stanovení genetických markerů se v běžné klinické praxi nevyužívá. Se vznikem ovariálních karcinomů je hereeditárně spojována mutace genů BRCA1/2 (5). Pomocí sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing, NGS; 6) byly odhaleny kombinace mutací BRCA1/2 u 11 % pacientek s high-grade serosním ovariálním karcinomem (HGSC). Pro prognózu ovariálních nádorů přitom hrají mutace BRCA1/2 pozitivní roli, jak bylo poměrně nedávno zjištěno (7, 8, 9), a rovněž v retrospektivních studiích australské populace (n = 1001; 10) či etnicky heterogenní skupiny (n = 190; 11) korelovaly mutace BRCA1/2 s delším přežíváním pacientek s EOC. V léčbě lze mutace genů BRCA využít při podávání inhibitorů PARP (12). Nedávná studie však naznačila, že rozšíření spektra sledovaných genů (např. CHEK2, ATM, PALB2) u pacientek s nemutovanými BRCA1/2 geny (13) nebo sledování mutací genů RAD51C/D (14) by společně s detailní rodinnou anamnézou vzhledem k riziku vzniku EOC mohlo přinést klinický dopad. V rutinní diagnostice ovariálních nádorů se zatím mutace BRCA1/2 či dalších genů nesledují.

Na základě molekulárních genetických studií, klinického obrazu, morfologie a histopatologie se ale podařilo rozdělit ovariální karcinomy na 5 histologických typů [high-grade

serosní (70 %), endometroidní (10 %), světlobuněčné (10 %), mucinosní (3 %), a low-grade serosní karcinomy (< 5 %)], které v celku zastupují 95 % případů (15). Mohou být navíc klasifikovány do dvou skupin označovaných jako typ I a typ II. Typ I tvoří low-grade serosní karcinomy (grade 1), low grade endometroidní (grade 1 a 2), mucinosní a světlobuněčné karcinomy. Mezi nádory II. typu jsou pak řazeny high-grade serosní (grade 2 a 3) a high-grade endometroidní (grade 3) karcinomy (16, 17). Tyto typy se liší jak prognostickými faktory, povahou rozsevu a odpovědí na léčbu, tak molekulární podstatou, rozdílným genetickým profilem a rozdíly v epidemiologických a genetických faktorech spojených s rizikem vzniku ovariálního karcinomu. Uvedená klasifikace ovariálních nádorů představuje první krok k využití sledování genových expresních profilů v diagnostice a prognóze ovariálních karcinomů.

Vzhledem k hlavním příčinám úmrtí na ovariální karcinomy, tedy rozvoji rezistence a metastatickému rozsevu, byla, na základě genetických profilů, nalezena řada konkrétních markerů souvisejících s resistencí na podávanou chemoterapii, např. NRF2, TP53, DACH1, EVI1, SKILL, RUNX, PRKCI, GPX3, APC, BAG3, S100A10, EGFR, ITGAE, MAPK3/ERK1, TAP1/ABC2, BNIP3, MMP9, a FASLG (18–23). Dressman a kol. našli genové profily konzistentní s aktivací onkogenních signálních drah Src a Rb/E2F u chemoresistentních pacientů s potenciálním využitím v cílené terapii zaměřené právě na tyto dráhy. Aktuální informace a nejvýznamnější data k využití komerčních microarrays pro měření genových expresních profilů u ovariálních malignit zejména ve vztahu k léčebné odpovědi či rozvoji rezistence onemocnění jsou shrnuty v Tab. 1. Z tabulky 1 a recentní práce (24) je patrné, že existuje přes 40 studií sledujících genový expresní profil u velkých souborů pacientek s ovariálními nádory. Nicméně, i přes identifikaci řady zajímavých kandidátních genů a panelů, zatím nebylo pro ovariální nádory doporučeno využití jednotného panelu genů s prognostickým či prediktivním významem (na rozdíl od karcinomu prsu, kde takové panely jsou již používány, např.: Oncotype DX či MammaPrint).

Specifické genetické markery metastatického rozsevu zatím u EOC rovněž známy nejsou. Obecně u EOC existují tři způsoby rozsevu metastáz. Méně obvyklými způsoby jsou rozsev krevní cestou vedoucí ke vzniku vzdálených metastáz v játrech, mozku a dalších orgánech a propagace nádorových buněk do lymfatických uzlin a lymfatického oběhu. Nejběžnější cestou rozsevu metastáz u EOC je šíření po peritoneu (25). Při metastázování dochází ke změně epiteliálních buněk na mezenchymální v procesu zvaném epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT). Mezenchymální buňky jsou totiž díky své odlišné polarizaci schopny migrace. Během EMT se pak buňky ze solidního primárního nádoru šíří, adherují a proliferyjí. Léčba takto pokročilých stádií onemocnění spočívá v cytoreduktivním chirurgickém zákroku odstraňujícím primární nádor s následnou chemoterapií zpravidla karboplatinou v kombinaci s paklitaxelem (26). Protože u řady pacientů dochází, i přes chirurgický zákrok a chemoterapii, k opětovnému výskytu peritoneálních metastáz, jsou hledány alternativní cesty podání chemoterapie. Podání cytostatik přímo do břišní dutiny umožňuje dosáhnout mnohem vyšších koncentrací cytostatik přímo v peritoneálním prostoru a tím zvýšit cytotoxický účinek. V současnosti probíhá 18 klinických studií sledujících výhody intraperitoneálního podání cytostatik a to především za pomoci intraoperativní IP chemoterapie v hypertermických podmínkách (HIPEC; 27).

**Tab. 1** Stanovení transkripčních profilů pacientek s maligními ovariálními nádory pomocí čipových technologií a jejich hodnocení ve vztahu k léčebné odpovědi či rozvoji rezistence

Reference	Velikost souboru	Použitá technologie	Typ sledované asociace genového expresního profilu a odpovědi na léčbu, přežití, rezistence	Prognostický a predikční význam studie
Siamakpour-Reihani S a kol. 2015 (59)	51 HGSC vzorků	Affymetrix HG-U133A microarray	Celkové přežívání	Vysoké hladiny AKT1 a CD44 spojeny s delším přežíváním. Vysoké hladiny exprese EPHB2, ERBB2, FLT1; PF4, NRPI, COL4A3 a ANGPTL3 spojeny s kratším přežíváním.
Lisowska KM a kol. 2014 (60)	97 vzorků ovariálních nádorů: 71 serosní, 11 endometroidní, 9 světloubuněčné a 6 nediferencované	Affymetrix HG U133 Plus 2.0 Gene Chip microarray	Prognostické faktory, celkové a bezpříznakové přežívání	Vztah mezi bezpříznakovým přežíváním a CLASP1 expresí. Autorka poukazuje na význam sledování exprese v jednom homogenním histologickém typu nádorů, který poskytuje konzistentní výsledky.
May T a kol. 2013 (61)	Vyhodnocení předchozích sledovaných setů LGSC a HGSC	Affymetrix U133 plus2.0 gene chip microarray – výsledky staženy z GEO nebo přímo poskytnuty autory	Odpověď na léčbu Identifikace drah účastnicích se v léčebné odpovědi	Rozdílný expresní profil LGSC a HGSC. Nalezeny geny účastníci se rezistence vůči léčbě. Exprese nového genu CLU (Clusterin) identifikována jako faktor přispívající k rezistenci vůči chemoterapii u LGSC.
Jeong W a kol. 2013 (62)	267 vzorků nádorů ovarii různého histotypu	Affymetrix microarray platformy (U133A nebo U133 v2.0)	Celkové přežívání	Panel 612 genů aktivace YAP1 u ovariálního karcinomu. Ta je spojena se špatnou prognózou a odpovědí na léčbu taxany.
Han Y a kol. 2012 (63)	322 HGSC	Affymetrix Human U133A Gene Chip microarray	Celkové a bezpříznakové přežívání	Panel 349 genů s prediktivním významem pro vznik chemoresistence u HGSC.
Hsu FH a kol. 2012 (64)	Analýza TCGA dostupného datasetu s více jak 500 pacientkami	Výsledky Affymetrix U133A microarray	Progrese onemocnění – hodnocení přežívání bez známek progresu	134 genů s rozdílnou expresí u dobře a špatně odpovídajících pacientů na použitou léčbu.

<b>Reference</b>	<b>Velikost souboru</b>	<b>Použitá technologie</b>	<b>Typ sledované asociace genového expresního profilu a odpovědi na léčbu, přežití, rezistence</b>	<b>Prognostický a predikční význam studie</b>
Liu Y a kol. 2012 (65)	Analýza dvou datasetů: TCGA set 493 vzorků a Australský dataset 244 vzorků	Výsledky Affymetrix U133A microarrays	Chemosensitivita Celkové přežívání Přežívání bez známek progresse	Identifikován panel genů s rozdílnou expresí u chemoresistentních a chemosensitivních pacientek se serosním ovariálním karcinomem.
Sabatier R a kol. 2011 (66)	401 vzorků ovariálních nádorů	Affymetrix Human Exon 1.0 ST arrays	Celkové přežívání Přežívání bez známek progresse	Návrh 7-genového optimálního prognostického modelu (OPM) na základě 94 genů asociovaných s progresí ovariálního nádoru.
Spentzos D a kol. 2005 (67)	24 EOC + 36 pacientů ve validačním setu	Oligonucleotide microarrays	Odpověď na léčbu	Panel 93 genů souvisejících s patologií kompletní odpovědi Chemotherapy Response Profile (CRP) v setu 24 EOC pacientů.
Spentzos D a kol. 2004 (68)	68 EOC	Oligonucleotidová microarray	Prognostické faktory, celkové přežívání	Panel 115 genů označovaný jako prognostický profil karcinomu vaječníků (Ovarian Cancer Prognostic Profile; OCPP).

Současné technologie genetického výzkumu umožňují studovat genetickou heterogenitu, mutační a transkripční profil, post-transkripční regulaci genové exprese a využití těchto informací k určení klíčových molekulárních faktorů rozvoje, progresu onemocnění i rozsevu metastáz. Vzhledem k odpovědi na léčbu se pro odhad následné remise nebo relapsu onemocnění zdají být zajímavé geny transportu cytostatik (28–30). Jde o membránové ABC transportéry (ATP binding cassette, ABC) a SLC transportéry (solute carrier, SLC) vázající ATP. Velmi nedávno se objevily práce spojující oba typy transportérů s lékovou rezistencí *in vitro* v ovariálních nádorových buňkách (31) a s terapeutickým výstupem léčby ovariálních nádorů, např. v práci Hedditch a kol. (32), kde vysoké hladiny ABCA transportérů (ABCA1, ABCA6, ABCA8 a ABCA9) korelovaly s horším přežíváním pacientek s high-grade serosním karcinomem (HGSC). Byl nalezen vztah také mezi imunohistochemickou pozitivitou ABCC1 transportéru a gradem EOC a vztah mezi hladinou ABCC4 a kratším přežíváním do známek progresu EOC u 127 pacientek s ovariálním karcinomem a různorodým histotypem (33). V buňkách karcinomu prsu vedla aktivace EMT, indukovaná epidermálním růstovým faktorem, ke zvýšení exprese ABCC3 transportéru (34) podobně jako v předchozí práci, kde indukce EMT a schopnost migrace nádorových buněk invazivního karcinomu mléčné žlázy souvisela se zvýšenou expresí 16 ABC transportérů (35). Tyto výsledky ukazují na vztah mezi EMT, agresivním fenotypem nádoru, rezistencí vůči chemoterapii a expresí membránových transportérů. Z těchto důvodů se jeví účelné sledovat jejich expresní profil i u ovariálních nádorů, kde tyto vztahy známy nejsou.

Epidermální růstový faktor je součástí klíčových procesů aktivace EMT (34). V souvislosti s tím byla sledována i role receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) v ovariálních nádorových buňkách. EGFR hraje důležitou roli v regulaci buněčného cyklu, proliferaci, diferenciaci a přežívání buněk. U ovariálních nádorových buněk i v klinických vzorcích byla nalezena zvýšená exprese EGFR (36). Navíc se EGFR společně se STAT3 podílí na zprostředkování EMT v nádorových buňkách (37). Aktivace EGFR byla rovněž pozorována v souvislosti se zvýšenou invazivitou a schopností migrace ovariálních nádorových buněk rezistentních vůči cisplatině (38). Z ostatních povrchových receptorů je zvýšeně exprimován ERBB2 (HER2) v světlobuněčných karcinomech ovaria (39) a jeho zvýšená exprese byla nalezena i u pozdních stádií endometroidního typu ovariálního karcinomu, kde souvisela jak s celkovým tak s přežíváním bez známek onemocnění (40).

Eliminace a působení léčiv není ovlivňováno jen jejich membránovým transportem, ale také biotransformačními procesy uvnitř buněk, či deaktivací za účasti celé řady enzymů I. a II. fáze biotransformace. U ovariálních nádorů byla v této souvislosti nalezena zvýšená exprese antioxidantních enzymů superoxidodismutasy 2 (SOD2), glutaredoxinu (GLRX) a glutathion-3 peroxidasy (GPX3) ve tkáních světlobuněčného EOC oproti ostatním histologickým typům. Tento histotyp má přitom horší prognózu než jiné histotypy (39). SOD2 byla rovněž zvýšeně exprimována v *in vitro* podmínkách v invazivních SKOV3.ip1 nádorových ovariálních buňkách ve srovnání s původními SKOV3 buňkami (41). Zdá se tedy, že zvýšená aktivita enzymů odpovídajících na oxidativní stres, spolu se zvýšenou metabolickou aktivitou, může souviset s agresivnější povahou nádoru a následným rozvojem metastáz.

V neposlední řadě je účinnost léčby i povaha nádorového procesuje ovlivněna geny, které se účastní regulačních a řídicích procesů v buňkách a DNA reparačních mechanismů. Jedním z klíčových genů je přitom TP53. Jedná se o tumor-supresorový gen, který reguluje programovanou smrt buněk (apoptózu) včetně apoptotické odpovědi na radioterapii a chemoterapii. Jeho mutace či deregulace jsou nejčastějšími abnormalitami v nádorových buňkách. Změny v expresi proteinu p53 byly pozorovány u různých histologických typů ovariálních karcinomů (42, 43). Zvýšená exprese p53 (gen TP53) společně s Ki67 (gen MKI67) nalezená u mucinosních ovariálních karcinomů v porovnání s mucinózními borderline nádory (43) naznačuje, že p53 může být i markerem diferenciacce a agresivity jednotlivých histotypů.

Z velmi široké problematiky DNA reparace se jeví jako zásadní úloha genů tzv. DNA mismatch reparace. Snížená exprese některého z genů této dráhy (MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, MLH3, PMS1, and PMS2) byla nalezena až u 29 % případů EOC (44).

Tato pilotní studie měla za cíl prostudovat expresi vybrané kazety genů (membránové transportéry, geny regulace buněčného cyklu a DNA reparačních mechanismů) ve vzorcích benigních ovaríí, primárních EOC a peritoneálních metastáz EOC. Hlavním cílem bylo porovnat rozdíly v hladinách exprese všech genů mezi nenádorovu, nádorovu a metastatickou tkání, vysledovat trendy ve změnách exprese a nalézt vztahy mezi klinicko-patologickými údaji pacientek a mírou genové exprese. Na základě zjištěných vztahů byly formulovány kandidátní genetické markery rozvoje nádoru a vzniku metastáz, které poslouží k cíleným studiím pro zpřesnění prognózy pacientek a k hledání nových terapeutických cílů ovariálních nádorů.

## MATERIÁL A METODY

### Pacientky a vzorky

V této pilotní studii bylo analyzováno 23 vzorků EOC a 16 vzorků peritoneálních metastáz EOC, které byly získány z Gynekologicko-porodnické kliniky Fakultní nemocnice v Plzni od pacientek diagnostikovaných v letech 2005–2014. Jako kontrolní skupina bylo použito 14 vzorků nezhoubných tkání ovaríí (benigní cysty, leiomyomy apod.) získaných z Fakultní nemocnice Motol v Praze. Všechny diagnózy byly histopatologicky ověřeny. U pacientek byly sledovány klinicko-patologické charakteristiky uvedené v Tab. 2. Všechny pacientky podepsaly formulář informovaného souhlasu ve shodě s Helsinskou deklarací a studie byla schválena etickými komisemi Státního zdravotního ústavu a klinických pracovišť v Praze a Plzni.

Vzorky tkání byly ihned po odebrání zmrazeny a uchovávány v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  před dalším zpracováním. RNA byla ze vzorků izolována pomocí AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kitu (Qiagen, Hildesheim, Německo) dle instrukcí výrobce. Celková RNA byla kvantifikována pomocí Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kitu (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA). Pro syntézu cDNA bylo použito 0,5  $\mu\text{g}$  celkové RNA a kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, Vilnius, Litva). Případná kontaminace genomovou DNA byla posouzena PCR amplifikací dříve popsanou metodou (45). Následně byla

**Tab. 2** Klinicko-patologická data pacientek s primárními nádory nebo peritoneálními metastázami EOC

Charakteristika	Primární EOC N (%)	Metastázy N (%)
<i>Průměrný věk v době diagnózy</i>	63,0 ± 8,1	62,0 ± 12,6
<i>FIGO stadium</i>		
I	3 (13,0)	0
II	3 (13,0)	0
III	16 (69,6)	13 (81,3)
IV	1 (4,3)	3 (18,8)
<i>EOC typ</i>		
HGSOC	16 (69,6)	12 (75,0)
jiné typy	7 (30,4)	3 (18,8)
neurčeno	0	1 (6,3)
<i>Histologický grade</i>		
1	3 (13,0)	1 (6,3)
2	2 (8,7)	14 (87,5)
3	18 (78,3)	1 (6,3)
<i>Vzdálené metastázy</i>		
M1	1 (4,3)	3 (18,8)
M0	15 (65,2)	7 (43,8)
neurčeno	7 (30,4)	6 (37,5)

cDNA preamplifikována. Preamplifikační směs obsahovala 5× PerfeCTa PreAmp Super-Mix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, Maryland, USA), směs TaqMan Gene Expression Assays (0,2× každá; Life Technologies, Foster City, Kalifornie, USA; seznam použitých assays je uveden v Tab. 3, 10× ředěnou cDNA a ultračistou vodu v celkovém množství 25 µl. Bylo použito 14 preamplifikačních cyklů podle doporučení výrobce. Preamplifikovaná cDNA byla uchovávána při –20 °C před vlastní PCR kvantifikací.

### **Analýza genového expresního profilu pomocí real-time PCR**

Stanovení relativní hladiny exprese kazety genů uvedených v (Tab. 3) bylo provedeno pomocí přístroje ViiA7 Real-Time PCR System (Life Technologies). Reakční směs obsahovala 2× TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies), 20× TaqMan Gene Expression Assay specifickou pro každý sledovaný gen (Tab. 3), 2 µl cDNA ředěné 32× v TE pufru a byla doplněna ultračistou vodou do celkového objemu 5 µl. Podmínky PCR amplifikace v reálném čase byly následující: počáteční aktivace HotStar Taq polymerázy 2 min při 50 °C, úvodní denaturace 10 min při 95 °C následovaná 45 cykly sestávajícími se z denaturace 15 sec při 95 °C a annealingu/extenze 60 sec při 60 °C. Všechny vzorky

**Tab. 3** Seznam studovaných genů a TaqMan Gene Expression Assays použitých pro měření genové exprese pomocí real-time PCR

Symbol genu	TaqMan Assay ID	Gene Bank Acces. No.	Název genu	Délka ampliconu [bp]
PPIA	Hs99999904_m1	NM_021130.3	Peptidylprolyl isomerase A	98
UBC	Hs00824723_m1	NM_021009.5	Ubiquitin C	71
YWHAZ	Hs03044281_g1	NM_001135700.1	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	106
ABCA1	Hs00194045_m1	NM_005502.3	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	125
ABCA2	Hs00242232_m1	NM_212533.2	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2	58
ABCA3	Hs00184543_m1	NM_001089.2	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 3	77
ABCA7	Hs00185303_m1	NM_019112.3	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 7	80
ABCA8	Hs00992371_m1	NM_007168.2	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 8	85
ABCA9	Hs00329320_m1	NM_080283.3	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 9	145
ABCA10 <sup>a</sup>	Hs00365268_m1	NM_080282.3	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 10	127
ABCA12	Hs00292421_m1	NR_103740.1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	77
ABCA13	Hs01110169_m1	NM_152701.3	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 13	80
ABCB1	Hs00184491_m1	NM_000927.4	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	110
ABCB2	Hs00388677_m1	NM_000593.5	Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	60
ABCB3	Hs00241060_m1	NM_018833.2	Transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	66
ABCB4	Hs00240956_m1	NM_018850.2	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	73
ABCB11	Hs00184824_m1	NM_003742.2	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 11	63
ABCC1	Hs00219905_m1	NM_004996.3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1	74
ABCC2	Hs00166123_m1	NM_000392.3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2	75
ABCC3	Hs00358656_m1	NM_003786.3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	98
ABCC4	Hs00195260_m1	NM_005845.3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4	86
ABCC5	Hs00981089_m1	NM_005688.2	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5	68

Při real-time PCR byla standardní teplota 60 °C, <sup>a</sup>teplota annealingu 62 °C, <sup>b</sup>teplota annealingu 58 °C.



byly analyzovány v duplikátech. Negativní kontrolní reakce obsahovala vodu místo vyšetřované cDNA. Jako referenční geny pro normalizaci výsledků byly použity PPIA, UBC a YWHAZ.

### **Statistická analýza dat**

Rozdíly v hladinách genové exprese mezi kontrolami, primárními nádory a metastázami EOC byly stanoveny pomocí softwaru REST 2009 (Qiagen). Míra exprese vzhledem ke klinicko-patologickým datům byla hodnocena pomocí softwaru SPSS v16.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA). Hodnota  $P < 0,05$  byla považována za signifikantní a vždy byla výstupem oboustranných testů. Kontrola poměrného množství falešně pozitivních výsledků byla provedena pomocí FDR testu (False Discovery Rate) dle Benjaminiho a Hochberga a Q-hodnoty byly vypočítány pro každé porovnání.

## **VÝSLEDKY A DISKUSE**

Expresní profil 61 genů byl stanoven ve vzorcích benigní ovariální tkáně získaných od 14 pacientek, ve vzorcích primárních karcinomů ovaria od 23 pacientek a ve vzorcích peritoneálních metastáz EOC od 16 pacientek. Cílem studie bylo najít kandidátní markery rozvoje EOC a markery související s metastatickým potenciálem, které hrají roli při vzniku metastáz EOC. Takové markery by byly dále využitelné k prognóze a odhadu progresu onemocnění, k určení maligního potenciálu suspektních lézí či *in situ* karcinomů a pro prognózu metastatického šíření rakoviny vaječníků.

### **Porovnání genové exprese v benigní ovariální tkáni a v primárních nádorech**

Při porovnání primární nádorové tkáně a benigní ovariální tkáně bylo nalezeno 19 genů se sníženou a 13 genů se zvýšenou expresí v nádorové tkáni (Tab. 4). Z genů s významně nižší expresí v nádorové tkáni ovarií byly geny ABCA8/9/10/12, ABCB1, ABCC9, ABCD3, ABCE1, ABCF3, ABCG2, ATP11B, ATP7A, EGFR, NR1H4, SLC16A14, SLC22A3, SLC22A5, SLC47A1 a TRAP1 potvrzeny i FDR korekcí pro vícenásobné testování. Z genů s významně vyšší expresí v nádorové oproti benigní tkáni ovarií byly FDR testem potvrzeny geny ABCA2/7/13, ABCC3/C5/C10, HER2, MKI67, MSH2, NR1I1, PLK1 a SLC22A18.

Z dosud ojedinělých výstupů v literatuře sledujících expresi konkrétních transportérů naše současná data potvrzují nedávno nalezenou, více než desetinásobně sníženou, expresi ABCA8 v EOC oproti kontrolní tkáni (46). Potenciální význam ABCA8 pro prognózu onemocnění (32, 46) ale v naší pilotní studii nalezen nebyl. Z dalších ABC transportérů byla nalezena zvýšená exprese ABCC3 v EOC v porovnání s benigními tkáněmi také v dříve publikované práci (47). Významné zvýšení exprese ABCC5 a ABCC10 v primárních nádorech v naší současné studii pak naznačuje, že nedávno nalezená účast těchto genů v *in vitro* resistenci vůči platině (48) a taxanům (49) je relevantní pro EOC.

**Tab. 4** Porovnání exprese genů mezi kontrolní tkání, primárními EOC a metastázami EOC

Gen	Typ <sup>a</sup>	Expresní diference	Primární EOC vs. kontroly		Metastázy EOC vs. primární EOC	
			<i>P</i> -hodnota	Trend	<i>P</i> -hodnota	Trend
PPIA	REF	1,05				
UBC	REF	0,84				
YWHAZ	REF	1,14				
ABCA1	TRG	1,00	0,994		0,291	
ABCA10	TRG	5,30	< 0,001	↓	0,918	
ABCA12	TRG	0,06	0,018	↓	0,295	
ABCA13	TRG	0,07	< 0,001	↑	0,952	
ABCA2	TRG	0,36	0,019	↑	0,674	
ABCA3	TRG	0,69	0,115		0,887	
<b>ABCA7</b>	<b>TRG</b>	5,30	< 0,001	↑	0,029	↑
ABCA8	TRG	0,06	< 0,001	↓	0,556	
ABCA9	TRG	0,07	< 0,001	↓	0,920	
ABCB1	TRG	0,36	< 0,001	↓	0,095	
ABCB11	TRG	3,46	0,124		0,312	
ABCB2	TRG	1,61	0,074		0,147	
ABCB3	TRG	1,62	0,033	↑	0,124	
ABCB4	TRG	0,55	0,098		0,228	
ABCC1	TRG	1,25	0,090		0,100	
ABCC10	TRG	1,34	0,012	↑	0,913	
ABCC2	TRG	1,29	0,130		0,012	↑
ABCC3	TRG	6,76	< 0,001	↑	0,764	
ABCC4	TRG	1,25	0,211		0,188	
ABCC5	TRG	1,68	0,001	↑	0,440	
ABCC6	TRG	1,18	0,581		0,744	
ABCC9	TRG	0,19	< 0,001	↓	0,073	
ABCD1	TRG	1,04	0,818		0,142	
ABCD2	TRG	1,01	0,960		0,051	
ABCD3	TRG	0,80	0,017	↓	0,080	
ABCD4	TRG	1,02	0,893		0,855	
ABCE1	TRG	0,70	< 0,001	↓	0,333	
ABCF1	TRG	1,09	0,475		0,535	
ABCF2	TRG	1,10	0,395		0,357	
ABCF3	TRG	0,74	0,003	↓	0,109	

Gen	Typ <sup>a</sup>	Expresní diference	Primární EOC vs. kontroly		Metastázy EOC vs. primární EOC	
			P-hodnota	Trend	P-hodnota	Trend
ABCG1	TRG	1,06	0,789		0,203	
ABCG2	TRG	0,13	< 0,001	↓	0,913	
ABCG8	TRG	0,77	0,738		0,641	
ATOX1	TRG	1,18	0,192		0,833	
ATP11B	TRG	0,55	< 0,001	↓	0,635	
ATP7A	TRG	0,42	< 0,001	↓	0,457	
ATP7B	TRG	1,22	0,258		0,029	↓
EGFR	TRG	0,39	< 0,001	↓	0,670	
GLRX	TRG	1,06	0,827		0,131	
HER2	TRG	1,46	0,013	↑	0,319	
MKI67	TRG	48,18	< 0,001	↑	0,276	
MSH2	TRG	1,45	0,002	↑	0,093	
NR0B2	TRG	0,90	0,877		0,119	
<b>NR1H4</b>	TRG	0,01	< 0,001	↓	0,050	↓
NR1H1	TRG	10,13	< 0,001	↑	0,889	
NR1H2	TRG	1,13	0,684		0,678	
PLK1	TRG	14,18	< 0,001	↑	0,551	
PLK2	TRG	1,03	0,891		0,414	
PMS1	TRG	0,88	0,286		0,038	↓
SLC16A14	TRG	0,17	< 0,001	↓	0,506	
SLC22A1	TRG	1,23	0,337		0,531	
SLC22A18	TRG	1,64	0,003	↑	0,819	
SLC22A3	TRG	0,09	< 0,001	↓	0,206	
SLC22A4	TRG	1,21	0,472		0,927	
SLC22A5	TRG	0,73	0,022	↓	0,098	
SLC31A1	TRG	1,37	0,055		0,970	
SLC31A2	TRG	1,03	0,903		0,034	↑
SLC47A1	TRG	0,33	0,008	↓	0,894	
SOD2	TRG	1,02	0,923		0,342	
TP53	TRG	0,76	0,150		0,749	
TRAP1	TRG	0,71	< 0,001	↓	0,889	

<sup>a</sup>REF = referenční gen, TRG (target gene) = cílový gen; ↓ = snížení genové exprese, ↑ = zvýšení genové exprese; šedou barvou jsou podbarveny vzorky, které byly potvrzeny FDR testem, **tučně jsou zobrazeny vzorky s významným trendem v expresním profilu**

Zvýšená exprese genu PLK1 souhlasí s nedávnou studií porovnávající EOC a benigní ovaria, ale v této práci byla zjištěna i up-regulace TP53 (50), kterou současná studie nenalezla. Nelze tedy potvrdit existenci propojení zvýšených hladin exprese PLK1 a TP53 s pozdním stadiem onemocnění, gradem a horším přežíváním EOC pacientek naznačeného předchozí studií. Více světla by do problému mohla vnést analýza mutací TP53, která je častým jevem charakteristickým pro HGSC (TP53 mutace u 96 % z nich) dle TCGA studie (51).

### **Porovnání genové exprese primárních nádorů a metastáz**

Tkáň peritoneálních metastáz EOC se lišily od primárních nádorů mnohem méně než oproti kontrolní tkáni. Metastázy tedy mají expresní profil srovnatelný s nádorovou tkání s několika významnými rozdíly. Z 61 sledovaných genů byla v metastázách oproti primárním nádorům u 3 genů snížena exprese (ATP7B, NR1H4 a PMS1) a u 3 genů zvýšena (ABCA7, ABCC2 a SLC31A2; Tab. 4). Žádný z těchto vztahů nebyl v toleranci FDR korekce, což ukazuje na možnou falešnou pozitivitu některých výsledků. Z tohoto důvodu jsme se zaměřili na tendenci a směr změn genové exprese těchto genů mezi jednotlivými typy vzorků ovariálních tkání. Zajímavý se ukázal být expresní profil genu ABCA7, jehož exprese významně narůstala v rámci rozvoje nádoru směrem: kontrolní tkáň < primární EOC < EOC metastáza. Oproti tomu gen NR1H4 měl opačnou tendenci, tzn. exprese byla významně nižší v nádorech oproti benigní ovariální tkáni a ještě nižší v metastázách: kontrolní tkáň > primární EOC > EOC metastáza. Tyto konzistentní výsledky nás opravňují k předpokladu, že se jedná o významné změny, jejichž potenciální souvislost s rozvojem ovariálního karcinomu, by bylo vhodné validovat na větším počtu vzorků.

Zvýšená exprese ABCA7 byla zatím pozorována v karcinomech pankreatu (28) a prsu (29). Jeví se být ale spíše pozitivním prognostickým faktorem, protože dosud jediná práce korelující vztah ABCA7 exprese s prognózou byla provedena u pacientů s kolorektálním karcinomem a ukázala souvislost nízké hladiny ABCA7 s kratším bezpříznakovým přežíváním a zvýšeným rizikem progresu (30). Tento gen zajímavý pro další studium je effluxním transportérem fosfolipidů a cholesterolu z buněk do extracelulárního prostoru (52). Zvýšená exprese ABCA7 nejspíše nebude přispívat ke vzniku rezistence na léčiva používaná v terapii EOC, protože na jejich transportu se, dle dostupných údajů, nepodílí. Pravděpodobnějším se jeví kauzální spojení s jeho fyziologickou funkcí, která významně ovlivňuje metabolismus lipidů a s ním spojené buněčné procesy nutné pro výživu a přežití nádorových buněk. ABCA7 tak představuje další z možných cílů pro vývoj biologické terapie nádorů.

Druhým zajímavým genem je NR1H4 (Farnesoid x-activated receptor), který se podílí na regulaci metabolismu žlučových kyselin, lipidů, cholesterolu a glukosy (53, 54). Snížená hladina NR1H4 genu je spojována s progresí karcinomu střeva, EMT (55) a horší prognózou (56). V souladu s těmito daty a v současné studii nalezeným umlčováním exprese NR1H4 během progresu nádoru se ukazuje, že cílená manipulace hladiny NR1H4 by mohla být slibným terapeutickým nástrojem nádorové terapie. Ani jeden z genů ABCA7 a NR1H4 dosud nebyl vzhledem k rozvoji EOC, progresi onemocnění či metastatickému rozsevu studován a jejich potenciální využití jako prediktivních markerů EOC progresu je nutné do detailu prozkoumat. Může existovat funkční propojení obou těchto genů, protože

například byla nalezena interakce NR1H4 s dalším z ABC transportérů, genem ABCB1, v procesu aktivace transportéru na myším modelu (57).

### **Korelace genové exprese s klinicko-patologickými daty pacientek**

Na základě různorodého profilu genové exprese v našich vzorcích jsme dále hledali souvislosti mezi expresí sledovaných markerů v nádorové tkáni, stádiem, histologickým typem a gradem nádoru a přítomností vzdálených metastáz u pacientek s EOC. Vyšší hladina exprese ABCA3 byla nalezena u HGSC ( $P = 0,018$ ) v porovnání s ostatními histologickými typy nádoru. Tumor supresorový gen TP53 a mismatch repair gen MSH2 měly významně nižší hladinu exprese v nádorech pacientek ve vyšším stadiu onemocnění ( $P = 0,030$ ;  $P = 0,022$ ). Kvůli malému počtu vzorků ve srovnávaných skupinách je ovšem třeba brát tyto výsledky jako pilotní, odkazující na potenciální kandidátní markery, které bude nutno ověřit na větším validačním setu vzorků.

Protein p53 je známým tumor supresorem a souvislost jeho nízké exprese na úrovni transkriptu s pozdním stadiem EOC, kterou zjistila současná studie, podporuje předchozí údaje o jeho protinádorovém působení. Sledovanou skupinu vzorků ze 70 % tvořily HGSC spadající do typu II ovariálního karcinomu. Vysoké hladiny TP53 byly nalezeny i v časném stadiu HGSC a imunoprecipitací u mucinosního karcinomu (43) spadajícího do typu I ovariálních karcinomů. Výsledky tak dokazují alteraci exprese p53 vzhledem k histotypu a stadiu onemocnění.

Dalším genem, jehož exprese byla významně zvýšená v nádorové oproti kontrolní tkáni, je jeden z klíčových MMR genů MSH2. Nestabilita mikrosatelitů (MSI) je u EOC poměrně často pozorovaným jevem (58) a snížení exprese některého z MMR genů bylo pozorováno u téměř 30 % EOC (44). Nicméně úloha MMR genů v prognóze, progresi i vzniku metastáz EOC dosud nebyla důkladně prostudována. V současné práci byla nalezena zvýšená exprese MSH2 v nádorech pacientek s pozdním stadiem nádoru, což naznačuje jeho význam v progresi EOC. Na druhou stranu absence deregulace exprese MSH2 v metastázách naznačila, že tento gen pro metastatický rozsev pravděpodobně nemá zásadní význam. V souladu s tímto předpokladem dříve Shilpa a kol. (58) na úrovni proteinu nepozorovali deregulaci exprese MMR genů (MLH1, MSH2, PMS2) ve vzorcích EOC oproti normálním ovariím, přesto že MSI byla nalezena u více jak 60 % nádorů a rovněž byla detekována methylace MLH1 genu. Chybějící korelace MSI, methylace a exprese proteinu dále naznačily možnost nezávislé existence těchto fenoménů.

Na závěr lze konstatovat, že současná pilotní studie ukázala na možný vliv genů ABCA3, ABCA7, MSH2, NR1H4 a TP53 v progresi EOC. Výsledky bude třeba ověřit jak validační studií na větším počtu pacientek tak i na funkční úrovni.

### **PODĚKOVÁNÍ**

Projekt byl podpořen grantem IGA NT14056-3 a projektem institucionální podpory výzkumu Státního zdravotního ústavu v Praze pod záštitou MZ ČR: MH CZ DRO (National Institute of Public Health – NIPH, 75010330).

Karcinom vaječníků je nejčastější příčinou úmrtí na gynekologické malignity. Molekulární mechanismy vzniku karcinomu vaječníků nejsou důkladně prozkoumány a chybí specifické genetické markery progresu a rozvoje metastáz maligních epiteliálních ovariálních nádorů (EOC) využitelné jak v prognóze, tak při návrhu co nejefektivnější individuální terapie. Cílem této studie bylo poskytnout informaci o expresním profilu genů (membránových ABC a SLC transportérů, genů souvisejících s metabolismem a deaktivací cytostatik, regulací buněčného cyklu a opravným mechanismem DNA) v primární nádorové tkáni EOC, tkáni intraperitoneálních metastáz EOC a v ovariích nepostižených maligním procesem. Tato studie rovněž poskytla pilotní data o vztazích expresního profilu studovaných genů ke klinickým charakteristikám EOC. U 32 z 61 genů vybraných do studie byla nalezena odlišná exprese v primární nádorové tkáni oproti nenádorové ovariální tkáni. Exprese šesti genů se významně lišila v metastázách oproti primárním EOC tkáním. Nejvýznamnější se zdá být tendence zvyšující se exprese genu ABCA7 od benigní tkáně přes tkáň primárního nádoru až k metastázám a naopak snižující se exprese genu NR1H4 ve stejném sledu tkání. Exprese genů ABCA3, TP53 a MSH2 v nádorové tkáni korelovala s klinicko-patologickými charakteristikami EOC. V této studii byly tedy nalezeny některé nové kandidátní markery progresu EOC, zejména: ABCA3, ABCA7, MSH2, NR1H4 a TP53, jejichž potenciální využití v klinickém testování bude dále hodnoceno na větším souboru pacientek.

***Markers of progression and development  
of metastases in ovarian carcinomas estimated  
using gene expression profiles***

SUMMARY

Ovarian cancer is the most lethal gynecological malignancy. Molecular mechanisms of ovarian cancer development are not fully understood. Specific genetic markers of epithelial ovarian cancer (EOC) progression and development of metastases enabling better prognostication and targeted therapies are lacking. The aim of this study was to give an overview of gene expression profiling (ABC and SLC transporter genes, genes associated with drug metabolism and inactivation, cell cycle regulation and mismatch DNA repair mechanism) between primary EOC tissues, EOC metastases, and benign ovaries. This study also provided information about associations of gene expression profile with clinicopathological features of EOC patients. Overall, among 61 estimated genes, 32 genes were deregulated in primary EOC compared to controls. Moreover, six genes were deregulated in metastases compared to primary tumors. Increasing tendency in ABCA7 expression in direction benign ovaries < primary tumors < metastases and opposite tendency for NR1H4 expression was observed. MSH2 and TP53 gene expression significantly associated with EOC stage and that of ABCA3 gene was significantly increased in high-grade serous

tumors. Our study revealed several novel markers of EOC progression; ABCA3, ABCA7, MSH2, NR1H4, and TP53 genes seem to be the most interesting ones. The potential clinical utility of these candidate markers needs to be validated by a larger independent study.

## LITERATURA

1. Lu K. H., Skates S., Hernandez M. A. et al.: A 2-stage ovarian cancer screening strategy using the Risk of Ovarian Cancer Algorithm (ROCA) identifies early-stage incident cancers and demonstrates high positive predictive value. *Cancer* 119, 2013: 3454–61. – 2. Robová H., Rob L., Pluta M. et al.: Treatment of recurrent ovarian cancer. *Ceska Gynekol.* 74, 2009: 464–8. – 3. Le Page C., Huntsman D. G., Provencher D. M. et al.: Predictive and prognostic protein biomarkers in epithelial ovarian cancer: recommendation for future studies. *Cancers (Basel)*. 2, 2010: 913–54. – 4. Vlasak P., Presl J., Bouda J. et al.: předoperační diagnostika ovariálních nádorů a management pacientek s primárně inoperabilním maligním nádorem vaječníku. *Plzeň. Lék. Sborn.* 80, 2014: 67–80. – 5. Ramus S. J., Harrington P. A., Pye C. et al.: Contribution of BRCA1 and BRCA2 mutations to inherited ovarian cancer. *Hum. Mutat.* 28, 2007: 1207–15. – 6. Song H., Cicek M. S., Dicks E. et al.: The contribution of deleterious germline mutations in BRCA1, BRCA2 and the mismatch repair genes to ovarian cancer in the population. *Hum. Genet.* 23, 2014: 4703–9. – 7. Bolton K. L., Chenevix-Trench G., Goh C. et al.: Association between BRCA1 and BRCA2 mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer. *JAMA* 307, 2012: 382–90. – 7. Hyman D. M., Zhou Q., Iasonos A. et al.: Improved survival for BRCA2-associated serous ovarian cancer compared with both BRCA-negative and BRCA1-associated serous ovarian cancer. *Cancer* 118, 2012: 3703. – 9. Girolimetti G., Perrone A. M., Santini D. et al.: BRCA-associated ovarian cancer: from molecular genetics to risk management. *Biomed. Res. Int.* 2014: 787143. – 10. Alsop K., Fereday S., Meldrum C. et al.: BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: a report from the Australian Ovarian Cancer Study Group. *J. Clin. Oncol.* 30, 2012: 2654–63. – 11. Safra T., Lai W. C., Borgato L. et al.: BRCA mutations and outcome in epithelial ovarian cancer (EOC): experience in ethnically diverse groups. *Ann. Oncol.* 24 (Suppl. 8), 2013: viii63–viii68. – 12. Audeh M. W., Carmichael J., Penson R. T. et al.: Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet.* 376, 2010: 245–51. – 13. Desmond A., Kurian A. W., Gabree M. et al.: Clinical Actionability of Multigene Panel Testing for Hereditary Breast and Ovarian Cancer Risk Assessment. *JAMA Oncol.* 2015, doi: 10.1001/jamaoncol.2015.2690. – 14. Song H, Dicks E, Ramus S. J. et al.: Contribution of Germline Mutations in the RAD51B, RAD51C, and RAD51D Genes to Ovarian Cancer in the Population. *J. Clin. Oncol.* 2015, pii: JCO. 2015. 61. 2408. – 15. Prat J.: New insights into ovarian cancer pathology. *Ann. Oncol.* 23, 2012: x111Yx117. – 16. Kurman R. J., Shih I. M.: The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am. J. Surg. Pathol.* 34, 2010: 433–43. – 17. McCluggage W. G.: Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogene. *Pathology* 43, 2011: 420–32. – 18. Hartmann L. C., Lu K. H., Linette G. P. et al.: Gene expression profiles predict early relapse in ovarian cancer after platinum-paclitaxel chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 11, 2005: 2149–55. – 19. Jazaeri A. A., Awtrey C. S., Chandramouli G. V. et al.: Gene expression profiles associated with response to chemotherapy in epithelial ovarian cancers. *Clin. Cancer Res.* 11, 2005: 6300–10. – 20. Bernardini M., Lee C. H., Beheshti B. et al.: High-resolution mapping of genomic imbalance and identification of gene expression profiles associated with differential chemotherapy response in serous epithelial ovarian cancer. *Neoplasia* 7, 2005: 603–13. – 21. Dressman H. K., Berchuck A., Chan G. et al.: An integrated genomic-based approach to individualized treatment of patients with advanced-stage ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* 25, 2007: 517–25. – 22. Helleman J., Smid M., Jansen M. P. et al.: Pathway analysis of gene lists associated with platinum-based chemotherapy resistance in ovarian cancer: the big picture. *Gynecol. Oncol.* 117, 2010: 170–6. – 23. Gillet J. P., Calcagno A. M., Varma S. et al.: Multidrug resistance-linked gene signature predicts overall survival of patients with primary ovarian serous carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 18, 2012: 3197–206. – 24. Lloyd K. L., Cree I. A., Savage R. S.: Prediction of resistance to chemotherapy in ovarian cancer:

a systematic review. *BMC Cancer* 2015, doi: 10.1186/s12885-015-1101-8. – 25. Nakayama K., Nakayama N., Katagiri H. et al.: Mechanisms of Ovarian Cancer Metastasis: Biochemical Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 2012: 11705–17. – 26. Vergote I., Trope C. G., Amant F. et al.: Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage III or IV ovarian carcinoma. *NEJM* 363, 2010: 943–53. – 27. van Driel W. J., Lok C. A., Verwaal V. et al.: The role of hyperthermic intraperitoneal intraoperative chemotherapy in ovarian cancer. *Curr. Treat. Options. Oncol.* 16, 2015: 14. – 28. Mohelnikova-Duchonova B., Brynychova V., Brynchova V., Olierius M. et al.: Differences in Transcript Levels of ABC Transporters Between Pancreatic Adenocarcinoma and Nonneoplastic Tissues. *Pancreas* 42, 2013: 707–16. – 29. Hlaváč V., Brynychová V., Václavíková R. et al.: The expression profile of ATP-binding cassette transporter genes in breast carcinoma. *Pharmacogenomics* 14, 2013: 515–29. – 30. Hlavata I., Mohelnikova-Duchonova B., Václavikova R. et al.: The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis* 27, 2012: 187–96. – 31. Januchowski R., Zawierucha P., Rucinski M. et al.: Drug transporter expression profiling in chemoresistant variants of the A2780 ovarian cancer cell line. *Biomed. Pharmacother.* 68, 2014: 447–53. – 32. Hedditch E. L., Gao B., Russell A. J. et al.: ABCA Transporter Gene Expression and Poor Outcome in Epithelial Ovarian Cancer. *JNCI* 106, 2014: 10.1093/jnci/dju149. – 33. Bagnoli M., Beretta G. L., Gatti L. et al.: Clinicopathological Impact of ABCC1/MRP1 and ABCC4/MRP4 in Epithelial Ovarian Carcinoma. *BioMed. Res. Int.* 2013, 2013: 143202. – 34. Stewart T. A., Azimi I., Thompson E. W. et al.: A role for calcium in the regulation of ATP-binding cassette, sub-family C, member 3 (ABCC3) gene expression in a model of epidermal growth factor-mediated breast cancer epithelial-mesenchymal transition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458, 2015: 509–14. – 35. Saxena M., Stephens M. A., Pathak H. et al.: Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters. *Cell Death Dis.* 2, 2011: 10.1038/cddis.2011.61. – 36. Rosen D. G., Mercado-Urbe I., Yang G. et al.: The role of constitutively active signal transducer and activator of transcription 3 in ovarian tumorigenesis and prognosis. *Cancer* 107, 2006: 2730–40. – 37. Lo H. W., Hsu S. C., Xia W. et al.: Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer Res.* 67, 2007: 9066–76. – 38. Yue P., Zhang X., Paladino D. et al.: Hyperactive EGF receptor, Jaks and Stat3 signaling promote enhanced colony-forming ability, motility and migration of cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Oncogene* 31, 2012: 2309–22. – 39. Schwartz D. R., Kardias S. L. R., Shedden K. A. et al.: Gene Expression in Ovarian Cancer Reflects Both Morphology and Biological Behavior, Distinguishing Clear Cell from Other Poor-Prognosis Ovarian Carcinomas. *Cancer Res.* 62, 2002: 4722–9. – 40. Kalogiannidis I., Petousis S., Bobos M. et al.: HER-2/neu is an independent prognostic factor in type I endometrial adenocarcinoma. *Arch. Gynecol. Obstet.* 290, 2014: 1231–7. – 41. Wang Y., Dong L., Cui H. et al.: Up-regulation of mitochondrial antioxidation signals in ovarian cancer cells with aggressive biologic behavior. *J. Zhejiang Univ., Sci., B. (Biomed & Biotechnol)* 12, 2011: 346–56. – 42. Liew P. L., Hsu, C. S., Liu W. M. et al.: Prognostic and predictive values of Nrf2, Keap1, p16 and E-cadherin expression in ovarian epithelial carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 2015: 5642–9. – 43. Kamal C. K., Simionescu C. E., Margaritescu C. L. et al.: P53 and Ki67 immunorexpression in mucinous malignant ovarian tumors. *Rom. J. Morphol. Embryol.* 53 (3 Suppl), 2012: 799–803. – 44. Xiao X., Melton D. W., Gourley C.: Mismatch repair deficiency in ovarian cancer – molecular characteristics and clinical implications. *Gynecol. Oncol.* 132, 2014: 506–12. – 45. Soucek P., Anzenbacher P., Skoumalova I. et al.: Expression of cytochrome P450 genes in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cell* 23, 2005: 1417–22. – 46. Liu X., Gao Y., Zhao B. et al.: Discovery of microarray-identified genes associated with ovarian cancer progression. *Int. J. Oncol.* 46, 2015: 2467–78. – 47. Auner V., Sehoul J., Oskay-Oezcelik G. et al.: ABC transporter gene expression in benign and malignant ovarian tissue. *Gynecol. Oncol.* 117, 2010: 198–201. – 48. Li B., Chen H., Wu N. et al.: Deregulation of miR-128 in ovarian cancer promotes cisplatin resistance. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 24, 2014: 1381–8. – 49. Hopper-Borge E. A., Churchill T., Paulose C. et al.: Contribution of Abcc10 (Mrp7) to in vivo paclitaxel resistance as assessed in Abcc10(–/–) mice. *Cancer Res.* 71, 2011: 3649–57. – 50. Zhang R., Shi H., Ren F. et al.: Misregulation of polo-like protein kinase 1, P53 and P21/WAF1 in epithelial ovarian cancer suggests poor prognosis. *Oncol. Rep.* 33, 2015: 1235–42. – 51. Cancer Genome Atlas Research Network (2011) Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 474: 609–615. – 52. Abe-Dohmae S., Ikeda Y., Matsuo M. et al.: Human ABCA7 Supports Apolipoprotein-mediated Release of Cellular Cholesterol and Phospholipid to Generate High Density Lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 279, 2004: 604–611. – 53. Cariou B., van Harmelen K., Duran-Sandoval D.



et al.: The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *J. Biol. Chem.* 281, 2006: 11039–49. – 54. Forman B. M., Goode E., Chen J. et al.: Identification of Nuclear Receptor That Is Activated by Farnesol Metabolites. *Cell* 81, 1995: 687–93. – 55. Bailey A. M., Zhan L., Maru D. et al.: FXR silencing in human colon cancer by DNA methylation and KRAS signaling. *Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol.* 306, 2014: G48–G58. – 56. Lax S., Schauer G., Prein K. et al.: Expression of the nuclear bile acid receptor/farnesoid X receptor is reduced in human colon carcinoma compared to nonneoplastic mucosa independent from site and may be associated with adverse prognosis. *Int. J. Cancer.* 130, 2012: 2232–9. – 57. Jiang Y., Jin J., Iakova P. et al.: Farnesoid X receptor directly regulates xenobiotic detoxification genes in the long-lived Little mice. *Mech. Ageing Dev.* 134, 2013: 407–15. – 58. Shilpa V., Bhagat R., Premalata C. S. et al.: Microsatellite instability, promoter methylation and protein expression of the DNA mismatch repair genes in epithelial ovarian cancer. *Genomics* 104, 2014: 257–63. – 59. Siamakpour-Reihani S., Owzar K., Jiang C. et al.: Prognostic significance of differential expression of angiogenic genes in women with high-grade serous ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 2015 Aug 7. pii: S0090-8258(15)30095-0. doi: 10.1016/j.ygyno.2015. 08. 001. [Epub ahead of print]. – 60. Lisowska K. M., Olbryt M., Dudaladava V.: Gene expression analysis in ovarian cancer – faults and hints from DNA microarray study. et al.: *Front Oncol.* 4, 2014:6. doi: 10.3389/fonc.2014.00006. eCollection 2014. – 61. May T., Shoni M., Crum C. P. et al.: Low-grade and high-grade serous Mullerian carcinoma: review and analysis of publicly available gene expression profiles. *Gynecol. Oncol.* 128, 2013: 488–92. – 62. Jeong W., Kim S. B., Sohn B. H. et al.: Activation of yap1 is associated with poor prognosis and response to taxanes in ovarian cancer. *Anticancer Res.* 34, 2014: 811–7. – 63. Han Y., Huang H., Xiao Z. et al.: Integrated analysis of gene expression profiles associated with response of platinum/paclitaxel-based treatment in epithelial ovarian cancer. *PLoS One.* 7, 2012: 52745. – 64. Hsu F. H., Serpedin E., Hsiao T. H. et al.: Reducing confounding and suppression effects in tcga data: an integrated analysis of chemotherapy response in ovarian cancer. *BMC Genomics.* 13, Suppl 6, 2012: 13. – 65. Liu Y., Sun Y., Broadus R. et al.: Integrated analysis of gene expression and tumor nuclear image profiles associated with chemotherapy response in serous ovarian carcinoma. *PLoS One.* 7, 2012: 36383. – 66. Sabatier R., Finetti P., Bonense J. et al.: A seven-gene prognostic model for platinum-treated ovarian carcinomas. *Br. J. Cancer.* 105, 2011: 304–11. – 67. Spentzos D., Levine D. A., Kolia S. et al.: Unique gene expression profile based on pathologic response in epithelial ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* 23, 2005: 7911–8. – 68. Spentzos D., Levine D. A., Ramoni M. F. et al.: Gene expression signature with independent prognostic significance in epithelial ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* 22, 2004: 4700–10.

Adresa autorů: R. V., Oddělení toxikogenomiky, CTZB, Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10