

Biochemiczne markery w skryningu raka jajnika

Biochemical markers for screening of ovarian cancer

Joanna Tkaczuk-Włach¹, Małgorzata Sobstyl¹, Grzegorz Jakiel²

¹Katedra i Klinika Ginekologii i Endokrynologii Ginekologicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. n. med. Lechosław Putowski

²Klinika Położnictwa i Ginekologii, CMKP w Warszawie
kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. Grzegorz Jakiel

Przeгляд Menopauzalny 2013; 5: 442–445

Streszczenie

Rak jajnika charakteryzuje się bardzo wysoką śmiertelnością wśród nowotworów dotyczących układu rodowego. Mimo dynamicznego rozwoju nowych sposobów terapii poziom pięcioletnich przeżyć wciąż jest mniejszy niż 20%.

Niniejsza praca stanowi przegląd wiedzy dotyczącej wykorzystania stosowanych już markerów i potencjalnych nowych testów we wczesnej diagnostyce zmian nowotworowych w jajnikach.

Słowa kluczowe: jajnik, rak jajnika, markery nowotworowe, skryning.

Summary

Ovarian cancer has the highest mortality rate among gynecological cancer.

Despite the development of new treatments five-year survival rates fall below 20%.

This article is a review of the knowledge of the current markers and potential screening tests and their role in early detection of ovarian cancer.

Key words: ovary, ovarian cancer, markers for cancer, screening test.

Liczba zachorowań i zgonów z powodu nowotworów w ciągu ostatnich trzech dekad gwałtownie wzrosła wśród Polek. Zachorowania wzrosły dwukrotnie – o prawie 40 tys. przypadków, natomiast towarzyszący temu zjawisku wzrost liczby zgonów ocenia się na ok. 14 tys. [1].

Największa liczba zachorowań na nowotwory w Polsce przypada na grupę wiekową 50–79 lat. Należy przy tym zauważyć, że w grupie wiekowej 25–54 lata współczynniki zachorowalności na nowotwory są wyższe u kobiet niż u mężczyzn nawet o 1,2–2 razy [1].

Według światowych i polskich rejestrów istnieje stała tendencja do wzrostu zachorowalności na raka jajnika. I tak jest ona najwyższa w Europie, natomiast najmniej przypadków tego nowotworu odnotowuje się w Afryce [2, 3]. W Polsce w 2010 r. stwierdzono 3587 przypadków zachorowań [1].

W populacji kobiet młodych (20–44 lata) rak jajnika jest trzecią – po raku piersi i szyjki macicy – przyczyną zachorowań (6%) i zgonów (9%) [1].

U Polek w 2010 r. najczęściej rejestrowany był nowotwór złośliwy piersi – 22,4%, następnie jelita grubego – 10,1%, płuca – 8,6%, trzonu macicy – 7,3%, wreszcie jajnika – 5,1% i szyjki macicy – 4,4%. Zachorowalność na raka jajnika w Polsce w 2010 r. wynosiła $11,3/10^5$, natomiast liczony odsetkami zgonów rak jajnika był przyczyną zgonów z przyczyn nowotworowych w 6,2%, w czym wyprzedzał zgon z powodu raka szyjki macicy (4,3%).

Standaryzowany współczynnik umieralności dla raka jajnika dla 2010 r. wg Krajowego Rejestru Nowotworów wynosił $7,0/10^5$ i przewyższa wskaźnik dla raka szyjki macicy ($5,2/10^5$) [1].

Opracowanie wykazujące wysoką czułość i swoistość badania przesiewowego, pozwalającego wykryć raka jajnika w stadium umożliwiającym skuteczne jego wyleczenie, jest jednym z ważniejszych wyzwań współczesnej medycyny.

Za markery nowotworowe uważa się substancje powstające zarówno w tkankach zmienionych nowotworowo, jak i tych zdrowych, w wyniku obecności procesu

Adres do korespondencji:

Joanna Tkaczuk-Włach, Katedra i Klinika Ginekologii i Endokrynologii Ginekologicznej UM w Lublinie, Al. Raławskie 23, 20-037 Lublin

nowotworowego. Uwalniane są one do krążenia i mogą być wykrywane metodami biochemicznymi. Wśród nich znajdują się zróżnicowane pod względem chemicznym cząsteczki – najczęściej są to białka: glikoproteiny, lipoproteiny, hormony, enzymy, receptory [4, 5].

W tradycyjnym ujęciu poszukuje się w onkologii takich markerów, których zmienione stężenie w surowicy chorego pozwalałoby na wykrycie zmiany nowotworowej jeszcze w fazie przedklinicznej.

Tymczasem rak jajnika to nowotwór, który obecnie jest wykrywany i leczony w zaawansowanych klinicznie stanach. Wiąże się to z wysokim ryzykiem nawrotu i niską przeżywalnością chorych. Brak charakterystycznych objawów dla wczesnych postaci choroby jest jedną z głównych przyczyn tego, że tylko 25% raków jajnika rozpoznawanych jest w pierwszym stadium choroby wg FIGO, kiedy guz ograniczony jest do jajnika lub jajników. W pozostałej większości przypadków już w chwili rozpoznania mamy do czynienia z istnieniem przerzutów [6].

Obecnie nie są dostępne żadne testy, które spełniałyby kryteria badań skriningowych w kierunku raka jajnika.

Wśród przyczyn takiego stanu wymienia się m.in. niską czułość i swoistość dostępnych testów w wykrywaniu choroby oraz brak wystarczającej wiedzy w zakresie biologii stanów przedrakowych, których leczenie – jak np. w raku szyjki macicy – przynosiłoby wymierny efekt w postaci obniżenia śmiertelności z powodu raka jajnika [7, 8].

Obecnie w zasadzie dwa markery nowotworowe – antygen CA125 oraz białko HE4 – mają szerokie zastosowanie kliniczne i im poświęcono w niniejszym artykule najwięcej miejsca.

CA125 (MUC16) jest markerem szeroko stosowanym w praktyce klinicznej jako „złoty standard”, szczególnie w ginekologii onkologicznej, w przypadkach podejrzanych o raka jajnika [9]. To glikoproteina, z czułością określaną na 50–60% oraz swoistością sięgającą 90% w populacji kobiet we wczesnym okresie pomenopauzalnym. U pacjentek z nabłonkowym rakiem jajnika jej stężenie jest znacząco zwiększone u ok. 90% z nich [4, 7–9].

Za górną granicę normy przyjmuje się ogólnie wartość 35 U/ml. Wskazuje się jednak coraz częściej na konieczność wyróżnienia pewnych grup kobiet, dla których powyższa wartość referencyjna powinna zostać obniżona do 20–26 U/ml. Należą do nich kobiety po menopauzie i histerektomii [8, 10, 11].

Na etapie życia płodowego CA125 ulega ekspresji w tkankach pochodzących z przewodów Müllera i w pierwotnej jamie ciała. U zdrowych dorosłych stwierdza się ekspresję tego białka w błonie śluzowej kanału szyjki i jamy macicy oraz nabłonku wyścielającym jajowody. Rzadko obserwuje się jego obecność na powierzchni jajnika, chociaż stwierdza się CA125 w nabłonku torbieli inkluzyjnych jajnika [10, 11]. Występuje również w nabłonku jam ciała – osierdza, otrzewnej, w komórkach mezotelialnych opłucnej [12].

Białko CA125 uznawane jest za jedno z najlepszych wśród markerów dla raka jajnika pod względem czułości i specyficzności, zwłaszcza w odniesieniu do postaci raka nieśluzowego. Rzadko, ale jego stężenie bywa także podwyższone w guzach o granicznej złośliwości oraz raku jasnokomórkowym.

Wykazano korelację między poziomem CA125 a stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu i jego dojrzałością histologiczną. Jego stężenie jest znamienne zwiększone w rakach o wysokim stopniu zaawansowania i mniej dojrzałych histologicznie.

Analiza stężeń CA125 wykorzystywana jest szeroko w celach naukowych jako element prowadzonych badań nad biologią nowotworów. Przede wszystkim jednak oznaczenie stężenia CA125, zwłaszcza seryjne, wykorzystywane jest w codziennej praktyce klinicznej jako narzędzie pomocne w różnicowaniu charakteru obserwowanych klinicznie zmian jajnika – łagodne vs złośliwe, monitorowaniu wyników chemioterapii czy wykrywaniu ewentualnych nawrotów choroby. Przyjmuje się, że zwiększenie stężenia CA125 poprzedza wystąpienie klinicznie jawnego nawrotu choroby średnio o ok. 3–4,5 miesiąca (0,4–29,5 miesiąca) [7, 13].

Obniżenie wartości CA125 po operacji cytoredukcyjnej i w czasie prowadzonej chemioterapii jest uważane za wiarygodny wskaźnik skuteczności leczenia. Zmniejszenie stężenia CA125 w ciągu 6 tygodni po operacji cytoredukcyjnej do poziomu przyjętego za normę dobrze rokuje dla powodzenia leczenia [5]. Utrzymująca się w czasie obniżona ekspresja białka CA125 po leczeniu obserwowana w seryjnych oznaczeniach prowadzonych w czasie kolejnych wizyt kontrolnych po leczeniu jest wskaźnikiem skuteczności przeprowadzonego leczenia i stabilizacji choroby [14].

W przypadku gdy po zakończeniu leczenia stężenie CA125 pozostaje zwiększone, za kryterium rozpoznania nawrotu choroby nowotworowej określa się podwójnie stężenia markera [15, 16].

Jakkolwiek opisana wcześniej wartość kliniczna oznaczenia stężenia CA125 nie może być kwestionowana, obowiązuje jednak znajomość czynników ograniczających jego czułość i swoistość. Należą do nich: niska wartość diagnostyczna CA125 w wykrywaniu zmian nowotworowych na wczesnym etapie kancerogenezy oraz brak jego ekspresji w blisko 20% przypadków raka jajnika. Wreszcie obserwuje się niejako „fizjologiczne” zwiększenie stężenia CA125 w sytuacjach niepodejrzanych onkologicznie, do których należą: miesiączka, ciąża wewnątrz- i pozamaciczna, marskość wątroby, zapalenie otrzewnej, endometrioza, mięśniaki macicy, choroby zapalne miednicy (*pelvic inflammatory disease* – PID) [8–10].

Ponadto stężenie CA125 może zwiększać się w innych niż rak jajnika nowotworach, tj. w raku szyjki gruczołowym, raku piersi, płuc i przewodu pokarmowego.

Drugim markerem o istotnym znaczeniu w klinice raka jajnika jest HE4 (*human epididymis protein 4*). To białko,

którego rola fizjologiczna nie została do tej pory wyjaśniona. Wiadomo jednocześnie, że ulega ekspresji w następujących tkankach – w prostaty i najądrzu, nerce, płucach, jajowodach, komórkach *endocervix* oraz w śluzówce jamy ustnej i nosowej [17]. Obserwuje się również jego nadekspresję w nowotworach jajnika i w raku endometrium [9, 18, 19]. Jest obecnie uznawany za marker o wysokiej swoistości (95%) i czułości (72,9%) służący wykrywaniu wczesnych postaci raka jajnika, głównie typu surowiczego [18, 19].

Wykazano, że jego wyraźna nadprodukcja występuje w raku surowiczym – 93%, endometrialnym – blisko 100%, tymczasem w raku typu surowiczego już tylko w 50% i praktycznie jest niewykrywalna dla raków typu śluzowego (0%) [17].

Za górną granicę normy uznaje się dla HE4 stężenia o wartości równej i mniejsze niż 150 pM/l, przy czym u połowy chorych we wczesnych stadiach choroby obserwowano stężenia przekraczające 500 pM [5, 8].

W porównaniu z CA125, SMRP, CA72-4 i osteopontyną HE4 ma najwyższą czułość w wykrywaniu raka jajnika w I stopniu zaawansowania klinicznego [20].

Stężenie HE4 znacznie rzadziej ulega zwiększeniu w łagodnych zmianach w porównaniu z CA125 [21]. W przypadkach torbieli endometrialnych nie wykazano zwiększonego stężenia HE4 [8]. Ponadto potwierdzono ekspresję HE4 w zmianach nowotworowych jajnika niewykazujących ekspresji CA125 [22]. Jednoczesne oznaczenie HE4 oraz CA125 podnosi czułość badania do 76,4% przy 95-procentowej swoistości.

W związku z powyższymi faktami uznano oznaczenie HE4 za metodę diagnostyczną istotnie uzupełniającą wartość oznaczenia antygenu CA125 w różnicowaniu łagodnych i złośliwych guzów miednicy mniejszej. Białko HE4 wykorzystywane jest również jako narzędzie do monitorowania odpowiedzi na leczenie i marker ułatwiający wykrycie wznowy zarówno raka jajnika, jak i raka endometrium [22].

Przyjmuje się, że biorąc pod uwagę częstość występowania raka jajnika, potencjalny test zakwalifikowany do wykrywania wczesnych postaci raka jajnika musi wykazywać wysoką czułość (> 75%) oraz bardzo wysoką swoistość sięgającą 99,6%, aby osiągać dodatnią wartość predykcyjną w granicach co najmniej 10% [6].

Porównywano skuteczność w wykrywaniu raka śluzowego, surowiczego dwóch markerów: CA125 i HE4, w wykrywaniu raka jajnika u pacjentek z podejrzanym obrazem klinicznym guzów jajnika. Próbowano znaleźć korelację między typem histologicznym i typem nabłonkowego raka jajnika – rozróżnienie wg nowego podziału raka jajnika między typem I i typem II.

Typ I raka jajnika – jest rzadziej spotykany, cechuje go najczęściej dość dobre rokowanie, wykrywany jest w niższych stopniach zaawansowania klinicznego. Charakteryzuje się powolnym wzrostem, dużą stabilnością genetyczną oraz rzadszym występowaniem przerzutów.

Typ II raka jajnika rozpoznawany jest częściej i cechują go niekorzystne rokowniczo czynniki biologiczne – szybki wzrost, genetyczna niestabilność, szybkie nawroty; rozpoznanie ustalane jest najczęściej w wysokim stopniu zaawansowania [23, 24].

Najskuteczniejszym narzędziem w różnicowaniu między łagodnym i złośliwym rakiem nabłonkowym jajnika typu II okazała się kombinacja oznaczeń CA125 i HE4 (czułość 94,4% przy 75-procentowej specyficzności). Tymczasem w odniesieniu do raka jajnika typu I wyniki okazały się mniej korzystne – czułość 61,9% przy 75-procentowej specyficzności. Dla zaawansowanych postaci guzów typu II raka uzyskano czułość 100% przy 75-procentowej specyficzności. Niestety, nie udało się uzyskać analogicznych wyników w odniesieniu do rozróżnienia łagodnych i złośliwych guzów typu śluzowego [4].

Podsumowując – podkreśla się dobrą wartość diagnostyczną kombinacji oznaczenia CA125 i HE4 w diagnozowaniu zaawansowanych raków jajnika typu II, natomiast małą w odniesieniu do raków typu I w niskich stopniach zaawansowania. Takie wyniki służą również poparciu hipotezy o zróżnicowanym pochodzeniu typów raka jajnika i braku odnośnych, wystarczająco czułych i specyficznych markerów rozwoju choroby [4].

We wprowadzonym od niedawna do praktyki klinicznej algorytmie ROMA (*Risk of Ovarian Malignancy Algorithm*) bierze się pod uwagę oznaczenie CA125, HE4 oraz status menopauzalny kobiety. Jest to model predykcyjny, pozwalający na różnicowanie łagodnych i potencjalnie złośliwych guzów przydatków, z oceną wyrażaną jako ryzyko obecności zmiany nowotworowej.

Został on zaaprobowany przez amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (*Food and Drug Administration* – FDA) do zastosowania jako narzędzie dyskryminujące grupę pacjentek, którą należy skierować na leczenie do ośrodka dysponującego wyszkoloną kadrą chirurgów onkologów i ginekologów, gwarantujących optymalny zabieg cytoredukcyjny [4, 22].

Wskaźnik ROMA nie powinien być wykorzystywany jako narzędzie diagnostyczne u kobiet leczonych wcześniej z powodu nowotworu, będących obecnie w trakcie chemioterapii i u młodych kobiet, poniżej 18. roku życia.

W Stanach Zjednoczonych FDA dopuściło również test nazwany OVA1 do identyfikowania chorych z rakiem jajnika jeszcze przed wdrożeniem procedur operacyjnych. Składa się on z oznaczenia pięciu białek: CA125, apolipoproteiny A1, transtyretyny, β_2 -mikroglobuliny i transferyny.

Już wcześniej opisywano obniżenie ekspresji transtyretyny i lipoproteiny A1 w raku jajnika [25, 26]. Uważa się, że powyższy proces może być odzwierciedleniem reakcji gospodarza na obecność guza. W innych badaniach potwierdzono brak zmian w stężeniu apolipoproteiny A1 u pacjentów z nowotworem piersi czy jelita oraz brak zmian w stężeniu transtyretyny w surowicy chorych na raka prostaty i piersi [27].

Transtyretyna jest nośnikiem tyroksyny i trijodotyroniny, ułatwia również transport retinolu przez oddziaływanie z białkiem wiążącym retinol. Transgeniczne myszy pozbawione transtyretyny miały znacząco zmniejszone stężenie retinolu i białka wiążącego retinol, co korelowało ze wzrostem ryzyka zainicjowania kancerogenezy w jajniku [28, 29].

Wynik testu OVA1 otrzymywany za pomocą specjalnie skonstruowanego programu komputerowego interpretowany jest jako wysokie ryzyko zmiany nowotworowej przy wyniku równym 5 dla kobiet przed menopauzą i 4,4 dla pacjentek pomenopauzalnych, z czułością 92,5% i swoistością 42,8% [30].

Wyzwaniem diagnostycznym pozostaje poszukiwanie markerów o wysokiej czułości i swoistości charakterystycznych dla raka o typie śluzowym i dla guzów granicznych.

W przypadku złośliwych guzów nienabłonkowych oznaczanie takich markerów, jak: α -fetoproteina (AFP), gonadotropina kosmówkowa (hCG), dehydrogenaza mleczanowa (LDH) czy inhibina, służy raczej różnicowaniu oraz monitorowaniu pacjentek w trakcie leczenia i po leczeniu niż jest narzędziem w potencjalnym skriningu tych nowotworów [8].

Piśmiennictwo

1. Wojciechowska U, Didkowska J, Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2010 roku. Warszawa 2012.
2. GLOBOCAN 2008 (IARC), Section of Cancer Information. <http://globocan.iarc.fr>
3. Markowska A. Epidemiologia i etiopatogeneza raka jajnika. W: Zarys ginekologii onkologicznej. Markowska J, Mądry R (red.). Tom II. Termedia, Poznań 2012.
4. Rein BJ, Gupta S, Dada R, et al. Potential markers for detection and monitoring of ovarian cancer. *J Oncol* 2011; 2011: 475983.
5. Kowalska M, Kamińska J. Markery nowotworowe. W: Zarys ginekologii onkologicznej. Markowska J, Mądry R (red.). Tom II. Termedia, Poznań 2012.
6. Badgwell D, Bast RC Jr. Early detection of ovarian cancer. *Dis Markers* 2007; 23: 397-410.
7. Nowak-Markwitz E, Spaczyński M. Nowotwory jajnika, jajowodu i otrzewnej. W: Praktyczna ginekologia onkologiczna. Podręcznik dla lekarzy. Spaczyński M, Nowak-Markwitz E, Kędzia W (red.). Wyd. Wielkopolskie Towarzystwo Onkologii Ginekologicznej. Klinika Onkologii Ginekologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2012.
8. Nowak-Markwitz E. Biochemiczne marker nowotworowe. Praktyczna Ginekologia Onkologiczna. Podręcznik dla lekarzy. W: Praktyczna ginekologia onkologiczna. Podręcznik dla lekarzy. Spaczyński M, Nowak-Markwitz E, Kędzia W (red.). Wyd. Wielkopolskie Towarzystwo Onkologii Ginekologicznej. Klinika Onkologii Ginekologicznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2012.
9. Sarojini S, Tamir A, Lim H, et al. Early detection biomarkers for ovarian cancer. *J Oncol* 2012; 2012: 709049.
10. Duffy MJ, Bonfrer JM, Kulpa J, et al. CA125 in ovarian cancer: European group on tumor markers guidelines for clinical use. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15: 679-91.
11. Bon GG, Kenemans P, Verstraeten R, et al. Serum tumor marker immunoassays in gynecology: establishment of reference values. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174: 107-14.
12. Gupta D, Lis CG. Role of CA125 in predicting ovarian cancer survival – a review of the epidemiological literature. *J Ovarian Res* 2009; 2: 13.
13. Manyś G, Mardas M. Nadzór po leczeniu raka jajnika. W: Zarys ginekologii onkologicznej. Markowska J, Mądry R (red.). Tom II. Termedia, Poznań 2012.
14. Bast RC Jr, Badgwell D, Lu Z, et al. New tumor markers: CA125 and beyond. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15 Suppl 3: 274-81.
15. Hall M, Rustin G. Recurrent ovarian cancer: when and how to treat. *Curr Oncol Rep* 2011; 13: 459-71.
16. Rustin GJ. What surveillance plan should be advised for patients in remission after completion of first-line therapy for advanced ovarian cancer? *Int J Gynecol Cancer* 2010; 20 Suppl 2: 27-8.
17. Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, et al. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res* 2005; 15: 2162-9.
18. Montagnana M, Danese E, Giudici S, et al. HE4 in ovarian cancer: from discovery to clinical application. *Adv Clin Chem* 2011; 55: 1-20.
19. Scholler N, Crawford A, Sato A, et al. Bead-based ELISA for validation of ovarian cancer early detection markers. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2117-24.
20. Moore RG, Brown AK, Miller MC, et al. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* 2008; 108: 402-8.
21. Escudero JM, Auge JM, Filella X, et al. Comparison of serum human epididymis protein 4 with cancer antigen 125 as a tumor marker in patients with malignant and nonmalignant diseases. *Clin Chem* 2011; 57: 1534-44.
22. Simmons AR, Baggerly K, Bast RC Jr. The emerging role of HE4 in the evaluation of epithelial ovarian and endometrial carcinomas. *Oncology (Williston Park)* 2013; 27: 548-56.
23. Kurman RJ, Shih IeM. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol* 2010; 34: 433-43.
24. Nowak-Markwitz E, Spaczyński M. Rak jajnika – nowe spojrzenie na pochodzenie i histogenezę. *Ginekol Pol* 2012; 88: 454-7.
25. Mählck CG, Grankvist K. Plasma prealbumin in women with epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Obstet Investig* 1994; 37: 135-40.
26. Kuesel AC, Kroft T, Préfontaine M, Smith IC. Lipoprotein(a) and CA125 levels in the plasma of patients with benign and malignant ovarian disease. *Int J Cancer* 1992; 52: 341-6.
27. Zhang Z, Bast RC Jr, Yu Y, et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2004; 64: 5882-90.
28. van Bennekum AM, Wei S, Gamble MV, et al. Biochemical basis for depressed serum retinol levels in transthyretin-deficient mice. *J Biol Chem* 2001; 276: 1107-13.
29. Roberts D, Williams SJ, Cvetkovic D, et al. Decreased expression of retinol-binding proteins is associated with malignant transformation of the ovarian surface epithelium. *DNA Cell Biol* 2002; 21: 11-9.
30. Muller CY. Doctor, should I get this new ovarian cancer test-OVA1? *Obstet Gynecol* 2010; 116: 246-7.

Prawidłowe odpowiedzi do Testowego programu edukacyjnego dotyczącego biochemicznych markerów w skriningu raku jajnika, zamieszczonego w numerze 4/2013 *Przeglądu Menopauzalnego*:

1. b; 2. b; 3. c; 4. d; 5. a; 6. d; 7. a; 8. a; 9. b; 10. d; 11. b; 12. b.