

## Zastosowanie biomarkerów w diagnostyce i leczeniu raka jajnika

### *Biomarkers in diagnosis and treatment of ovarian cancer*

Lech Rogulski<sup>1</sup>, Anita Olejek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Oddział Ginekologiczno-Położniczy, Wojewódzki Szpital Zespolony im. prof. dr. W. Orłowskiego w Częstochowie; ordynator Oddziału: dr med. Leszek Mitas

<sup>2</sup>Katedra i Oddział Kliniczny Ginekologii, Potożnictwa i Ginekologii Onkologicznej w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach; kierownik: dr hab. med. Anita Olejek, prof. SUM

Przeгляд Menopauzalny 2008; 6: 301–307

#### Streszczenie

Diagnostyka i leczenie raka jajnika nadal stanowią wyzwanie dla współczesnej ginekologii. Brak dostatecznie swoistych objawów oraz niejasna patogeneza molekularna utrudniają opracowanie skutecznych metod wczesnego rozpoznawania. Rak jajnika jest najczęściej wykrywany w III i IV stopniu zaawansowania klinicznego, gdy optymalna terapia chirurgiczna jest często niemożliwa, a leczenie onkologiczne umiarkowanie skuteczne. Poważnym problemem jest również podejście do pacjentek genetycznie obciążonych zwiększonym ryzykiem raka jajnika. Zastosowanie biomarkerów daje nadzieję na stworzenie efektywnej strategii badań przesiewowych, co może przelożyć się na poprawę przeżywalności chorych. Stosowane od wielu lat oznaczenie antygenu CA-125 nie jest dostatecznie czułe ani swoiste do wczesnego wykrywania raka. Znalazło natomiast zastosowanie w monitorowaniu leczenia oraz różnicowaniu charakteru guzów przydatków. Wykorzystanie nowoczesnych technik biologii molekularnej, takich jak analiza proteomiczna oraz ilościowe badania ekspresji genów, umożliwiły zidentyfikowanie i gruntowne przebadanie wielu innych biomarkerów raka jajnika. Najbardziej obiecujące wyniki badań dotyczą HE4, mezoteliny, inhibiny i aktywiny oraz kalikrein tkankowych. Aby uzyskać najwyższą czułość i swoistość, pojedyncze markery są łączone w panele diagnostyczne przy użyciu zaawansowanych metod statystycznych. Istotnym polem badań jest również określanie lekooporności komórek nowotworowych, co stwarzałoby szansę na celowaną chemioterapię lub hormonoterapię. Celem niniejszej pracy jest zwięzłe przedstawienie współczesnego stanu wiedzy na temat biomarkerów raka jajnika.

**Słowa kluczowe:** rak jajnika, CA-125, markery nowotworowe, badania przesiewowe, BRCA1/2

#### Summary

Diagnosis and treatment of ovarian cancer are still a challenge for modern gynaecology. Lack of sufficiently specific symptoms and unclear molecular pathogenesis make early detection very problematic. Ovarian cancer is mostly diagnosed in clinical stage III and IV when optimal surgery is often impossible and medical treatment is less effective. Management of high-risk patients is also an unsolved issue. Employing biomarkers may lead to development of a successful screening strategy thus prolonging patient survival. CA-125 antigen has been used for many years as an ovarian cancer marker but it lacks both sensitivity and specificity to augment early stage detection. Its clinical usefulness is limited to treatment monitoring and differentiating between malignant and benign adnexal masses. Proteomic methods and transcription profiling are molecular biological techniques that were used to identify and thoroughly examine potential markers of ovarian malignancies. The most promising include HE4, mesothelin, inhibin, activin and tissue kallikreins. Attaining high sensitivity and specificity only seems possible when single markers are combined in diagnostic panels by means of advanced statistical methods. Another important field of research is determination of cancer cells' drug resistance which would allow guided therapy. The scope of the following work is a concise presentation of the current state of knowledge on ovarian cancer biomarkers.

**Key words:** ovarian cancer, CA-125, tumour markers, screening tests, BRCA1/2

Adres do korespondencji:

Lech Rogulski, Oddział Ginekologiczno-Położniczy, Wojewódzki Szpital Zespolony im. prof. dr. W. Orłowskiego w Częstochowie, ul. PCK 1, 42-200 Częstochowa

Pomimo znacznych postępów we wczesnej diagnostyce i leczeniu innych nowotworów złośliwych żeńskich narządów płciowych, rak jajnika pozostaje poważnym problemem współczesnej ginekologii onkologicznej. Rocznie w Polsce rejestruje się blisko 2700 nowych zachorowań [1]. Rak jajnika najczęściej występuje u kobiet między 50. a 70. rokiem życia.

Objawy nowotworów jajnika są zwykle słabo wyrażone i często związane z innymi chorobami jamy brzusznej. Większość przypadków raka jajnika wykrywanych jest w III i IV stopniu zaawansowania klinicznego. Tymczasem 5-letnia przeżywalność pacjentek ze zmianami wychodzącymi poza obręb jajnika wynosi zaledwie 20–40%. Rozpoznanie raka jajnika w I stopniu zaawansowania zwiększa ten współczynnik do ok. 90%. Tylko 25% przypadków zostaje tak wczesnie wykrytych [2]. Tak więc, mimo że jest to nowotwór rzadszy niż inne złośliwe schorzenia żeńskich narządów rodnych, najwięcej kobiet umiera z jego powodu. W celu porównania 73% raków endometrium, 55% raków gruczołu sutkowego i 50% raków szyjki macicy jest wykrywanych w I stopniu zaawansowania klinicznego.

Powyższe dane statystyczne wyraźnie wskazują na konieczność opracowania skutecznych metod wczesnej diagnostyki tego schorzenia. Podobnie jak w przypadku innych nowotworów poszukiwania optymalnego biomarkera nie dały jednoznacznych rezultatów, wskazując na konieczność opracowania bardziej złożonych algorytmów przesiewowych niż oznaczenie stężenia lub aktywności pojedynczej substancji.

Celem niniejszego opracowania jest przedstawienie współczesnego stanu wiedzy na temat biomarkerów raka jajnika oraz ich zastosowania w praktyce klinicznej. Szczególną uwagę poświęcono przedstawieniu nowych markerów, na trop których naprowadziły badaczy metody analizy proteomicznej oraz zastosowanie mikromacierzy DNA.

## CA-125

Do chwili obecnej najczęściej wykorzystywanym i najdokładniej przebadanym markerem jest produkt genu *MUC16* znany jako CA-125. Przeciwciała dla CA-125 zostały wykryte przez zespół badawczy dr. Roberta Basta i dr. Roberta Knappa w 1981 r. [3]. Antygen CA-125 jest glikoproteiną błonową obecną na powierzchni wielu rodzajów komórek nabłonkowych i uwalnianą do krwiobiegu u pacjentek z rakiem jajnika oraz rzadziej w przypadkach raków przewodu pokarmowego, gruczołu sutkowego oraz endometrium. Znaczne różnice w stopniu glikozylacji sprawiają, że antygen jest heterogenną mieszaniną cząsteczek o masie 200–1000 kDa. Współcześnie stosowany test immunologiczny CA-125 II wykorzystuje dwa rodzaje przeciwciał przeciwko podstawowym epitopom antygeny [4].

Pomimo potwierdzenia użyteczności oznaczeń CA-125 w monitorowaniu leczenia onkologicznego oraz w ocenie charakteru guzów przydatkowych nie wykazano jej w odniesieniu do badań przesiewowych. Wynika to z kilku przyczyn.

Po pierwsze, nie jest to test dostatecznie swoisty dla raka jajnika, ponieważ podwyższone stężenia tego markera, poza innymi nowotworami, często towarzyszą chorobom wątroby, endometriozie, PID, mięśniakom macicy, krwotocznym torbielom jajnika oraz ciąży. Są to stany kliniczne częste u kobiet w wieku reprodukcyjnym, a zatem w grupie, która byłaby potencjalnym adresem wczesnego skryningu, interpretacja zwiększonego stężenia CA-125 może być utrudniona. Również w diagnostyce guzów przydatkowych udowodniono większą przydatność omawianego markera u kobiet po menopauzie.

Po drugie, 20% raków jajnika nie produkuje CA-125, co wykazano w badaniach immunohistochemicznych materiału pooperacyjnego. Nawet nowotwory produkujące omawiany marker nie zawsze uwalniają go do krwiobiegu we wczesnej fazie wzrostu i tak w stopniu I tylko 50–60% chorych na raka ma zwiększone stężenie CA-125 [5].

Po trzecie, nawet po ograniczeniu analiz do pacjentek pomenopauzalnych, wykazana niemal 99-procentowa swoistość odpowiada 4,7% pozytywnej wartości predykcyjnej [6]. Kierując się samym wynikiem badania CA-125 jako wskazaniem do laparotomii należałoby wykonać ok. 20 operacji, aby wykryć jeden przypadek raka jajnika.

Badacze amerykańscy wskazują, że optymalne badanie przesiewowe dla raka jajnika musiałoby charakteryzować się czułością powyżej 75% dla wczesnego stopnia zaawansowania oraz swoistością ponad 99,7%. Oznaczałoby to zmniejszenie liczby operacji do 10 na jeden przypadek raka. Obecnie jedynie przezpochwowe badanie ultrasonograficzne (TVS) zbliża się do tych kryteriów, niestety, jej koszty i dostępność utrudniają szerokie wykorzystanie w skryningu [7].

Sposobem optymalizacji strategii przesiewowych jest wykorzystanie oznaczeń CA-125 w celu kwalifikacji pacjentek do badania ultrasonograficznego. Jacobs i wsp. przeprowadzili badanie, w którym przezbrzusne USG narządu płciowego wykonywane było tylko u kobiet ze zwiększonym stężeniem CA-125. Osiągnięto wysoką pozytywną wartość predykcyjną – 21% – oraz znaczące zwiększenie mediany przeżywalności pacjentek (72,9 vs 41,8 mies.;  $p=0,0112$ ) [8].

Menon i wsp. zastosowali inny algorytm postępowania, kwalifikując pacjentki na podstawie wyjściowego stężenia CA-125 do trzech grup. Pacjentki o niskim ryzyku były poddawane corocznemu badaniu kontrolnemu. W przypadku ryzyka pośredniego oznaczenie CA-125 było wykonywane co 3 mies. Pacjentki z grupy wysokiego ryzyka miały być od razu kierowane na TVS [9].

Po wstępnych zachęcających wynikach badanie rozszerzono jako *United Kingdom Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening*. Docelowo badanie miało objąć 200 tys. kobiet po menopauzie, w tym 100 tys. w grupie kontrolnej, 50 tys. monitorowanych algorytmem Menona oraz dodatkowo 50 tys., u których postanowiono wykonywać coroczne badanie TVS.

Głównym zastosowaniem CA-125 pozostaje monitorowanie skuteczności leczenia onkologicznego. Nawet najdokładniejsza operacja cytoredukcyjna nie jest w stanie usunąć często licznych, drobnych ognisk nowotworowych, które pozostają poza zasięgiem współczesnych metod obrazowania, włączając w to pozytonową tomografię emisyjną. CA-125 jest dobrym markerem pozostałej tkanki nowotworowej. Przetrwale zwiększone stężenie CA-125 w 95% przypadków oznacza przetrwałą chorobę w czasie operacji *second-look*. Ponowne zwiększenie stężenia markera po okresie remisji sugeruje natomiast nawrót choroby. Mimo że monitorowanie CA-125 średnio o 3 mies. przyspiesza wykrycie wznowy nowotworu, to klinicznie nie przekłada się na poprawę przeżywalności pacjentek. Obecnie brak jest bowiem skutecznej terapii nawrotowego raka jajnika.

Marker CA-125 odgrywa ważną rolę w badaniach nad skutecznością chemioterapii. Munsted i wsp. wykazali prognostyczne walory stosunku stężenia CA-125 po chemioterapii do stężenia 4 tyg. po operacji cytoredukcyjnej. Wartości ilorazu poniżej 0,1 korelowały ze znamienne większą przeżywalnością pacjentek [10].

Od innej strony do problemu oceny rokowania podszli Hunter i wsp., badając okres półtrwania CA-125 po leczeniu. Po skutecznej cytoredukcji stężenie markera zmniejsza się o połowę po 2 tyg. Pełna odpowiedź na chemioterapię istotnie skraca okres półtrwania. Natomiast jego wydłużenie powyżej 20 dni, mimo późniejszej normalizacji stężenia, rokuje źle [11].

Zaobserwowanie dobrej odpowiedzi na leczenie może upewnić lekarzy i pacjentki o konieczności kontynuowania terapii, często toksycznej i obciążonej licznymi działaniami niepożądanymi. Brak odpowiedzi może oszczędzić dalszych trudów nieskutecznej i kosztownej chemioterapii. Ponadto monitorowanie stężenia CA-125 zostało uznane za efektywny zastępczy marker reakcji na leczenie preparatami eksperymentalnymi w badaniach II fazy [12].

Dla ginekologa-praktyka oczywiście cenna jest pomoc w diagnostyce różnicowej guzów miednicy. Jacobs i wsp. wykazali, że zwiększone stężenie CA-125 >50 U/ml w 94% przypadków wskazuje na złośliwy charakter zmiany. W przypadku pacjentek po menopauzie łączna ocena obrazu ultrasonograficznego oraz stężenia omawianego markera pozwala ocenić ryzyko złośliwego charakteru zmiany z 85-procentową czułością i 97-procentową swoistością. Trafne oszacowanie ryzyka pozwala lepiej przygotować pacjentkę do operacji oraz zapewnić wykonanie zabiegu przez najbardziej doświadczonych

chirurga w zespole, co przekłada się na istotnie lepsze rokowanie [13].

Podsumowując, oznaczanie stężenia CA-125 nie spełniło jednak wszystkich oczekiwań ginekologów i onkologów, ale weszło na stałe do arsenału środków diagnostycznych współczesnej medycyny.

### Markery alternatywne

Opisany wyżej dwustopniowy algorytm przesiewowy prawdopodobnie nie osiągnie optymalnego wyniku z uwagi na wspomnianą wcześniej niską czułość oznaczenia CA-125 we wczesnych przypadkach raka jajnika. Optymalnym rozwiązaniem byłoby znalezienie dodatkowych markerów uzupełniających CA-125 i pozwalających na podwyższenie czułości w pierwszym etapie oraz skierowanie na badanie ultrasonograficzne większej liczby chorych.

Immunizacja zwierząt laboratoryjnych antygenami nowotworowymi, która umożliwiła identyfikację CA-125, została w dużym stopniu wyparta przez metody biologii molekularnej, takie jak analiza proteomiczna oraz ocena profilu transkrypcji. Zastosowanie mikromacierzy cDNA pozwoliło na jednoczesne badanie transkryptów wielu genów w komórkach rakowych i porównanie wzorców ekspresji z tkanką zdrowego lub zmienionego łagodnie jajnika [14, 15].

Dzięki tym metodom w ciągu ostatnich lat zidentyfikowano wiele substancji potencjalnie użytecznych w diagnostyce raka jajnika. Wśród ocenianych biomarkerów szczególną uwagę zwrócili HE4 (ang. *Human Epididymis Protein 4*), mezotelina (SMRP), inhibiny, a także kalikreiny tkankowe.

### HE4

Najlepszym biomarkerem surowcowym – poza CA-125 – na podstawie ostatnich doniesień wydaje się HE4. Białko to należy do grupy małych termostabilnych cząsteczek związanych przede wszystkim z hamowaniem aktywności proteaz. Gen *WFDC2* kodujący białko HE4 został zidentyfikowany w ludzkim najądrzu. Początkowo wiązano jego funkcję z dojrzewaniem nasienia. Do tej pory rola biologiczna HE4 pozostaje niejasna [16]. Zaobserwowano jednak znamienne nadekspresję genu i zwiększone stężenie białka w surowicy chorych na raka jajnika [17].

Havrilesky i wsp. przeprowadzili niezwykle interesujące badanie, w którym analizie poddano cały panel markerów z trzech głównych rodzajów białek odgrywających rolę w fizjologii i patologii jajnika. Pierwszą grupę stanowiły białka odpowiedzialne za hormonalną kontrolę proliferacji – glikodelina oraz inhibina. Druga grupa składała się z CA-125 oraz Muc-1 – białek zaangażowanych w tworzenie macierzy pozakomórkowej oraz interakcje między

komórkami nabłonkowymi. Do trzeciej grupy zakwalifikowano czynniki regulujące proteolizę, takie jak omawiane białko HE4 oraz MMP7, PAI-1, Plau-R i SLPI.

Łączna analiza stężeń CA-125, HE4, glikodeliny, Plau-R, Muc-1 oraz PAI-1 okazała się najlepszą kombinacją biomarkerów do badań przesiewowych, osiągając czułość 80,5% i swoistość 96,5% dla raka jajnika w stopniu I/II, niezależnie od wieku kobiety. Spośród pojedynczych markerów to właśnie białko HE4 najlepiej wykrywało wczesne postacie choroby, zdecydowanie przewyższając CA-125 pod względem czułości (82,7 vs 46%) [18].

Również w ocenie charakteru guzów przydatkowych HE4 może skutecznie zastąpić CA-125. Samo oznaczenie HE4 z większą dokładnością niż CA-125 pozwala odróżnić łagodne guzy miednicy od wczesnych postaci raka (czułość odpowiednio 15,1 vs 45,9% przy 95-procentowej swoistości) [19].

### Mezotelina i markery oznaczane w moczu

Równoległe do HE4 uwagę badaczy zwróciła cząsteczka nazwana mezoteliną, czyli funkcjonalnie zbliżona do CA-125 glikoproteina błonowa odgrywająca rolę w przyleganiu komórek. Jej rozpuszczalna forma powstaje w wyniku usunięcia motywu kotwiczącego poprzez proteolizę lub alternatywny splicing mRNA [20]. McInTosh i wsp. wykorzystując zaawansowane metody statystyczne, połączyli oznaczenie CA-125 z oceną stężenia mezoteliny, tworząc wirtualny marker, który wykrywał raka jajnika z czułością 86,5% przy 98-procentowej swoistości. W badaniu uczestniczyła jednak zbyt mała liczba pacjentek we wczesnej fazie rozwoju nowotworu, a moc statystyczna badania na takiej próbie nie była wystarczająca, aby oszacować wyniki w tej podgrupie [21].

Zastosowanie mezoteliny może mieć większe implikacje praktyczne, jeśli weźmie się pod uwagę fakt, że jako białko o małej masie cząsteczkowej ulega ona przesączaniu w kłębuszkach nerkowych. Badgwell i wsp. porównali czułość oznaczenia mezoteliny w moczu oraz surowicy. Po normalizacji wyników względem stopnia przesączania kłębuszkowego (GFR) stężenie mezoteliny w moczu okazało się znacznie lepszym wskaźnikiem raka jajnika, w tym wczesnych jego postaci, niż stężenie markera w surowicy. Czułość dla I/II stopnia zaawansowania raka wynosiła 42% w porównaniu z 12% dla stężenia w surowicy przy założonej 95-procentowej swoistości [22].

Oprócz mezoteliny również inne markery oznaczane w moczu poddano wnikliwej ocenie. Bardzo interesujące wydaje się antyapoptotyczne białko Bcl-2. Jego nadekspresja w komórkach nowotworowych powoduje stabilizację błony mitochondrialnej i zapobiega uwalnianiu wapnia z siateczki śródplazmatycznej pod wpływem leczenia onkologicznego. Kruk i wsp. zaobserwowali u 97% kobiet chorych na raka jajnika występowanie w moczu białka Bcl-2. Przy równie wysokiej swoistości Bcl-2 donie-

sienia naukowców z Uniwersytetu Południowej Florydy należy potraktować jako bardzo optymistyczne. Możliwość wykonywania badania przesiewowego równie łatwego jak domowy test ciążowy jest niezwykle interesująca, ale powszechne zastosowanie metody wymaga badań klinicznych na większej populacji [23].

### Inhibina i aktywina

Inhibina i aktywina to substancje produkowane przez jajnik i zaangażowane w hormonalną regulację czynności układu rozrodczego poprzez wpływ na wydzielanie FSH z przysadki. Należą do dużej rodziny cytokin związanych z czynnikiem wzrostowym TGF- $\beta$ . Dla uzyskania aktywności biologicznej inhibiny musi dojść do dimeryzacji podjednostki  $\alpha$  oraz jednej z dwóch rodzajów podjednostek  $\beta$  (inhibina A i B). Aktywiny są hetero- lub homodimerami podjednostek  $\beta$  (aktywiny A, AB i B). Pierwsze doniesienia na temat wykorzystania tych substancji w diagnostyce nowotworów dotyczyły ziarniszczaka (ang. *granulosa cell tumor* – GCT) [24]. Wykazano szczególną przydatność inhibiny w diagnostyce raków śluzowych, należących do guzów nabłonkowych [25].

Z punktu widzenia biologii nowotworów interesujący jest fakt, że u myszy inhibina jest supresorem nowotworów jajnika i jej brak w wyniku *knock-out* genu znacznie zwiększa częstość występowania ziarniszczaka. U człowieka mechanizm ten wydaje się nie działać, ponieważ ludzkie ziarniszczaki produkują znaczne ilości inhibiny i są wyraźnie odporne na jej działania [26].

Raki śluzowe jajnika są guzami zaniżającymi efektywność oznaczeń CA-125, gdyż produkują ten biomarker w 70% (raki surowicze – 80–90%). Zbadanie całkowitego stężenia inhibiny w surowicy pozwala natomiast na identyfikację już 84% tych guzów. Dla przypadków ziarniszczaka statystyka wygląda korzystniej (prawie 100% wykrywalności dzięki inhibinie i zaledwie 30% przy CA-125) [27]. Podobnie jak w przypadku innych biomarkerów, cytowani badacze wskazują na komplementarność oznaczeń CA-125 i inhibiny. Przydatność oznaczeń aktywiny w surowicy jest istotnie mniejsza – 66% wykrywalności w rakach śluzowych i 69% w ziarniszczakach [28].

Pozostaje jedno pytanie dotyczące przydatności omawianych biomarkerów w rakach nabłonkowych – na ile ich sekrecja pochodzi z komórek guza, a na ile jest reakcją śródmiąższowej tkanki jajnika. Oczywiście, nie miałyby to wpływu na zastosowanie diagnostyczne inhibiny i aktywiny, ale monitorowanie ewentualnego rozsiewu choroby stałoby się trudniejsze, o ile nie niemożliwe [29].

### Kalikeiny tkankowe

Kalikeiny to rodzina proteaz serynowych o aktywności zbliżonej do trypsyny lub chymotrypsyny. Geny kalikrein (15 poznanych do tej pory) zlokalizowane są bez-

pośrednio obok siebie na chromosomie 19. Najbardziej znaną cząsteczką jest hK3 – znana jako PSA (antygen specyficzny dla prostaty). Jest to jeden z najlepszych markerów nowotworowych służący do wczesnego wykrywania raka prostaty.

Badania ekspresji genów w tkance nowotworowej jajnika potwierdziły znaczną nadekspresję pozostałych kalikrein oraz jej lokalizację na obrzeżach guza [30]. Potwierdziło to – zdaniem badaczy – rolę kalikrein w procesie naciekania i rozsiewu nowotworowego. Wśród sugerowanych mechanizmów działania znalazły się proteolityczna aktywacja czynników wzrostowych, uwalnianie czynników angiogennych oraz degradacja białek strukturalnych macierzy pozakomórkowej.

Różnice w ekspresji genów poszczególnych kalikrein w tkance nowotworowej istotnie wpływały na rokowanie pacjentek. Kalikreiny hK5, hK6, hK7 oraz hK10 były związane z wyższym stopniem zaawansowania klinicznego, niższą dojrzałością guza oraz zmniejszeniem przeżywalności [31]. Odwrotnie, hK8, hK11 i hK13 wskazywały na lepsze rokowanie, możliwość przeprowadzenia optymalnej cytoredukcji oraz lepszą odpowiedź na chemioterapię [32, 33].

Z punktu widzenia wczesnej diagnostyki raka jajnika kluczem do wykorzystania kalikrein jest ich ekspresja w guzach CA-125-negatywnych oraz przełożenie tej ekspresji na wykrywalność w surowicy. Kalikreiny hK6 i hK10 zostały wykryte w preparatach tkankowych 100% guzów niewykazujących ekspresji CA-125 [34]. Niestety, dalsze badania tych biomarkerów wykazały umiarkowaną przydatność kliniczną. Spośród chorych z małym stężeniem CA-125 (<23 U/ml) zaledwie u 35% wykryto zwiększone stężenie hK10. W ogólnej populacji oznaczenie hK6 i hK10 w surowicy charakteryzowało się czułością odpowiednio 47 i 54% przy swoistości 95 i 90% [35, 36]. Wątpliwe jest zatem, by kalikreiny stały się samodzielnymi markerami. Cytowane badania wskazują na wzrost czułości przy połączeniu z CA-125, nieprzekraczający jednak wyników osiągniętych przez oznaczenie np. HE4.

### Przydatność biomarkerów w grupach wysokiego ryzyka

Kobiety obciążone zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka jajnika z powodu mutacji genów BRCA1/2 oraz innych obciążeń dziedzicznych są szczególną grupą, której skuteczne badania przesiewowe mogłyby zaoszczędzić operacji profilaktycznego usunięcia przydatków [37].

Dowody naukowe zgromadzone do tej pory nie nastrojają optymistycznie. Najczęściej ocenianą metodą było coroczne oznaczanie stężenia CA-125 i przezpochwowe badanie ultrasonograficzne. Wydawało się bowiem, że taki podwyższony standard opieki poprawi długoterminowe wyniki pacjentek wysokiego ryzyka. Gaarenstroom i wsp. w ciągu 11-letniej obserwacji 269

kobiet, z których 113 było nosicielkami mutacji BRCA1/2, wykazali niską skuteczność skryningu. Choć większość przypadków raka rzeczywiście została wykryta podczas wizyt kontrolnych, były to częściej postaci zaawansowane (w stopniu IIIB lub IIIC) [38].

Hermesen i wsp. przebadali największą do tej pory grupę 888 pacjentek z potwierdzonymi mutacjami genów BRCA1/2. W tym badaniu zaledwie połowa przypadków raka została wykryta podczas skryningu. Rozkład zaawansowania nowotworów nie poprawił się – 80% wykrytych przypadków było w III/IV stopniu [39]. Przyniesione wyniki wskazują na konieczność opracowania zupełnie nowej strategii postępowania w grupach wysokiego ryzyka, włącznie z wykorzystaniem wszystkich ww. markerów alternatywnych.

### Przewidywanie odpowiedzi na leczenie

Przewidywanie odpowiedzi na chemioterapię to stosunkowo nowe pole badań, w którym poszukuje się markerów związanych z opornością lub wrażliwością na leki przeciwnowotworowe. Perspektywa tworzenia swoistego antybiogramu nowotworowego i stosowanie terapii celowanej napędza intensywne badania nad molekularnymi mechanizmami oporności na chemioterapeutyki oraz poszukiwania odpowiednich biomarkerów.

Podstawą terapii onkologicznej raka jajnika są związki platyny oraz taksany stosowane po operacji cytoredukcyjnej. Odsetek pacjentek odpowiadających na cisplatinę lub karboplatinę sięga 70%. Potencjalny marker oporności na związki platyny musiałby charakteryzować się niezwykle wysoką negatywną wartością predykcyjną, aby uzasadnić odstąpienie od terapii tymi lekami. Wśród zidentyfikowanych i zbadanych substancji znajdują się m.in. białko p53, ERCC1, przezbłonowe transportery miedzi [40] oraz regulator apoptozy – XIAP [41]. Choć badania te pozwoliły lepiej zrozumieć molekularne mechanizmy oporności na platynę, nie wskazały żadnego klinicznie przydatnego markera.

Ponieważ odpowiedź na taksany oscyluje wokół 40% przypadków i związki te nie wykazują działania synergicznego z pochodnymi platyny, szacuje się, że aż 60% pacjentów otrzymuje te leki niepotrzebnie [42]. Wykrycie markera oporności na taksany pozwoliłoby na zmniejszenie toksyczności chemioterapii poprzez równie skuteczne leczenie samą platyną. Nadekspresja MDR1 [43], HER2 [44] i surwiwiny [45], a także mutacje tubuliny [46] to odkryte mechanizmy oporności komórek nowotworowych na taksany. Podobnie jak w wypadku oporności na platynę nie udało się jednak odnaleźć żadnego markera o dostatecznych walorach predykcyjnych.

Znaczny odsetek raków jajnika wykazuje ekspresję receptorów estrogenowych ER- $\alpha$ . Koncepcja hormonoterapii raka jajnika za pomocą antyestrogenów była przedmiotem badań od początku lat 90. XX w. Sama obecność

receptorów nie wskazuje jednoznacznie, czy regulowane przez nie geny są odpowiedzialne za rozwój nowotworu. Walker i wsp. oznaczyli profil ekspresji estrogenozależnych genów i zbadali, które z nich najlepiej przewidują odpowiedź na terapię letrozolem. Ekspresja TFF1, TFF3, TRAP1, TOP2A oraz UBE2C istotnie korelowały z kliniczną odpowiedzią na hamowanie aromatazy, pozwalając na wyróżnienie podgrupy pacjentek, które mogą odnieść największą korzyść z tej formy leczenia [47].

## Perspektywy

Rozwój technik biologii molekularnej przyniósł odkrycie nowej generacji markerów, które do tej pory nie spełniły wszystkich pokładanych w nich nadziei. Uzyskanie zadowalających parametrów czułości i swoistości badań przesiewowych jest niezbędnym warunkiem wprowadzenia ich do powszechnego użytku. Niestety, choć przebadane do tej pory kombinacje markerów są w stanie istotnie zwiększyć szansę na rozpoznanie wczesnych etapów choroby, ich swoistość nadal pozostaje zbyt niska. Trwają poszukiwania optymalnego – a przy tym stosunkowo wąskiego – panelu biomarkerów, który zagwarantuje wysoką precyzję wykrywania choroby. Konieczność oznaczenia zbyt wielu substancji za pomocą komercyjnych zestawów diagnostycznych znacząco zwiększy koszt skryningu, podważając jego sens ekonomiczny.

Wydaje się, że kilkietapowe strategie przesiewowe są niezbędne przy ograniczonych środkach ochrony zdrowia, dlatego z niecierpliwością oczekuje się wyników dalszych badań nad oznaczaniem Bcl-2 w moczu. Uproszczenie wstępnego etapu znacznie zwiększy jego dostępność i popularność oraz pozwoli na rozsądne zaplanowanie dalszej diagnostyki we wstępnie wyselekcjonowanej populacji.

Niezwykle istotne jest opracowanie zasad postępowania w grupach wysokiego ryzyka, takich jak nosicielki mutacji genu *BRCA1*, dla których jedynym postępowaniem o udowodnionej skuteczności jest operacja profilaktyczna.

Na zakończenie należy wspomnieć o badaniach Taylor i wsp., którzy od 1979 r. zajmowali się egzozomami nowotworowymi. Są to fragmenty błon komórkowych uwalniane z komórek nowotworowych, retikulocytów, limfocytów oraz komórek dendrytycznych. Tworzą one wykrywalne w krążeniu obwodowym mikropęcherzyki (50–100 nm). Zaobserwowano ich zwiększoną kumulację u chorych na raka jajnika. Egzozomy zawierają drobne cząsteczki RNA komórek nowotworowych, tzw. mikroRNA. W ekstraktach tkankowych zidentyfikowano mikroRNA odpowiedzialne za chemowrażliwość, które miały znaczenie prognostyczne. Okazało się, że egzozomy po wyizolowaniu z krwi można przebadać pod kątem zawartości różnych cząsteczek mikroRNA. Już w najwcześniejszych stopniach zaawansowania klinicznego

wzór ekspresji egzozomalnego mikroRNA jest odmienny w porównaniu z kobietami zdrowymi. Skutecznie odróżnia on również raka jajnika od schorzeń łagodnych [48]. Oczywiście, konieczne są dalsze badania, aby tak zaawansowane metody znalazły zastosowanie kliniczne. Jednak wobec ograniczonej przydatności tradycyjnych markerów białkowych poszerzenie przekroju badanych substancji staje się niezbędną.

## Piśmiennictwo

1. Krajowy Rejestr Chorób Nowotworowych 2005. Warszawa 2005-2006.
2. Holshneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 2000; 19: 3-10.
3. Bast RC, Feeney M, Lazarus H, et al. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest* 1981; 68: 1331-7.
4. Nustad K, Bast RC Jr, Brien TJ, et al. Specificity and affinity of 26 monoclonal antibodies against the CA 125 antigen: first report from the ISOBM TD-1 workshop. *International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. Tumour Biol* 1996; 17: 176-219.
5. Bast RC Jr. Status of tumor markers in ovarian cancer screening. *J Clin Oncol* 2003; 21 (10 Suppl): 200-5.
6. Einhorn N, Sjövall K, Knapp RC, et al. Prospective evaluation of serum CA 125 levels for early detection of ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1992; 80: 14-8.
7. van Nagell JR Jr, Gallion HH, Pavlik EJ, DePriest PD. Ovarian cancer screening. *Cancer* 1995; 76 (10 Suppl): 2086-91.
8. Jacobs IJ, Skates SJ, MacDonald N, et al. Screening for ovarian cancer: a pilot randomised controlled trial. *Lancet* 1999; 353: 1207-10.
9. Menon U, Talaat A, Jeyarajah AR, et al. Ultrasound assessment of ovarian cancer risk in postmenopausal women with CA125 elevation. *Br J Cancer* 1999; 80: 1644-7.
10. Munstedt K, Krisch M, Sachsse S, Vahrson H. Serum CA 125 levels, survival in advanced ovarian cancer. *Arch Gynecol Obstet* 1997; 259: 117-23.
11. Hunter VJ, Daly L, Helms M, et al. The prognostic significance of CA 125 half-life in patients with ovarian cancer who have received primary chemotherapy after surgical cytoreduction. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 1164-7.
12. Rustin GJ, Bast RC Jr, Kelloff G, et al. Use of CA-125 in clinical trial evaluation of new therapeutic drugs for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3119-326.
13. Earle CC, Schrag D, Neville BA, et al. Effect of surgeon specialty on processes of care and outcomes for ovarian cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 172-80.
14. Kojima T, Oh-eda M, Hattori K, et al. Molecular cloning and expression of megakaryocyte potentiating factor cDNA. *J Biol Chem* 1995; 270: 21984-90.
15. Ono K, Tanaka T, Tsunoda T, et al. Identification by cDNA microarray of genes involved in ovarian carcinogenesis. *Cancer Res* 2000; 60: 5007-11.
16. Galgano MT, Hampton GM, Frierson HF Jr. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. *Mod Pathol* 2006; 19: 847-53.
17. Hellström I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 3695-700.
18. Havrilesky LJ, Whitehead CM, Rubatt JM, et al. Evaluation of biomarker panels for early stage ovarian cancer detection and monitoring for disease recurrence. *Gynecol Oncol* 2008; 110: 374-82.
19. 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.
20. Scholler N, Fu N, Yang Y, et al. Soluble member (s) of the mesothelin/megakaryocyte potentiating factor family are detectable in sera from patients with ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 11531-6.
21. McIntosh MW, Drescher C, Karlan B, et al. Combining CA 125 and SMR serum markers for diagnosis and early detection of ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004; 95: 9-15.

22. Badgwell D, Lu Z, Cole L, et al. Urinary mesothelin provides greater sensitivity for early stage ovarian cancer than serum mesothelin, urinary hCG free beta subunit and urinary hCG beta core fragment. *Gynecol Oncol* 2007; 106: 490-7
23. Kruk P, Saunders BO, Wilbanks GD, et al. Detection of ovarian cancer by elevated urinary levels of Bcl-2. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2006; 47: 572-3.
24. Lappöhn RE, Burger HG, Bouma J, et al. Inhibin as a marker for granulosa cell tumours. *N Engl J Med* 1989; 321: 790-3.
25. Healy DL, Burger HG, Mamers P, et al. Elevated serum inhibin concentrations in postmenopausal women with ovarian tumours. *N Engl J Med* 1993; 329: 1539-42.
26. Matzuk MM, Kumar TR, Shou W, et al. Transgenic models to study the roles of inhibins and activins in reproduction, oncogenesis and development. *Recent Prog Horm Res* 1996; 51: 123-54.
27. Robertson DM, Cahir N, Burger HG, et al. Combined inhibin and CA125 assays in the detection of ovarian cancer. *Clin Chem* 1999; 45: 651-8.
28. Lambert-Messerlian GM, DePasquale SE, Maybruck WM, et al. Secretion of activin A in recurrent epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 1999; 74: 93-7.
29. Zheng W, Lu JJ, Luo F, et al. Tumor stroma as the main source of inhibin production in ovarian epithelial tumors. *Am J Reprod Immunol* 2000; 44: 104-13.
30. Underwood LJ, Tanimoto H, Wang Y, et al. Cloning of tumor-associated differentially expressed gene-14, a novel serine protease overexpressed by ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59: 4435-9.
31. Luo LY, Katsaros D, Scorilas A, et al. Prognostic value of human kallikrein 10 expression in epithelial ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2372-9.
32. Borgos CA, Kishi T, Scorilas A, et al. Human Kallikrein 8 protein is a favorable prognostic marker in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1488-93.
33. Dorn J, Schmitt M, Kates R, et al. Primary tumor levels of human tissue kallikreins affect surgical success and survival in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1742-8.
34. Rosen DG, Wang L, Atkinson JN, et al. Potential markers that complement expression of CA125 in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2005; 99: 267-77.
35. Luo LY, Katsaros D, Scorilas A, et al. The serum concentration of human kallikrein 10 represents a novel biomarker for ovarian cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Res* 2003; 63: 807-11.
36. Diamandis EP, Yousef GM, Soosaipillai AR, Bunting P. Human kallikrein 6 (zyme/protease M/neurosin): a new serum biomarker of ovarian carcinoma. *Clin Biochem* 2000; 33: 579-83.
37. Rebbeck TR, Lynch HT, Neuhausen SL, et al. Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *N Engl J Med* 2002; 346 (1616-22).
38. Gaarenstroom KN, van der Hiel B, Tollenaar RA, et al. Efficacy of screening women at high risk of hereditary ovarian cancer: results of an 11-year cohort study. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16 Suppl 1: 54-9.
39. Hermsen BB, Olivier RI, Verheijen RH, et al. No efficacy of annual gynaecological screening in BRCA1/2 mutation carriers; an observational follow-up study. *Br J Cancer* 2007; 96: 1335-42.
40. Safaei R, Howell SB. Copper transporters regulate the cellular pharmacology and sensitivity to Pt drugs. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 53: 13-23.
41. Mansouri A, Zhang O, Ridgway LD, et al. Cisplatin resistance in an ovarian cancer is associated with a defect in programmed cell death control through XIAP regulation. *Oncol Res* 2003; 13: 399-404.
42. Muggia FM, Braly PS, Brady MF, et al. Phase III randomized study of cisplatin versus paclitaxel versus cisplatin and paclitaxel in patients with suboptimal stage III and IV ovarian cancer: a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol* 2000; 18: 106-15.
43. Penson RT, Oliva E, Skates SJ, et al. Expression of multidrug resistance protein-1 protein inversely correlates with paclitaxel response and survival in ovarian cancer patients: a study in serial samples. *Gynecol Oncol* 2004; 93: 98-106.
44. Yu D. Mechanisms of ErbB2-mediated paclitaxel resistance and trastuzumab-mediated paclitaxel sensitization in ErbB2-overexpressing breast cancers. *Semin Oncol* 2001; 28: 12-7.
45. Zaffaroni N, Pennati M, Colella G et al. Expression of the anti-apoptotic gene survivin correlates with taxol resistance in human ovarian cancer. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 1406-12.
46. Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H, Horwitz SB. Mechanisms of taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* 2003; 22: 7280-95.
47. Walker G, MacLeod K, Williams A, et al. Estrogen-regulated gene expression predicts response to endocrine therapy in patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2007; 106: 461-8.
48. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008; 110: 13-21.