

Telomeraza – marker molekularny w surowicy chorych na raka jajnika

Telomerase – molecular marker in blood of ovarian cancer patients

Ewa Góra¹, Jerzy Korczyński², Katarzyna Wójcik-Krowiranda², Leszek Gottwald³, Andrzej Bieńkiewicz²

¹Klinika Perinatologii i Ginekologii, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi; kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Przemysław Oszukowski

²Klinika Ginekologii Onkologicznej, Katedra Onkologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi; kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Andrzej Bieńkiewicz

³Oddział Opieki i Radioterapii Paliatywnej, Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. M. Kopernika w Łodzi; ordynator: lek. Andrzej Dukowicz

Przeгляд Menopauzalny 2009; 1: 33–39

Streszczenie

W przeprowadzanych w ciągu ostatnich 10 lat badaniach wskazuje się na diagnostyczno-prognostyczne znaczenie wykrywania komórek nowotworowych krążących we krwi (*circulating tumour cells* – CTC) przy wykorzystaniu badania ekspresji markerów molekularnych za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (*polymerase chain reaction* – PCR). Jednym z takich markerów jest telomeraza, potencjalny czynnik predykcyjny i rokowniczy dla wielu różnych nowotworów, w tym dla raka jajnika.

Cel: Celem pracy była ocena telomerazy jako markera molekularnego dla raka jajnika i jej wykorzystania do celów diagnostyczno-prognostycznych. Badania prowadzono w Klinice Ginekologii Onkologicznej Katedry Onkologii oraz Zakładzie Kancerogenezy Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Materiał i metody: Badaniami objęto 57 pacjentek z dotychczas nieleczonymi guzami jajnika, do grupy kontrolnej kwalifikując 20 zdrowych kobiet. Od każdej pacjentki pobrano krew i po uzyskaniu CTC przy użyciu kulek immunomagnetycznych i wirowania frakcjonującego wyizolowano RNA. Następnie badano ekspresję *TERT*, wykorzystując reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym (*Real-Time* PCR – RT-PCR) i potwierdzano ją za pomocą elektroforezy. Oceniano korelacje między ekspresją badanych genów a klasycznymi czynnikami prognostycznymi. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej.

Wyniki: Dodatnią ekspresję *TERT* stwierdzono (jednocześnie w RT-PCR i rozdziale elektroforetycznym) u 14/33 pacjentki (42,4%) z guzami złośliwymi, u 5/24 (20,8%) kobiety z grupy II i u 7/24 (35%) z grupy kontrolnej. Nie stwierdzono znaczących różnic między ekspresją *TERT* przy użyciu różnych metod w każdej z grup i pomiędzy grupami. Nie odnotowano również znaczących zależności pomiędzy ekspresją *TERT* a czynnikami prognostycznymi raka jajnika.

Wnioski: Na podstawie badań przeprowadzonych na uzyskanym materiale stwierdzić można, że telomeraza nie może być traktowana jako wystarczająco czuły i swoisty marker molekularny wykrywania komórek nowotworowych we krwi w raku jajnika do celów klinicznych i badawczych z wykorzystaniem przedstawionej metody.

Słowa kluczowe: telomeraza, *TERT*, rak jajnika, marker molekularny, CTC, RT-PCR

Summary

Studies conducted in last 10 years suggest diagnostic and prognostic significance of circulating tumour cells (CTC) detection using expression of molecular markers detected in Real-Time PCR (RT-PCR). Telomerase is one of this markers as a potential and prognostic factor for several cancers including ovarian cancer.

Objectives: The aim of the study was to estimate telomerase as molecular marker for ovarian cancer and to establish its diagnostic and prognostic importance. The study was performed in Department of Oncologic Gynaecology of Medical University of Lodz and Department of Molecular Cancerogenesis of Medical University of Lodz.

Materials and methods: There were 57 patients included who were diagnosed ovarian tumour, without previous treatment. Control group consisted of 20 healthy women. From each patient blood was collected and after isolation of CTCs using immunomagnetic beads and density gradient centrifugation mRNA was isolated. Then, there was an expression of *TERT* detected by RT-PCR and confirmed in electrophoresis. Correlations between expression of gene analysed in study and prognostic factors for ovarian cancer were measured. Results were submitted statistical analysis.

Results: A positive expression of *TERT* (simultaneously in RT-PCR and electrophoresis) was reported in 14 out of 33 patients (42,4%) in the group with malignant tumours, 5/24 (20,8%) in women from the group II and 7/20

Adres do korespondencji:

Ewa Góra, Klinika Perinatologii i Ginekologii, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź

(35%) from the control group. There was no significant difference between expression of *TERT* using different methods in each group and between groups. There was neither no significant relationship between expression of this gene and prognostic factors of ovarian cancer.

Conclusions: Telomerase can't be used as sufficiently sensitive and specific molecular marker for CTCs detection in blood in ovarian cancer patients using presented method.

Key words: telomerase, TERT, ovarian cancer, molecular cancer, CTC, RT-PCR

Wstęp

Telomeraza, wyspecjalizowana RNA-polimeraza odpowiedzialna za odbudowywanie telomerów chromosomowych, występuje w nielicznych typach aktywnie dzielących się komórek, u których utrzymanie stałej długości chromosomu, a przez to stabilności całego genomu, jest niezbędne [1–3]. Specyficzne zdolności telomerazy powodują, że komórka, podlegając nieograniczonym podziałom, może nabierać cech komórki nowotworowej. Telomerazę można zatem nazwać markerem molekularnym oraz potencjalnym czynnikiem predykcyjnym i rokowniczym dla wielu różnych nowotworów [4–6]. Badania prowadzone w ostatnich 10 latach wykazały aktywność tego enzymu w prawie 80–95% komórek nowotworowych, wyjaśniając w ten sposób jeden z mechanizmów decydujących o ich nieśmiertelności [7–10]. Do nowotworów, w których wykryto obecność telomerazy, należy m.in. rak jajnika [5, 7].

Rak jajnika zajmuje czwarte miejsce wśród przyczyn zgonów spowodowanych nowotworami złośliwymi u kobiet. Stanowiąc mniej niż 1/3 nowotworów złośliwych narządów płciowych kobiet w Polsce, charakteryzuje się jednocześnie najmniejszą przeżywalnością wśród przypadków guzów złośliwych układu rozrodczego. Odsetek pięcioletnich przeżyć dla wszystkich stopni zaawansowania klinicznego tego nowotworu wynosi 30–40% i w ciągu ostatnich 30 lat nie poprawił się znacząco [11]. Przyczyną tej niekorzystnej struktury statystycznej raka jajnika jest brak dostatecznie czułych i swoistych metod diagnostycznych i przesiewowych [12, 13]. Niezwykle istotna wydaje się zatem konieczność kontynuacji badań nad biologią raków jajnika w celu opracowania optymalnych schematów diagnostycznych, a co za tym idzie – również terapeutycznych – dla tego nowotworu.

Dotychczas na podstawie badań tkanek nowotworowych i poptuczyn z jamy otrzewnej wykazano, że ponad 80% nowotworów złośliwych jajnika wykazuje aktywność telomerazy [5, 14, 15]. W piśmiennictwie niewiele jest jednak badań wykrywających obecność komórek raka jajnika we krwi, a ich wyniki są rozbieżne [16]. Detekcja krążących we krwi komórek nowotworowych na podstawie obecności telomerazy mogłaby być jedną z najbardziej obiecujących, nieinwazyjnych metod wykorzystania tego enzymu w diagnostyce raka jajnika. Opracowanie odpowiedniej techniki wykrywania komórek nowotworowych we krwi, świadczących o zagrożeniu przerzutami lub istnieniu ognisk przerzutowych, umożliwiłoby wprowadzenie efektywniejszej diagnostyki

ki nowotworów jajnika. Mogłoby to zwiększyć wczesną wykrywalność i ułatwić klasyfikację kliniczną tego nowotworu, a tym samym umożliwiłoby podejmowanie odpowiednich decyzji terapeutycznych oraz bardziej precyzyjne monitorowanie wyników leczenia chorych.

Cel pracy

1. Ocena ekspresji genu dla katalitycznej podjednostki telomerazy (*TERT*) w komórkach nowotworowych krążących we krwi (*circulating tumour cells* – CTC) u chorych na raka jajnika z wykorzystaniem reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (*Real-Time PCR* – RT-PCR).
2. Określenie znaczenia obecności *TERT* we krwi pacjentek z rakiem jajnika dla celów diagnostyczno-prognostycznych.

Materiał i metody

Badania prowadzono w Klinice Ginekologii Onkologicznej Katedry Onkologii oraz Zakładzie Kancerogenezy Molekularnej Katedry Medycyny Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi od 1.01.2005 r. do 31.03.2008 r., po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej nr RNN/132/02/KE. Objęto nimi 57 kobiet w wieku 30–74 lat (średnia wieku 53,2 ± 11,96 roku) operowanych z powodu rozpoznanych po raz pierwszy guzów jajnika. Badane podzielono na dwie grupy: grupę I stanowiącą przez chore na raka jajnika (n = 33) i grupę II – pacjentki z guzami łagodnymi jajnika (n = 24). Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 20 zdrowych kobiet.

Od każdej pacjentki pobrano 10 ml krwi do probówek koagulacyjnych z cytrynianem sodu i przechowywano w temp. 4°C maksymalnie do 72 godz. Następnie izolowano CTC z wykorzystaniem kulek immunomagnetycznych związanych z monoklonalnymi przeciwciałami Ber-EP4 (*Dynabeads Epithelial Enrich*, *Dynal Biotech*) oraz wirowania frakcjonującego z wykorzystaniem Histopaque®/Ficoll (Sigma). Po uzyskaniu mRNA z CTC badano ekspresję genu dla podjednostki katalitycznej telomerazy (*TERT*) z wykorzystaniem RT-PCR i potwierdzano ją za pomocą elektroforezy. Badano korelacje między ekspresją badanego genu a klasycznymi czynnikami prognostycznymi dla raka jajnika (wiek, zaawansowanie kliniczne, zaawansowanie histopatologiczne, obecność płynu w jamie otrzewnej, zakres operacji). Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z zasto-

sowaniem testu χ^2 , a w przypadku niespełnienia założeń wykorzystano test dokładny Fishera.

Celem potwierdzenia swoistości badanego genu dla raka jajnika analizowano jego ekspresję w 8 próbkach z tkankami raka jajnika (5 próbek pochodziło od chorych z grupy I). W celu sprawdzenia czułości metody wykonano natomiast szereg rozcieńczeń mieszaniny tkankowej (5 ×, 10 ×, 50 ×, 100 ×, 200 ×), a następnie wykonano analizę ekspresji genu w uzyskanych mieszaninach.

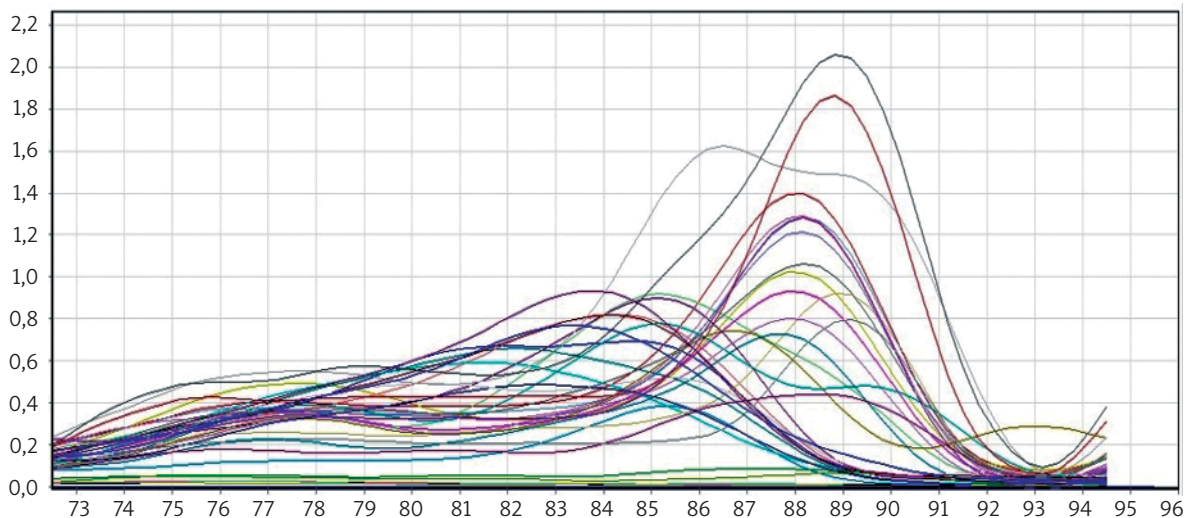
Wyniki

W grupie I (rak jajnika) stwierdzono ekspresję genu w 22/33 przypadków (66%), analizując krzywe dysocjacji RT-PCR (ryc. 1), w 17/33 (51%) odczytując wartości Ct RT-PCR oraz w 15/33 (45%) w rozdziale elektroforetycznym (ryc. 2). W grupie II (łagodne guzy jajnika) ekspresja *TERT* wystąpiła w 7/24 przypadki (29%), w 1/24 (4%) w wyniku analizy Ct RT-PCR oraz w 5/24 (21%) w elektroforezie. W grupie kontrolnej po przeanalizowaniu RT-PCR, Ct RT-PCR oraz rozdziału elektroforetycznego

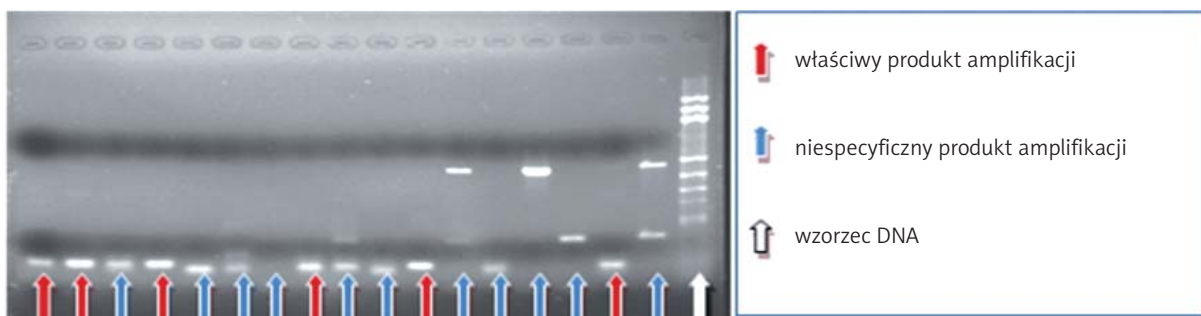
ekspresja *TERT* wystąpiła odpowiednio: w 10/20 (50%), 1/20 (5%) oraz 11/20 (55%) przypadków.

Oceniono zależności pomiędzy trzema różnymi sposobami analizy ekspresji genu *TERT*, stwierdzając w grupie I (rak jajnika) istotne statystycznie różnice między analizą krzywych dysocjacji RT-PCR a rozdziałem elektroforetycznym oraz oceną Ct RT-PCR a rozdziałem elektroforetycznym ($p < 0,05$). W grupie II i w grupie kontrolnej różnice w sposobie określania ekspresji genu *TERT* nie były istotne statystycznie ($p > 0,05$).

Dodatnia ekspresja (równoczesne występowanie ekspresji genu w RT-PCR i w rozdziale elektroforetycznym) genu *TERT* wystąpiła u 14/33 pacjentki (42,4%) w grupie z guzami złośliwymi, natomiast u 5/24 (20,8%) kobiety z grupy II i u 7/20 (35%) z grupy kontrolnej. Stwierdzono istotne statystycznie różnice między ekspresją genu *TERT* w grupie pacjentek z rakami jajnika i w grupie kontrolnej, w obu przypadkach ocenianej na podstawie analizy rozdziału elektroforetycznego, zbyt słabe jednak, aby traktować je jako istotne z punktu widzenia klinicznego.



Ryc. 1. Wykres krzywej dysocjacji genu *TERT* dla próbek z grupy I (pacjentki z rakiem jajnika)



Ryc. 2. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR genu *TERT* dla próbek z grupy I (pacjentki z rakiem jajnika)

Poddano ocenie korelacje ekspresji *TERT* z klasycznymi czynnikami prognostycznymi (tab. I). Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności między ekspresją genu *TERT* a wiekiem, stopniem zaawansowania klinicznego i różnicowaniem histopatologicznego czy zakresem operacji i obecnością płynu w jamie otrzewnej. Żadnych istotności statystycznych nie stwierdzono także, badając zależności między ekspresją genów i obec-

nością markerów nowotworowych oraz typem histologicznym guza (tab. II).

W żadnej z 8 badanych próbek z tkankami raka jajnika nie znaleziono genu *TERT* (ryc. 3.), jak również w żadnym z rozcieńczeń (ryc. 4.).

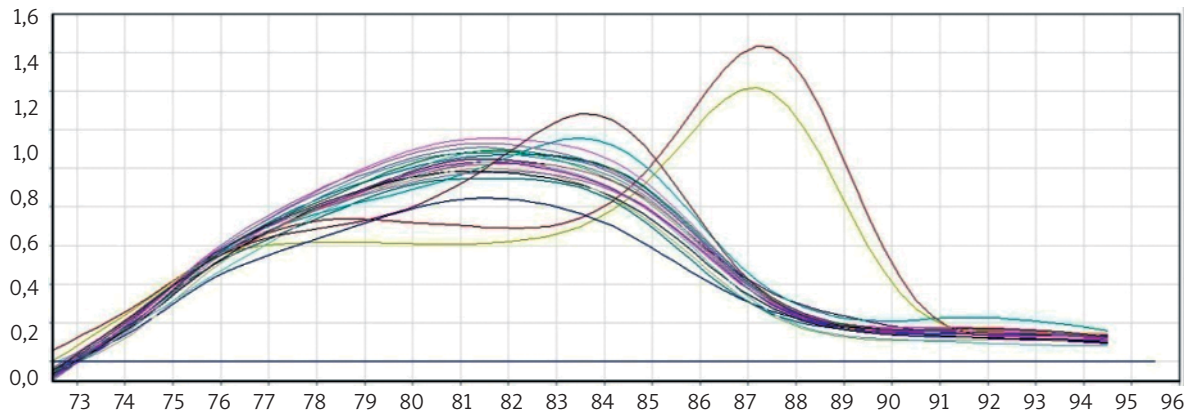
Dyskusja

Celem pracy była ocena wykorzystania telomerazy jako markera molekularnego i jego zastosowania jako czynnika diagnostyczno-prognostycznego w raku jajnika. Ze względu na potencjalną rolę *TERT* jako wskaźnika zdolności raka do przerzutowania i tworzenia guzów wtórnych, badanie obecności telomerazy w CTC mogłoby mieć większe znaczenie niż innych biomarkerów.

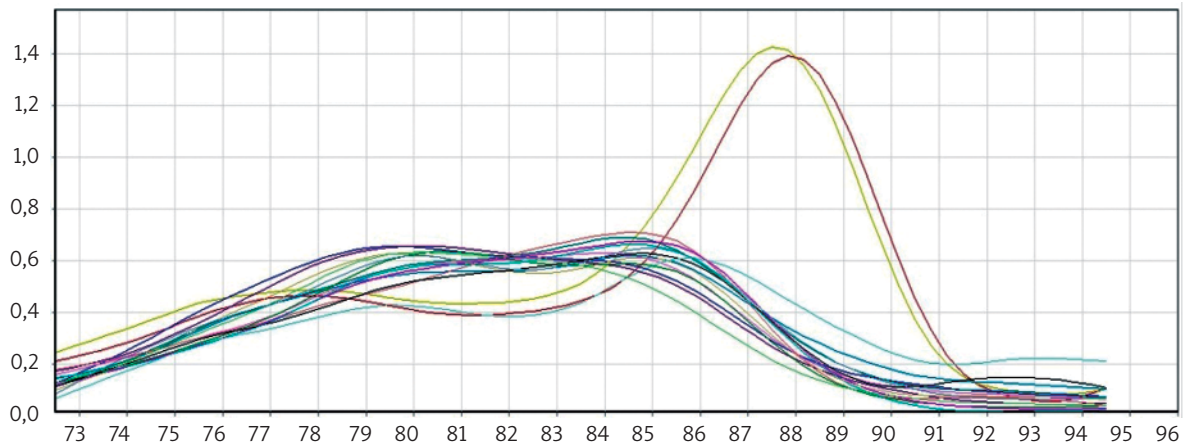
Główny problem, jaki napotymano w trakcie badania ekspresji *TERT* w CTC, dotyczył obecności we krwi aktywnych limfocytów, w których również stwierdza się ekspresję telomerazy [2, 3]. Aby uniknąć fałszywie dodatnich wyników, a tym samym otrzymać bardziej skuteczną metodę, zastosowano kulki magnetyczne. Modyfikacja ta, po raz pierwszy opisana przez Hardinghama w 1993 r. [17], umożliwiła w relatywnie prosty sposób oddzielenie CTC od jądrzastych komórek krwi, w tym limfocytów. Poza tym celem uzyskania jeszcze większej specyficzności badania, przed izolacją CTC za pomocą kulek immunomagnetycznych, zastosowano wirowanie frakcjonujące z wykorzystaniem Histopaque®/Ficoll. Metoda ta pozwoliła na wyizolowanie frakcji komórek jądrzastych z krwi, w tym CTC, których gęstość zbliżona jest do limfocytów. Wyeliminowano w ten sposób czerwone krwinki, które mogłyby wpływać na interakcje między kulkami immunomagnetycznymi a nabłonkowymi komórkami nowotworowymi, co wg Gauthiera i wsp. w istotny sposób zwiększa swoistość metody [9]. W literaturze światowej znaleziono zaledwie kilka prac, w których komórki raka jajnika krążące we krwi wyizolowane zostały przy użyciu kulek immunomagnetycznych [18, 19]. Na uwagę zasługują prace wskazujące na RT-PCR jako metodę optymalną do oceny ekspresji genów w CTC, dzięki której możliwe jest wykrywanie zaledwie kilku komórek nowotworowych [20]. W przedstawionej pracy udało się wykryć ekspresję genu *TERT* i zidentyfikować próbki jako pozytywne dla ekspresji tego genu w liczbie 14/33 pacjentki (42,4%) w grupie z guzami złośliwymi jajnika. Pozostałe ponad 27,3% pacjentek (9/33) uznano za negatywne dla ekspresji *TERT*. Rozpatrując tak dużą częstość braku ekspresji *TERT* u pacjentek w grupie z rakiem jajnika, należy wziąć pod uwagę niską zawartość lub brak telomerazy w niektórych komórkach nowotworowych. Wniosek ten potwierdzają częściowo badania tkanek nowotworowych na obecność ekspresji *TERT*, w których wszystkie 8 próbek nie wykazywało obecności telomerazy. Wśród nich było 5 próbek pochodzących od pacjentek, u których uzyskano negatywne wyniki podczas analizy CTC. Nega-

Tab. I. Ekspresja genu *TERT* w grupie II (z rakiem jajnika) mierzona na podstawie analizy krzywych dysocjacji RT-PCR (PCR) i rozdziatu elektroforetycznego (GEL) w zależności od czynników prognostycznych dla raka jajnika

Czynniki prognostyczne raka jajnika				
	ekspresja <i>TERT</i>	PCR	GEL	pozytywne
stopień zaawansowania klinicznego wg FIGO				
FIGO I, II	+	6	3	3
(n = 9)	-	3	6	-
FIGO III, IV	+	16	12	11
(n = 24)	-	8	12	-
stopień różnicowania histologicznego				
G1	+	5	2	2
(n = 8)	-	3	6	-
G2, G3	+	17	13	12
(n = 25)	-	5	12	-
wysiłek otrzewnowy				
wysiłek obecny	+	7	7	6
(n = 11)	-	4	4	-
wysiłek nieobecny	+	15	8	8
(n = 22)	-	7	14	-
zakres operacji				
operacja radykalna	+	18	11	10
(n = 28)	-	10	17	-
operacja nieradykalna/ /wycinki	+	4	4	4
(n = 5)	-	1	1	-
markery nowotworowe				
podwyższony tylko jeden marker/żaden	+	5	4	3
(n = 9)	-	4	5	0
podwyższony > 1 marker	+	17	11	11
(n = 24)	-	7	13	0



Ryc. 3. Wykres krzywej dysocjacji genu *TERT* dla badanych próbek tkankowych



Ryc. 4. Wykres krzywej dysocjacji genu *TERT* dla badanych rozcieńczeń tkankowych

tywny wynik w badaniu tkanek można również tłumaczyć heterogennym składem komórkowym badanego skrawka tkanki, w którym komórki nowotworowe zdolne do nieograniczonej liczby podziałów mogą stanowić niewielki procent populacji. Jednocześnie trzeba zauważyć, że tylko takie komórki mogą być źródłem ognisk przerzutów.

Inną przyczyną występowania wyników negatywnych dla ekspresji *TERT* w komórkach krążących we krwi może być różnorodna ekspresja antygenów na CTC wiążących się z BerEP-4 na powierzchni kulek immunomagnetycznych [19, 21].

Jeszcze innym wytłumaczeniem ujemnych wyników ekspresji *TERT* jest histologia guza. Jak dowodzili Duggan i wsp., a wcześniej Kyo, śluzowe raki jajnika mogą nie wykazywać ekspresji *TERT* [5, 7], podobnie jak złośliwe nowotwory jasnokomórkowe [22]. W prezentowanej pracy ekspresji *TERT* nie wykazano w 5 próbkach krwi pacjentek ze śluzowym rakiem jajnika i 1 z 2 uzyskanych od kobiet z guzem jasnokomórkowym. Wyniki te mogą czę-

ściowo potwierdzać przypuszczenia Duggana i Kyo, równocześnie wykluczając telomerazę jako molekularny marker dla tego typu histologicznego raków jajnika. Poza tym wyniki ujemne mogą być związane także ze stopniem zaawansowania klinicznego. We wcześniejszych stadiach choroby komórki nowotworowe mogą być niewykrywalne we krwi obwodowej, a rozprzestrzeniać się tylko drogą układu limfatycznego [13, 19]. Wnioski te są zbliżone do wyników uzyskanych w pracy, gdzie 3/9 pacjentek (33,3%) z FIGO I lub II wykazywało negatywną ekspresję *TERT*, natomiast wśród pacjentek z FIGO III lub IV tylko 5/24 (20,8%). Niestety, różnice te, podobnie jak i wspomniane wcześniej wyniki dotyczące typu histologicznego guzów, nie były istotne statystycznie.

Prezentowana praca na podstawie uzyskanych istotnych statystycznie różnic między obecnością ekspresji *TERT* w próbkach uzyskanych od pacjentek z rakami jajnika (42,4%) i pacjentek z grupy kontrolnej (35%) wskazuje na możliwość wykorzystania telomerazy jako markera molekularnego w diagnostyce raka jajnika. Dalszych

badania wymaga jednak stwierdzenie wyników pozytywnych dla ekspresji *TERT* także w guzach łagodnych (5/24 = 20,8%), których liczba, choć mniejsza niż w grupie chorych na raka jajnika (14/33 = 42,4%), nie różniła się w sposób istotny statystycznie. Kyo i wsp. tłumaczą obecność telomerazy w guzach łagodnych i granicznych (w przedstawionym badaniu oba z guzów granicznych wykazywały ekspresję *TERT*) jako jeden z czynników biorących udział w ich progresji [5]. Zmiany te mają wykazywać słabą ekspresję *TERT* ze względu na obecność populacji nieśmiertelnych komórek z obecną w nich telomerazą. Pojawianie się takiej słabej ekspresji telomerazy wyjaśniane było przez Kyo udziałem tego enzymu w początkowych przemianach procesu kancerogenezy, a jej istnienie w zmianach łagodnych lub guzach granicznych jako prawdopodobieństwo ich przemiany w guzy złośliwe.

Niestety, prawdopodobna pozostaje także obecność aktywnych limfocytów T i B, które mimo prób wyizolowania z krwi badanej mogły pozostać w próbkach, dając fałszywie dodatnie wyniki ekspresji *TERT* [2, 23]. Paterlini-Brechot i Benali opisują ponadto, że kulki immunomagnetyczne mogą łączyć się z makrofagami, komórkami plazmatycznymi i jądrzastymi prekursorami komórek hematopoetycznych, które albo same wykazują obecność telomerazy, albo dają pozytywną jej ekspresję po fagocytozie komórek nowotworowych krążących we krwi [24]. Poza tym we krwi występować może szereg nabłonkowych komórek nienowotworowych [25], związanych z łagodnymi chorobami proliferacyjnymi, zmianami zapalnymi (zwłaszcza wątroby), urazami i drobnymi interwencjami chirurgicznymi [26–28]. Taka interpretacja obecności fałszywie dodatnich wyników dla ekspresji *TERT* wykluczałaby telomerazę jako marker uniwersalny i specyficzny, gdyż może występować u pacjentek z infekcjami i licznymi łagodnymi chorobami towarzyszącymi rakowi jajnika.

W przeprowadzonych przez autorów opracowania badaniach ekspresja *TERT* była pozytywna w 33,3% przypadków w grupie chorych z mniejszym stopniem zaawansowania klinicznego oraz w 45,8% w grupie chorych z większym stopniem zaawansowania klinicznego. Zbliżone, niewielkie różnice i także nieistotne pod względem statystycznym, występowały pomiędzy liczbą wyników pozytywnych u pacjentek z większym stopniem różnicowania (25%) a chorymi z guzami o mniejszym stopniu różnicowania (48%). W świetle tych wyników telomeraza nie nadaje się na marker różnicujący guzy jajnika pod względem stopnia różnicowania histopatologicznego czy zaawansowania klinicznego, a co za tym idzie – nie jest związana z potencjalną złośliwością guza. Sprzeczne jest to z tezami wysuniętymi przez Hiyamę, a potwierdza wstępne obserwacje Kyo [2, 5]. Ponadto pozostałe czynniki prognostyczne nie wykazywały korelacji istotnej pod względem statystycznym z obecnością pozytywnej ekspresji *TERT*, co potwierdzają wcześniejsze badania Sakamoto, z których wynika, że telomeraza nie

zawsze wykazuje korelacje z czynnikami kliniczno-patologicznymi raka jajnika i nie może być traktowana jako indywidualny lub skorelowany czynnik prognostyczny dla tego nowotworu [22].

Podsumowując, na podstawie badań przeprowadzonych na uzyskanym materiale stwierdzić można, że telomeraza nie może być traktowana jako wystarczająco czuły i swoisty marker molekularny wykrywania komórek nowotworowych we krwi w raku jajnika do celów klinicznych i badawczych z wykorzystaniem przedstawionej metody.

Wnioski

1. Badanie ekspresji genu *TERT* w komórkach nowotworowych krążących we krwi obwodowej za pomocą przedstawionej metody jest niedostatecznie czułe i swoiste, aby mogło być przydatne w diagnostyce obecności CTC.

2. Telomeraza nie może być wykorzystana jako marker molekularny w diagnostyce raka jajnika za pomocą przedstawionej metody.

3. Nie znaleziono istotnych statystycznie zależności między obecnością ekspresji *TERT* a znanymi czynnikami prognostycznymi dla raka jajnika (wiek, zaawansowanie kliniczne, zaawansowanie histopatologiczne, obecność płynu w jamie otrzewnej, zakres operacji).

4. Znaczenie diagnostyczne wykrywania CTC z zastosowaniem detekcji ekspresji markerów molekularnych wymaga dalszych badań z udziałem większej grupy pacjentek.

Praca finansowana przez UM w Łodzi z pracy własnej nr 502-11-438.

Piśmiennictwo

1. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, et al. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 1996; 18: 173-9.
2. Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, et al. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol* 1995; 155: 3711-5.
3. Norrback KF, Roos G. Telomeres and telomerase in normal and malignant haematopoietic cells. *Eur J Cancer* 1997; 33: 774-80.
4. Shay JW, Gazdar AF. Telomerase activity in the early detection of cancer. *J Clin Pathol* 1997; 50: 106-9.
5. Kyo S, Kanaya T, Ishikawa H, et al. Telomerase activity in gynecological tumors. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 2023-8.
6. Kim NW. Clinical implications in telomerase in cancer. *Eur J Cancer* 1997; 5: 781-6.
7. Duggan BD, Wan M, Yu MC, et al. Detection of ovarian cancer cells: comparison of a telomerase assay and cytologic examination. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 238-42.
8. Bednarek AK, Sahin A, Brenner AJ, et al. Analysis of telomerase activity levels in breast cancer: positive detection at the in situ breast carcinoma stage. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 11-6.
9. Gauthier LR, Granotier C, Soria JC, et al. Detection of circulating carcinoma cells by telomerase activity. *Br J Cancer* 2001; 84: 631-5.
10. Faraoni I, Turriziani M, Masci G, et al. Decline in telomerase activity as a measure of tumor cell killing by antineoplastic agents in vitro. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 579-85.

11. Benedet JL, Bender H, Jones H 3rd, et al. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gynaecol Obstet* 2000; 70: 209-62.
12. Bast RC Jr, Brewer M, Zou C, et al. Prevention and early detection of ovarian cancer: mission impossible? *Recent Results Cancer Res* 2007; 174: 91-100.
13. Ginekologia onkologiczna. Markowska J (red.). T. 1–2, wyd. 2. Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2006.
14. Kyo S, Takakura M, Tanaka M, et al. Quantitative differences in telomerase activity among malignant, premalignant, and benign ovarian lesions. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 399-405.
15. Kyo S, Kanaya T, Takakura M, et al. Expression of human telomerase subunits in ovarian malignant, borderline and benign tumors. *Int J Cancer* 1999; 80: 804-9.
16. von Schlippe M, Rustin GJ. Circulating tumour markers in ovarian tumours. *Forum (Genova)* 2000; 10: 383-92.
17. Hardingham JE, Kotasek D, Farmer B, et al. Immunobead-PCR: a technique for the detection of circulating tumor cells using immunomagnetic beads and the polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1993; 53: 3455-8.
18. Stimpfl M, Schmid BC, Obermair A, et al. Comparison of flow cytometry and RT-PCR for the detection of ovarian cancer cells in peripheral blood. *Oncol Res* 1999; 11: 367-73.
19. Sapi E, Okpokwasili NI, Rutherford T. Detection of telomerase-positive circulating epithelial cells in ovarian cancer patients. *Cancer Detect Prev* 2002; 26: 158-67.
20. Ring AE, Zabaglo L, Ormerod MG, et al. Detection of circulating epithelial cells in the blood of patients with breast cancer: comparison of three techniques. *Br J Cancer* 2005; 92: 906-12.
21. Soria JC, Gauthier LR, Raymond E, et al. Molecular detection of telomerase-positive circulating epithelial cells in metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 971-5.
22. Sakamoto M, Toyozumi T, Kikuchi Y, et al. Telomerase activity in gynecological tumors. *Oncol Rep* 2000; 7: 1003-9.
23. Weng NP, Levine BL, June CH, Hodes RJ. Regulated expression of telomerase activity in human T lymphocyte development and activation. *J Exp Med* 1996; 183: 2471-9.
24. Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett* 2007; 253: 180-204.
25. Fehm T, Solomayer E, Meng S, et al. Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells. *Cytotherapy* 2005; 7: 171-85.
26. Tahara H, Nakanishi T, Kitamoto M, et al. Telomerase activity in human liver tissues: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 1995; 55: 2734-6.
27. Goeminne JC, Guillaume T, Symann M. Pitfalls in the detection of disseminated non-hematological tumor cells. *Ann Oncol* 2000; 11: 785-92.
28. Crisan D, Ruark DS, Decker DA, et al. Detection of circulating epithelial cells after surgery for benign breast disease. *Mol Diagn* 2000; 5: 33-8.