Panele biomarkerów białkowych oraz markery niebiałkowe w diagnostyce raka jajnika

Panels of protein biomarkers and non-protein markers in the diagnosis of the ovarian cancer

Marta Denel, Agnieszka Marczak

Katedra Termobiologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki;
kierownik Katedry: dr hab. Aneta Koceva-Chyła, prof. nadzw. UŁ

Przegląd Menopauzalny 2013; 17 (5): 404-408

Streszczenie

Rak jajnika, nie bez powodu zwany „cichym zabójcą”, stanowi jeden z najtrudniejszych problemów w ginekologii onkologicznej. Z uwagi na brak specyficznych symptomów rozpoznawany jest w zaawansowanych stadiach rozwoju choroby, co znacznie ogranicza skuteczność terapii. Istnieje więc potrzeba wprowadzenia nowoczesnych metod do wczesnej diagnozy tego nowotworu. Mogą one nie tylko pomagać w wykryciu raka, lecz także dostarczać informacji o efektywności stosowanej terapii przeciwnowotworowej. Ważne jest, by markery nowotworowe były oznaczane w sposób jak najmniej inwazyjny oraz mało kosztowny, aby mogły być stosowane w badaniach przesiewowych prowadzonych na dużą skalę. Obecnie standardem jest stosowanie markera białkowego CA125, który nie jest jednak dostatecznie czuły ani swoisty. Wspomaga się więc go oznaczaniem dodatkowych markerów białkowych i użyciem metod statystycznych. Zasadne jest stosowanie tzw. paneli biomarkerów, czyli testów oznaczających kilka substancji jednocześnie, w celu uzyskania jak najwyższej czułości oraz specyficzności. Zastosowanie znalazły algorytm ROMA oraz test OVA1. Wciąż trwają badania nad wprowadzeniem kolejnych markerów, w tym niebiałkowych. Dzięki szybkiemu rozwojowi genetyki, proteomiki oraz metabolomiki zidentyfikowano liczne związki, które mogą znaleźć zastosowanie w badaniach skriningowych w celu wczesnego wykrywania raka jajnika.

Niniejsza praca przedstawia najnowsze doniesienia na temat biomarkerów w diagnostyce i leczeniu raka jajnika. Bardzo obiecująca wydaje się analiza materiału genetycznego, obejmująca zarówno wykrywanie mutacji genów, jak i zmiany epigenetyczne oraz badania mikroRNA.

Słowa kluczowe: rak jajnika, biomarkery nowotworowe, badania genetyczne.

Summary

Ovarian cancer is, not without reason, called the “silent killer”. It is one of the most difficult problems in gynecologic oncology. In the absence of specific symptoms it is recognized in the advanced stages of the disease, which greatly reduces the effectiveness of therapy. Therefore, there is a need for new methods for early diagnosis of cancer. They can not only assist in the detection of cancer but also provide information on the effectiveness of the treatment. It is important that the tumour markers are determined in the least invasive and less expensive way so as to be used for large-scale screening. The current standard is to use a protein marker CA125, which is not sufficiently sensitive and specific. So it is supported by determination of additional protein markers and statistical methods. It is reasonable to use the so-called biomarker panels, the test of more than one marker to achieve the highest sensitivity and specificity. The algorithm ROMA and test OVA1 are used. Currently, studies on the introduction of further markers, including non-protein markers are underway. With the rapid development of genetics, proteomics and metabolomics, a number of compounds are identified which can be used in screening tests for the early detection of ovarian cancer.

This paper presents the latest news on biomarkers in the diagnosis and treatment of ovarian cancer. The analysis of genetic material, including both the detection of gene mutations and epigenetic changes and microRNA studies, seems to be very promising.

Key words: ovarian cancer, cancer biomarkers, genetic research.

Adres do korespondencji:

dr hab. Agnieszka Marczak, prof. nadzw. UŁ, Katedra Termobiologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź, Polska, e-mail: aszwar@biol.uni.lodz.pl

Wstęp

W leczeniu chorób nowotworowych niezwykle istotna jest wczesna diagnoza. Dostępne obecnie metody nie zawsze pozwalają wykryć nowotwór w początkowym stadium rozwoju, co znacznie zmniejsza skuteczność leczenia. Szczególnie trudny do rozpoznania jest rak jajnika z uwagi na brak specyficznych objawów. Według statystyk odsetek 5-letnich przeżyć dla raka jajnika wykrytego w zaawansowanym stadium wynosi jedynie 20%, podczas gdy dla nowotworu zdiagnozowanego we wczesnej fazie jest to 90%. Obecnie jedynie 25% przypadków udaje się rozpoznać w początkowym stadium rozwoju [1, 18]. Te niepokojące dane wskazują, że istnieje potrzeba jak najszybszego opracowania biomarkera, którego oznaczanie pozwoliłoby na wczesne wykrycie choroby oraz prowadzenie efektywnego leczenia.

Ocena ryzyka zachorowania na raka jajnika z wykorzystaniem markera białkowego CA125 – panele biomarkerów

Od ponad dwóch dekad, podstawę w diagnozowaniu raka jajnika stanowi białko CA125 (*Cancer Antigen 125*) [5]. Nie jest to jednak marker specyficzny. Glikoproteina ta wytwarzana jest przez dojrzałe, prawidłowe tkanki: opłucnej, osierdza, otrzewnej, jelita grubego, trzustki, nerek, żołądka i pęcherza moczowego, a także w błonie śluzowej kanału i trzonu macicy. Zwiększone stężenie tego antygenu obserwowane jest również w: marskości wątroby, zapaleniu płuc, zapaleniu osierdza oraz nowotworach: trzustki, płuca, jelit, żołądka oraz w chłoniakach [3, 4]. W przypadku raka jajnika zwiększone stężenie CA125 obserwuje się w 85% przypadków raka surowicznego, 65% przypadków raka endometrioidalnego, 40% raka jasnokomórkowego oraz 36% przypadków raków niezróżnicowanych, a także jedynie u 12% pacjentek z rakiem śluzowym [7]. Ponadto należy podkreślić, że w przypadku raka jajnika sklasyfikowanego jako I stopień (wg FIGO) stężenie CA125 jest zwiększone jedynie u połowy pacjentek [1].

Z powodu złożoności oraz zróżnicowania histologicznego raka jajnika uważa się, że niemożliwe jest, aby pojedynczy marker pozwalał wykryć wszystkie podtypy raka jajnika z wysoką czułością oraz specyficznością, dlatego też zasadne jest stosowanie tzw. paneli biomarkerów, czyli testów oznaczających kilka substancji jednocześnie, w celu uzyskania jak najwyższej czułości oraz specyficzności [16]. Przykładem skutecznego wykorzystania takich złożonych badań są dwa testy: algorytm ROMA oraz test OVA1.

Algorytm ROMA

Algorytm ROMA (*Risk of Ovarian Malignancy Algorithm*) to najnowsze narzędzie, zatwierdzone we wrześ-

niu 2011 r. przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (*Food and Drug Administration – FDA*) do oceny ryzyka zachorowania na złośliwy nowotwór jajnika. Procedura ta polega na połączeniu kilku dotychczas stosowanych sposobów w jedną metodę oceny ryzyka. Badanie ROMA obejmuje trzy podstawowe składowe: statystyczne oszacowanie ryzyka zachorowania na złośliwy guz jajnika (uwzględniające status menopauzalny pacjentek) oraz dwa testy markerów nowotworowych: CA125 i HE4. Marker HE4 (*human epididymis protein 4*), znany również jako WFDC2 (*WAP 4-disulfide core domain 2*), jest niskocząsteczkową glikoproteiną, po raz pierwszy zidentyfikowaną w nabłonku dystalnej części najądra jako inhibitor proteazy biorący udział w dojrzewaniu plemników. Badania Lu i wsp. dowiodły, że czynnik ten odgrywa ważną rolę w procesie powstawania raka jajnika. Nadekspresja HE4 wiąże się ze zwiększoną migracją oraz adhezją komórek raka jajnika. Ograniczenie ekspresji genu *HE4* powoduje zahamowanie migracji komórek raka jajnika linii SKOV-3 (*SKOV-3 human ovarian adenocarcinoma cell line*), a także ogranicza proliferację oraz zdolność do inwazji komórek tej samej linii. Przypuszczalnie HE4 pobudza również ścieżkę sygnałową EGF-MAPK (*epidermal growth factor/mitogen-activated protein kinases pathway*), która jest kluczowa dla metastazy. W badaniach *in vivo* redukcja poziomu tego genu ogranicza rozwój nowotworu u myszy z zaszczepionymi ludzkimi komórkami nowotworowymi [8]. Jako marker nowotworowy HE4 w połączeniu z CA125 wykazuje czułość rzędu 76% oraz specyficzność na poziomie 95%. Średnia wartość HE4 w surowicy kobiet z rakiem jajnika oraz rakiem endometrium była znacznie wyższa, w porównaniu z wartością mierzoną u kobiet chorujących na endometriozę. Czუłość połączonych markerów to 95% dla raka jajnika oraz 92,9% dla endometriozy jajnika. Stosowanie obu markerów jednocześnie pozwala na zwiększenie dokładności diagnozowania raka jajnika oraz pozwala na lepsze rozróżnianie raka jajnika od schorzeń takich jak torbiele endometrioidalne jajnika czy endometrioza [9]. Wynik algorytmu podawany jest w procentach – określają one prawdopodobieństwo, że u chorej rozwija się stan nowotworowy (ryc. 1.).

Test OVA1

Test OVA1 został zatwierdzony przez FDA do oceny charakteru masy nowotworowej przed zabiegiem chirurgicznym. Nie jest to typowy test przesiewowy w kierunku raka jajnika. Nie może także zastąpić metod diagnostycznych. Pozwala jednak zwiększyć dokładność rozpoznania guza, a tym samym wielokrotnie skuteczność leczenia. Badanie polega na oznaczaniu w osoczu stężenia pięciu białek związanych z procesem nowotworzenia. Są to: CA125, apolipoproteina A-1 (ApoA-1), transtyretyna (TTR), transferyna (TF), β_2 -mikroglobulina

Ryc. 1. Algorytm ROMA

(B2MG). Stężenie Apo-A1, TF oraz TTR jest zmniejszone, natomiast CA125 zwiększa się u chorych z nowotworami złośliwymi w stosunku do tych ze zmianami łagodnymi. Za pomocą specjalnego algorytmu oblicza się wynik testu podawany w postaci liczbowej (0–10), który wskazuje, czy mamy do czynienia z guzem łagodnym czy złośliwym. Należy zwrócić uwagę, że wyniki wskazujące na wysokie ryzyko różnią się dla kobiet w okresie przedmenopauzalnym ($\geq 5,0$) oraz po menopauzie ($\geq 4,4$) [6, 10].

Niebiałkowe markery

Należy podkreślić, że dużo uwagi poświęca się ostatnio także niebiałkowym markerom. Przykładem może być kwas lizofosfatydowy (*lysophosphatidic acid* – LPA). Jest on fosfolipidem, którego zwiększone stężenie odnotowano w płynie wodobrzusza oraz osoczu pacjentek z rakiem jajnika. Produkowany jest przez komórki nabłonkowe jajnika. Bierze udział w stymulowaniu proliferacji oraz inwazji komórek. W obecności LPA komórki raka jajnika wykazują niższą wrażliwość na apoptozę indukowaną chemioterapeutykami (np. cisplatynę). Prawdopodobnie LPA bierze również udział w powstawaniu przerzutów (zwiększa stężenie czynników angiogennych, takich jak interleukina 8 oraz VEGF). Na podstawie badań stwierdzono, że poziom receptorów LPA2 oraz LPA3 był znacznie wyższy u pacjentek z rakiem jajnika w porównaniu z pacjentkami z łagodnymi zmianami na jajnikach oraz z grupą kontrolną, w skład której wchodziły kobiety zdrowe. W warunkach fizjologicznych komórki nabłonkowe jajników nie wydzielają tego kwasu. Stężenie LPA zwiększało się wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania nowotworu jajnika. Zwiększone stężenie kwasu lizofosfatydowego zaobserwowano u 90% pacjentek z rakiem jajnika w stadium I [11]. Niezwykle obiecujące wydaje się także wykorzystanie metabolomiki, która jest gałęzią biologii systemowej,

zajmującą się badaniem wszystkich metabolitów znajdujących się w komórce. Metabolity uważane są za efekt oddziaływania genomu ze środowiskiem, a nie jedynie prostym odzwierciedleniem metabolizmu komórki. Do badań metabolitów stosuje się głównie spektroskopię $^1\text{H-NMR}$. Badanie prowadzone z udziałem 38 kobiet z rakiem jajnika, 12 z łagodnymi nowotworami jajnika oraz 51 kobiet należących do grupy kontrolnej wykazało, że markery oparte na metabolitach charakteryzują się czułością oraz specyficznością wykrywania nabłonkowego raka jajnika równą 100%, co zachęca do dalszych badań w kierunku zastosowania metabolomiki we wczesnym wykrywaniu nowotworów [1].

Biomarkery oparte na analizie mutacji genów

Większość nowotworów jajnika powstaje w wyniku nagromadzenia zmian w materiale genetycznym, jednakże szczegółowo proces ten nie został jak dotąd poznany. Mutacje genów supresorowych, takich jak *p53*, *pRB* (*retinoblastoma protein*), *BRCA* (*breast cancer type 1/2 susceptibility protein*), oraz onkogenów – K-ras, c-myc, c-erbB2 wydają się odgrywać znaczącą rolę w powstawaniu raka jajnika. Najczęstsze zmiany w materiale genetycznym obserwowane u pacjentek z rakiem jajnika to amplifikacja regionów 8q, 1q, 20q, 19q, oraz delecje fragmentów 13q (usunięcie tego fragmentu wiąże się z inaktywacją genu RB – *retinoblastoma gene* – supresora nowotworowego będącego negatywnym regulatorem wzrostu komórki), 4q, 18q [3, 12]). Zmiany w DNA lub RNA badane są za pomocą łatwo dostępnych dziś technik, takich jak: reakcja łańcuchowa polimerazy (*polymerase chain reaction* – PCR), RT-PCR (*reverse transcription PCR*), sekwencjonowanie DNA oraz technika fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (*fluorescent in situ hybridisation* – FISH). Markerami nowotworowymi mogą być zarówno mutacje w materiale genetycznym, jak i zmiany o charakterze epigenetycznym oraz nieprawidłowości w ekspresji genów [1].

Dziedziczne zmiany genetyczne

Szacuje się, że ok. 10% wszystkich przypadków nabłonkowego raka jajnika spowodowane jest nosicielstwem zmutowanych genów, głównie *BRCA1* oraz *BRCA2*, a także genów kodujących systemy naprawcze DNA – MMR (*mismatch repair*), głównie genów *hMLH1* oraz *hMSH2* [1, 2, 4]. Białka *BRCA1* oraz *BRCA2* odpowiedzialne są za regulację ekspresji genów oraz rozpoznawanie uszkodzeń DNA, w szczególności dwuniciowych pęknięć [17]. Mutacje obserwowane w raku jajnika to głównie zmiana ramki odczytu oraz mutacje nonsensowne. Ryzyko wystąpienia raka jajnika u nosicieli mutacji genu *BRCA1* wynosi 35–46% (do 70. roku życia).

Wśród nosicieli mutacji *BRCA2* ryzyko to jest mniejsze – wynosi 13–23% [2]. Geny *hMLH1* oraz *hMSH2* są odpowiedzialne za naprawę błędnie sparowanych nukleotydów podczas replikacji DNA. Wykrycie mutacji ww. genów może pomóc w zaklasyfikowaniu pacjentek do grupy wysokiego ryzyka [1].

Zmiany epigenetyczne

Metylacja DNA w obszarach promotorowych genów będąca głównym mechanizmem epigenetycznym oraz modyfikacja histonów odgrywają zasadniczą rolę w etapie inicjacji oraz progresji nowotworu. Obecnie trwają intensywne badania polegające na identyfikacji specyficznych genów, które ulegają zmianom pod wpływem czynników epigenetycznych. Wyniki badań potwierdzają, że może być to dobry marker. W badaniu materiału genetycznego pochodzącego od 50 pacjentek we wszystkich próbach wykryto hipermetylację promotorów 6 genów kodujących supresory nowotworowe – *RAS* (*rat sarcoma*), *BRCA* (*breast cancer susceptibility protein*), *APC* (*adenomatous polyposis coli*), *p14ARF*, *p16INK4a* oraz *DAPKinase* (*death associated protein-kinase*). Identyczny wzór hipermetylacji obecny był w DNA 41 spośród 50 próbek (w tym w 13 z 17 przypadków raka w I stadium). Hipermetylacja nie była obserwowana u żadnej z 40 pacjentek stanowiących grupę kontrolną. Niewątpliwą zaletą jest fakt, że badanie jest nieinwazyjne – materiałem pobieranym do testu jest krew [13].

Nieprawidłowości w ekspresji genów

We wczesnym wykryciu raka jajnika może pomóc także analiza zmian w ekspresji poszczególnych genów. Rozróżnianie tkanek zdrowych i tkanek nowotworowych na podstawie różnic w ekspresji genów, identyfikacja histologicznych podtypów nowotworu jajnika oraz przewidywanie odpowiedzi na terapię (w tym próba oceny wrażliwości na chemioterapię I rzutu z zastosowaniem platyny) możliwe są dzięki rozwojowi wysokoprzepustowych technologii pozwalających na analizę ekspresji tysięcy genów podczas jednego eksperymentu. Technika używaną do tego typu badań jest seryjna analiza ekspresji genów (*serial analysis of gene expression* – SAGE). Geny, których poziom ekspresji oceniano u pacjentek z rakiem jajnika, to m.in.: gen kładyny 3 (*claudin 3* – *CLDN 3*), podfrakcja 4 ludzkiego białka z komórek nabłonkowych najądrza (*human epidymal protein 4* – *HE4*), receptor folianów 1 (*folate receptor 1* – *FOLR1*) oraz cyklina D1 (*cyclin D1* – *CCND1*) [14].

Biomarkery microRNA

MicroRNA to niekodujące cząsteczki RNA składające się z ok. 22 nukleotydów. Główną ich rolą jest regulacja

ekspresji genów na poziomie translacji, co nazywane jest wyciszaniem mRNA. Uważa się, że ok. 30% ludzkich genów kodujących białka podlega regulacji zależnej od microRNA. Zmieniona ekspresja microRNA w komórkach nowotworowych (w tym w komórkach raka jajnika) daje możliwość zastosowania microRNA jako markerów nowotworowych, stosowanych w celach zarówno diagnostycznych, jak i pozwalających na klasyfikację nowotworu. W ciągu ostatnich 5 lat wykryto 29 cząsteczek microRNA, których ekspresja różni się w komórkach zdrowych i komórkach nowotworowych. Wśród nich znalazły się cząsteczki ulegające nadekspresji: miR-200a, miR-200b, miR-200c oraz miR-141, oraz cząsteczki o obniżonej ekspresji: miR-199a, miR-140, miR-145 oraz miR-125b1. Prawdopodobnie pomiar ekspresji miRNA w komórkach raka jajnika może również znaleźć zastosowanie w klasyfikowaniu nowotworów do odpowiednich typów histologicznych oraz do klasy nowotworów o wysokim bądź niskim stopniu złośliwości, a także odróżnianiu zmian łagodnych od złośliwych. Niewątpliwą zaletą miRNA jako markera nowotworowego byłaby możliwość oznaczania go bezpośrednio z osocza. Zwiększenie poziomu ekspresji miR-21, miR-92 oraz miR-93 u pacjentek chorujących na raka jajnika, u których stężenie CA125 mieści się w normie, sugeruje, że oznaczanie miRNA mogłoby być stosowane jako uzupełnienie w celu zwiększenia efektów pomiaru stężenia CA125 w surowicy pacjentek [15].

Podsumowanie

Wysokoprzepustowe technologie stosowane dziś na coraz większą skalę w analizie i detekcji genów, analizie proteomicznej profili białkowych oraz metabolomicznej pozwalają na wykrycie potencjalnych markerów nowotworowych, które w przyszłości będą mogły zrewolucjonizować walkę z rakiem jajnika, poprzez jego wczesną detekcję. Pomimo obiecujących rezultatów, potrzeba jeszcze wielu szczegółowych badań, aby móc na szeroką skalę stosować markery bądź kombinacje markerów, które byłyby wystarczająco czułe i specyficzne, aby spełnić podstawowe kryterium wg norm Światowej Organizacji Zdrowia – obniżenie śmiertelności spowodowanej przez nowotwór jajnika w ogólnej populacji.

Piśmiennictwo

1. Zhang B, Cai FF, Zhong XY. An overview of biomarkers for the ovarian cancer diagnosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011; 158: 119-23.
2. Gentry-Maharaj A, Menon U. Screening for ovarian cancer in the general population. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2012; 26: 243-56.
3. Hussein N. Status of tumor markers in epithelial ovarian cancer has there been any progress? A review. *Gynecol Oncol* 2011; 120: 152-7.
4. Rak jajnika – patologia, diagnostyka i przegląd nowoczesnych metod leczenia. Wcisło G, Szczylik C (red.). Termedia, Poznań 2011.
5. Rogulski L, Olejek A. Zastosowanie biomarkerów w diagnostyce i leczeniu raka jajnika. *Przegl Menopauz* 2008; 12: 301-7.
6. Abraham J. OVA1 test for preoperative assessment of ovarian cancer. *Community Oncology* 2010; 7: 249-50.

7. Hogdall EV, Christensen L, Kjaer SK, et al. CA125 expression pattern, prognosis and correlation with serum CA125 in ovarian tumor patients. From The Danish "MALOVA" Ovarian Cancer Study. *Gynecol Oncol* 2007; 104: 508-15.
8. Lu R, Sun X, Xiao R, et al. Human epididymis protein 4 (HE4) plays a key role in ovarian cancer cell adhesion and motility. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 419: 274-80.
9. Huhtinen K, Suvitie P, Hiissa J, et al. Serum HE4 concentration differentiates malignant ovarian tumours from ovarian endometriotic cysts. *Br J Cancer* 2009; 100: 1315-9.
10. Macuks R, Baidekalna I, Donina S. An ovarian cancer malignancy risk index composed of HE4, CA125, ultrasonographic score, and menopausal status: use in differentiation of ovarian cancers and benign lesions. *Tumour Biol* 2012; 33: 1811-7.
11. Sedlakova I, Vavrova J, Tosner J, et al. Lysophosphatidic acid (LPA)-a perspective marker in ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 2011; 32: 311-6.
12. Hu J, Khanna V, Jones MW, et al. Comparative study of primary and recurrent ovarian serous carcinomas: comparative genomic hybridization analysis with a potential application for prognosis. *Gynecol Oncol* 2003; 89: 369-75.
13. Ibanez de Caceres I, Battagli C, Esteller M, et al. Tumor cell-specific BRCA1 and RASSF1A hypermethylation in serum, plasma, and peritoneal fluid from ovarian cancer patients. *Cancer Res* 2004; 64: 6476-81.
14. Peters DG, Kudla DM, Deloia JA, et al. Comparative gene expression analysis of ovarian carcinoma and normal ovarian epithelium by serial analysis of gene expression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1717-23.
15. Iorio MV, Visone R, Di Leva G, et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 8699-707.
16. Moulla A, Miliaras D, Sioga A, et al. The immunohistochemical expression of CD24 and CD171 adhesion molecules in borderline ovarian tumors. *Pol J Pathol* 2013; 64: 180-4.
17. Michalak M, Filip A, Karczmarek-Borowska B. Biological and clinical significance of BRCA2. *Współczesna Onkol* 2011; 15: 309-16.
18. Mielczarek-Palacz A, Kondera-Anasz Z, Sikora J. Higher serum levels of tumour necrosis factor and its soluble receptors are associated with ovarian tumours. *Arch Med Sci* 2012; 8: 848-53.