

Postępy w diagnostyce raka jajnika

Progress in ovarian cancer diagnostics

Ewa Nowak-Markwitz, Marek Spaczyński

Klinika Onkologii Ginekologicznej Katedry Ginekologii i Położnictwa Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu; kierownik Kliniki i Katedry: prof. dr hab. med. Marek Spaczyński

Przeгляд Menopauzalny 2006; 1: 12–16

Streszczenie

Rak jajnika od lat jest przedmiotem szczególnego zainteresowania zarówno klinicystów, jak i naukowców. Jest ono wynikiem ciągle naszej niewielkiej wiedzy w zakresie szeroko rozumianej biologii tego nowotworu. Skuteczna walka z rakiem jajnika powinna być oparta o pierwotną prewencję, wczesną diagnozę i celowane leczenie. Dotychczas nie znamy czynników etiologicznych choroby, nie potrafimy zatem wyselekcjonować grupy kobiet szczególnie narażonych na zachorowanie i nie znamy skutecznych metod wczesnego wykrywania. We wszystkich histologicznych typach raka stosuje się jednakowe schematy leczenia. Nie znamy czynników predykcyjnych, które pozwoliłyby przewidzieć wrażliwość guza na chemioterapię oraz ryzyko nawrotu choroby. Stosowany do wykrywania raka jajnika marker CA 125 jest nieprzydatny ze względu na małą czułość i specyficzność. Prowadzone obecnie badania mają na celu znalezienie nowych biomarkerów, pozwalających na wczesne wykrycie choroby, prowadzenie celowanego leczenia oraz poznanie czynników prognostycznych w zakresie wrażliwości na chemioterapię i remisji choroby. Dzięki badaniom genomicznym i proteomicznym raka jajnika zidentyfikowano liczne markery molekularne, które mogą okazać się przydatne we wczesnym wykrywaniu oraz prognozowaniu przebiegu choroby u chorych na raka jajnika. Jednak metody te wymagają jeszcze opracowania standardów i rekomendacji dotyczących ich zastosowania, zgodnie z zasadami EBM, co pozwoli na szersze wykorzystanie w praktyce klinicznej.

Słowa kluczowe: rak jajnika, skryning, markery, genomika, proteomika

Summary

Ovarian cancer is characterized by lack of early symptoms, presentation at an advanced stage, and poor prognosis. The molecular events leading to the development and progression of ovarian carcinoma are not completely understood. The only available biomarker is CA 125, which has an unacceptably low sensitivity and specificity for diagnostic use in screening and early detection. Many serum markers have been assessed alone and in combination with CA 125 in detecting ovarian cancer at an early stage. Some of the most promising are subjected to investigations leading, we hope, to improve the dismal survival rate. Tumor transcription profiling and serum proteomic profiling are one of the most promising new approaches for cancer diagnosis. Recent developing techniques are capable to assess of global gene expression to distinguish specific tumor type, histologic subtypes and different clinical outcome. The use of rapid, high throughput mass spectrometric-based fingerprints of proteins may prove to be valuable for early detection, molecular classification of tumors and in target therapy arrangement. These specificities and sensitivities are far superior to those obtained by using classical cancer biomarkers. But the new methods need to be thoroughly validated before clinical implementation is warranted.

Key words: ovarian cancer, screening, biomarkers, genomics, proteomics

Adres do korespondencji:

dr hab. med. **Ewa Nowak-Markwitz**, Klinika Onkologii Ginekologicznej Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego, ul. Polna 33, 60-535 Poznań, tel. +48 061 841 93 73, e-mail: ewamarkwitz@poczta.fm

Wstęp

Rak jajnika nie jest często spotykany i rozpoznaje się go u ok. 40 kobiet na 100 tys. [1]. Mimo postępu, dzięki zastosowaniu precyzyjnych technik chirurgicznych i nowoczesnych leków cytostatycznych, wyniki leczenia są nadal złe. Co roku, w Polsce ponad 2 tys. kobiet umiera z powodu raka jajnika. Główną przyczyną tak niezadowolających wyników jest to, że raka jajnika rozpoznaje się za późno. Trudności diagnostyczne spowodowane są przez wiele czynników. Rak jajnika rozwija się przede wszystkim u kobiet po menopauzie, kiedy jajniki nie pełnią już swojej fizjologicznej funkcji i zaburzenia ich pracy są mało uchwytnie. W przeciwieństwie do gruczołu piersiowego, prostaty, czy szyjki macicy anatomiczna lokalizacja narządu głęboko w jamie brzusznej utrudnia kliniczne rozpoznawanie dyskretnych zmian morfologicznych, które stają się symptomatyczne dopiero wtedy, gdy guz osiągnie znaczne rozmiary lub gdy proces chorobowy jest już rozsiały. Skład struktury procentowej poszczególnych stopni klinicznego zaawansowania wg FIGO nie ulega poprawie od wielu lat i 75% chorych zostaje zdiagnozowanych, gdy proces nowotworowy szerzy się poza miednicę [2]. Pięcioletnie przeżycia u tych kobiet wynoszą tylko 25–30%. U niewielkiej grupy chorych, u których udaje się rozpoznać raka nisko zaawansowanego, 5-letnie przeżycia przy korzystnych czynnikach rokowniczych wynoszą prawie 90% [2, 3]. W wykrywaniu raka jajnika korzysta się z oznaczeń stężenia CA 125, z badania ultrasonograficznego oraz badania klinicznego. Ten test potrójny w różnych kombinacjach próbowano stosować również w skryningu.

Populacyjne badania przesiewowe

Dyskusja nad zasadnością i skutecznością badań skryningowych raka jajnika trwa od wielu lat. Stosowane metody charakteryzują się niewystarczającą czułością i specyficznością oraz są zbyt drogie, aby spełnić kryterium efektywnego skryningu populacyjnego wg norm WHO, gdzie jednym z warunków zasadności prowadzenia takich badań jest obniżenie śmiertelności w ogólnej populacji [4, 5]. Skryning populacyjny powinien charakteryzować się 10-% minimalną dodatnią wartością predykcyjną, co oznacza, że na jednego wykrytego raka jajnika może przypadać najwyżej 9 przypadków diagnozy fałszywie pozytywnej [6]. Mając na uwadze taki profil statystyczny, wymagana minimalna specyficzność powinna wynosić 99,6%, a czułość 100% [6]. Powszechnie oznaczany marker, jakim jest antygen CA 125, nie spełnia powyższych warunków. Jest podwyższony zaledwie u ok. 50–60% kobiet z wczesnymi postaciami raka [2]. Jego czułość wynosi 50–80%, a specyficzność 77%, przy dodatniej wartości predykcyjnej równej 2%, co oznacza tylko 2 prawidłowo zdiagnozowane przypadki raka na

100 kobiet z pozytywnym wynikiem testu [7, 8]. Do skryningu potrzebny jest biomarker, który na 100 kobietach z pozytywnym wynikiem testu wykaże 10 chorych prawidłowo zdiagnozowanych [6]. Marker doskonale nadaje się tylko do monitorowania przebiegu choroby u chorych z podwyższonym stężeniem przed leczeniem [2, 5, 6,]. Zastosowanie dodatkowo w skryningu raka jajnika ultrasonografii przezpochwowej zwiększa predykcyjność wyników dodatnich do ok. 6%, ale prowadzone badania nie wykazały zmniejszenia współczynnika śmiertelności kobiet z powodu choroby, co jak już wspomniano, jest warunkiem efektywnego skryningu populacyjnego [9]. Zastosowanie techniki pomiarów natężenia przepływów w naczyniach guza oraz opracowanie szeregu indeksów, opisujących złośliwe guzy jajnika spowodowało, że lepiej potrafimy różnicować zmiany złośliwe i niezłośliwe. Jednak również te badania mają zbyt małą wartość predykcyjność i korzystając z ich wyników znaczną część chorych operuje się niepotrzebnie [5, 10].

Skryning u nosicielek mutacji

Trudności napotykają także próby wyodrębnienia z populacji kobiet o podwyższonym ryzyku zachorowania. Badania cech rodowodowo-klinicznych wskazują, że ok. 30% raków piersi i jajnika powstaje wskutek genetycznej predyspozycji [11]. Dzisiaj wiemy tylko, że kobiety z mutacją konstytucyjną w genie *BRCA1* lub *BRCA2* są bardziej narażone na zachorowanie. Ryzyko to wynosi ok. 40–50%, ale zmutowane geny *BRCA* są odpowiedzialne tylko za rozwój mniej niż 1% wszystkich raków jajnika [12]. W zespole tym obserwuje się niepełną penetrację, co oznacza, że nie wszystkie nosicielki zachorują na nowotwór. Uchwycenie momentu inicjacji procesu kancerogenezy u tych kobiet jest jednak dzisiaj niemożliwe i z powodu szybkiego rozwoju guza rozpoznanie następuje zwykle w III stopniu klinicznego zaawansowania. Nieznana jest wartość badań skryningowych w kierunku raka jajnika u kobiet nosicielek mutacji w genach *BRCA*. Wydaje się jednak, że warunek zmniejszenia śmiertelności także w tej grupie kobiet będzie nadal trudny do spełnienia. Rak jajnika u nosicielek mutacji rozwija się dynamicznie w krótkim czasie i dlatego skryning musiałby być prowadzony w niewielkich odstępach czasu, co znacznie zwiększa koszty, mimo że badania dotyczyłyby niedużej populacji kobiet.

Markery histologiczne

W jajniku wyróżnia się 9 głównych grup nowotworów wywodzących się z nabłonka powierzchniowego i z podścieliska, na które składa się prawie 60 guzów o różnej histologii, z czego 3/4 to guzy graniczne i raki. Prawie w żadnym innym narządzie nie występuje tak wiele morfologicznych postaci guzów. Dzisiejszy stan wiedzy nie

pozwała na wyróżnienie i opisanie czynników molekularnych odpowiedzialnych za kancerogenezę w jajniku, a tym bardziej nie znajduje odpowiedzi pytanie o przyczyny i mechanizm powstawania tak znacznej różnorodności rozpoznawanych guzów. Prawie każdy z tych guzów charakteryzuje się odmienną biologią i, być może, także innym molekularnym procesem neogenezy. Nie zidentyfikowano dotychczas histologicznych stanów przedrakowych w jajniku i na takim etapie rozpoznanie nowotworu nie jest możliwe. W 2004 r. Kurman i Shigh zaproponowali nowy podział raków jajnika, który został oparty na podobieństwach i różnicach w ekspresji markerów molekularnych oraz klinicznym przebiegu choroby w poszczególnych typach histologicznych guzów. Klinicznie powyższe 2 typy charakteryzują się odmienną dynamiką rozwoju oraz różną wrażliwością na stosowaną chemioterapię. Autorzy sugerują, że raki te powstają na skutek błędów w różnych szlakach molekularnych i dlatego ich biologia nie jest taka sama [13]. W grupie oznaczonej jako nowotwory *low grade* znalazły się guzy graniczne, raki śluzowe, surowicze G1 i G2 oraz raki endometrioidalne i jasnokomórkowe. Te guzy rozwijają się z guzów granicznych. Cechuje je wolna dynamika wzrostu, ale także oporność na stosowane leczenie. Raka surowiczego G3 oraz mięsakeraka zakwalifikowano do guzów typu *high grade*. Te nowotwory rozwijają się *de novo* w jajniku. Nie są poprzedzone przez guzy graniczne. Ich wzrost jest dynamiczny, ale dobrze reagują na leczenie chemioterapią. Dalsze badania mają na celu poznanie i zastosowanie innych markerów, które być może pozwolą na dalsze zróżnicowanie poszczególnych typów raka, co może mieć podstawowe znaczenie przy wyborze metody terapii.

CA 125 i inne markery

Najbardziej znanym i najczęściej wykorzystywanym markerem biochemicznym raka jajnika jest glikoproteina CA 125 [3]. Podwyższone stężenie obserwuje się u 50–60% kobiet z nisko zaawansowanym, nieśluzowym rakiem i u 80–85% chorych na raka zaawansowanego [2]. Mając na uwadze, że wzrost stężenia CA 125 obserwuje się także w przypadku wielu niezłośliwych chorób (endometrioza, guzy niezłośliwe jajnika, stany zapalne miednicy, I trymestr ciąży) nie jest to wynik zadowalający [7, 8]. Znane są liczne surowicze markery, takie jak CA15-3, CA72-4, CA 19-9, OVX1, LASA, CASA, AFPR, które samodzielnie lub w licznych kombinacjach próbują się potencjalnie zastosować do wykrywania raka jajnika [9, 14–16]. Niektóre z kombinacji markerów zwiększają czułość i specyficzność oznaczeń, ale nadal w stopniu niewystarczającym do zastosowania w skryningu. Tym niemniej kombinacja oznaczeń Ca 125, OVX1, LASA i CA 72-4 charakteryzuje się specyficznością sięgającą 93%, jednak koszt badań jest relatywnie wysoki [15].

Wszystkie powyższe markery surowicze są różnego rodzaju proteinami, których ekspresja towarzyszy chorobie nowotworowej. Ta obserwacja stała się punktem wyjścia do podjęcia prób zastosowania profilowania genetycznego i białkowego chorego na nowotwór w porównaniu do osoby zdrowej, czego wynikiem jest szybki rozwój nowych metod diagnostycznych, czyli genomiki i proteomiki.

Genomika

W czerwcu 2000 r. Craig Venter i Francis Collins ogłosili, że powstała pierwsza wersja ludzkiego genomu. Znajomość sekwencji nukleotydów w poszczególnych genach (do dzisiaj nie znamy ostatecznej liczby genów w genomie człowieka) i rozwój technik sekwencjonowania DNA oraz możliwości obróbki komputerowej uzyskiwanych sekwencji spowodował powstanie nowej gałęzi biologii molekularnej, zwanej genomiką. Badania genomiczne z użyciem mikromacierzy DNA prowadzone są celem opisanie molekularnego fenotypu, czyli profilu ekspresji genów charakterystycznych dla danego nowotworu. Dokonuje się identyfikacji genów, które ulegają nadmiernej lub zmniejszonej ekspresji w poszczególnych rodzajach i fazach rozwoju procesu nowotworowego. Na tej podstawie można określić genotyp nowotworu, a także wyodrębnić produkty, które mogą podlegać dalszej analizie w celu identyfikacji i ewentualnego zastosowania jako biomarkerów [17, 18]. W ten sposób w tkankach raka jajnika odkryto ekspresję prostazyny, osteopontyny, kalikreiny, mezoteliny i HE4. Badania nad HE4 wykazały, że białko to posiada większą specyficzność w wykrywaniu wczesnych postaci raka w porównaniu do CA 125 [19]. Wzrost surowiczego stężenia prostazyny wykazano u chorych z rakiem jajnika w II stopniu zaawansowania. Kombinacja CA 125 i prostazyny wykazuje 92-% specyficzność i 94-% czułość w wykrywaniu wczesnych postaci choroby [20]. Podobne wartości profilu statystycznego uzyskano stosując osteopontynę do wykrywania wczesnych postaci raka [21]. Geny kodujące rodzinę proteaz serynowych, czyli kalikreiny znajdują się obecnie w fazie intensywnych badań oceniających ich przydatność wykrywaniu różnych nowotworów [22, 23]. Wiele innych substancji zidentyfikowanych na podstawie badań genomicznych jest obecnie analizowanych pod kątem ich przydatności w wykrywaniu i monitorowaniu raka jajnika. Identyfikacja białka jest pierwszym etapem tego procesu. Największą trudność techniczną sprawia produkcja i standaryzacja przeciwciał, które mogą być użyte w testach immunoenzymatycznych. Być może uda się ten problem rozwiązać przez zastosowanie aptamerów, czyli krótkich sekwencji nukleotydowych, które mogą podobnie jak przeciwciała wiązać się specyficznie z antygenami. Ich produkcja i standaryzacja są znacznie łatwiejsze od produkcji klasycznych przeciwciał.

Proteomika

Pojęcie proteomiki, czyli analizy proteomu, zostało wprowadzone w połowie lat 90. XX wieku. Termin proteom pochodzi od angielskiego określenia *PROTEIN complement of the genome* (komponent białkowy kodowany przez genom). Celem proteomiki jest identyfikacja oraz poznanie funkcji białek zakodowanych w genomie. Jest to zadanie niezmiernie trudne do wykonania. Posiadamy jeden genom, czyli zapis informacji genetycznej, ale na jego matrycy może powstać wiele różnych białek. Analiza proteomu różni się od klasycznie stosowanych technik biochemicznych, które służą do identyfikowania pojedynczego białka. W badaniach proteomicznych łączy się metody biochemiczne i fizyczne, i analizuje w ten sposób równocześnie tysiące białek surowicy lub tkanek. Genom człowieka zawiera ok. 30 tys. genów, a informacja w nich zawarta jest matrycą do produkcji białek niezbędnych w procesach życiowych. Pierwszym etapem produkcji białka w komórce jest transkrypcja materiału genetycznego zawartego w DNA na RNA. Na matrycy DNA powstaje jeden niedojrzały RNA. Dojrzewanie jego polega na wycinaniu intronów, czyli sekwencji nukleotydów niekodujących z pozostawieniem tylko sekwencji kodujących, czyli egzonów. Składanie egzonów w dojrzały mRNA może zachodzić w różnej kolejności (alternatywny *splicing*), co powoduje, że z jednej matrycy DNA otrzymujemy kilka, kilkanaście lub kilkadziesiąt matryc do produkcji białka. Wyprodukowany łańcuch aminokwasów podlega dalszym modyfikacjom. Dochodzi do wytworzenia struktury drugiej i trzeciorzędowej. Mogą być przyłączane inne grupy chemiczne (np. reszty węglowodanowe), 2 lub więcej łańcuchy mogą łączyć się ze sobą (np. łańcuchy α i β hormonów przysadkowych) lub zachodzi proces utraty części aminokwasów z łańcucha. Ocenia się, że liczba białek powstających u człowieka przekracza 300 tys. [24]. Nie jest możliwe, aby za pomocą tradycyjnych metod biochemicznych (chromatografia) dokonać separacji wszystkich białek obecnych w ustroju. Wykorzystano do tego celu znaną od dawna metodę fizyczną – spektroskopię mas. Polega ona na separacji cząstek w polu elektrycznym, która dokonuje się w zależności od masy danej substancji. Analizując w ten sposób surowicę otrzymujemy pewien wzór wszystkich białek, który jest profilem charakterystycznym dla danego osobnika. Za pomocą metod bioinformatycznych (z zastosowaniem sztucznych sieci neuronowych) porównuje się profile charakterystyczne dla osoby zdrowej i chorej. Różnice profilu proteomicznego mogą być przyczyną, jak również konsekwencją choroby. Teoretycznie możliwe jest wyodrębnienie w ten sposób wszystkich początkowych stadiów choroby, czyli zastosowanie metody do wczesnego wykrywania wielu patologii. Możliwe jest także określenie profilu białek u osoby chorej, które

spełnią rolę czynników predykcyjnych remisji choroby lub jej wrażliwości na stosowane leczenie. Tak się stało już w przypadku chłoniaków. Jednak w większości nowotworów nie jest to jeszcze możliwe ze względu na trudności techniczne, związane ze wstępną separacją protein i trudnościami z utworzeniem algorytmów informatycznych dla osobników chorych i zdrowych. Rak jajnika był jednym z pierwszych nowotworów, do wykrywania którego zastosowano badania proteomiczne [25, 26]. Eksperymenty zakładały, że kancerogeneza w jajniku jest związana z zmianą profilu ekspresji genów, co powoduje zmianę w profilu białek surowicy. Badania wykazały 100-% czułość i 95-% specyficzność oraz 94-% dodatnią wartość predykcyjną w identyfikacji chorych z rakiem jajnika. Skryning populacyjny raka jajnika wymaga 100-% dodatniej wartości predykcyjnej, ale warto zauważyć, że w opisanym eksperymencie zidentyfikowano poprawnie wszystkie wczesne postacie raka jajnika. Analiza proteomiczna białek od chorych na raka jajnika wskazała na obecność szeregu pików białkowych, czyli zaobserwowano nadekspresję pewnych białek. Proteiny te zostały wyselekcjonowane i już za pomocą chromatografii wyizolowano glioksalazę I, RhoGDI, FK506 oraz haptoglobinę α [27–29]. Ta ostatnia w połączeniu z CA 125 wydaje się być bardzo obiecującym markerem do wykrywania raka jajnika.

Podsumowanie

Badania nad nowymi biomarkerami, które mogą być wykorzystane w skryningu oraz w prognozowaniu przebiegu choroby są obecnie podstawowym celem eksperymentów prowadzonych nad rakiem jajnika [30]. Tak się składa, że wyniki uzyskiwane dzięki metodom biologii molekularnej pozwalają nam identyfikować nowe markery, ale wyprzedzają znacznie naszą wiedzę na temat patogenezy i mechanizmów progresji raka jajnika od momentu jego powstania do rozwoju pełnoobjawowej choroby. Istnieją pewne szanse, że zastosowanie w przyszłości zintegrowanych mikrosystemów analitycznych pozwoli na szybką i pewną analizę profilu białkowego [31]. Kiedy sekwencjonowanie będzie tańsze i szybsze, możliwe stanie się ustalanie profilu genetycznego każdego pacjenta. Na tej podstawie będzie można prognozować prawdopodobieństwo wystąpienia określonych chorób i odpowiednio wcześniej im zapobiegać lub leczyć. Jednak informacje otrzymane dzięki genomice i proteomicie z pewnością przyczynią się do dalszego zrozumienia procesu kancerogenezy i już dziś są nazywane *translational medicine*, czyli medycyną tłumaczoną – z genów i białek [32]. Konieczna jest jednak standaryzacja nowych metod diagnostycznych, zapewniająca powtarzalność badań. Dopiero wtedy można oczekiwać wprowadzenia ich do szerokiej praktyki klinicznej.

Piśmiennictwo

1. Jemal A, Tiwari R, Murray T. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 2004; 54 (1): 8-29.
2. Cannistra S. Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 2004; 351 (24): 2519-29.
3. Bast RC Jr. Status of tumor markers in ovarian cancer screening. *J Clin Oncol* 2003; 21 (10 Suppl): 200-5.
4. Wilson J, Jungner G. The WHO principles and practice of screening for disease. Geneva: World Health Organization; 1968.
5. Menon U, Jacobs I. Ovarian cancer screening in the general population. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2000; 15 (5): 350-53.
6. Jacobs I, Skates S, MacDonald N, et al. Screening for ovarian cancer: a pilot randomized controlled trial. *Lancet* 1999; 353 (9160): 1207-10.
7. Kerbarat P, Lhomme C, Fervers B, et al. Ovarian cancer. *Br J Cancer* 2001; 84:18-23.
8. Sjøvall K, Nilsson B, Einhorn N. The significance of serum CA 125 evaluation in malignant and nonmalignant disease. *Gynecol Oncol* 2002; 85 (1): 175-78.
9. Skates SJ, Menon U, MacDonald N, et al. Detection in postmenopausal women. *J Clin Oncol* 2003; 21: 206-10.
10. Cohen L, Escobar P, Scharm C. et al. Three-dimensional power ultrasound improves the diagnostic accuracy for ovarian cancer prediction. *Gynecol Oncol* 2001; 82 (1):40-48.
11. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer – analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 2000; 343 (2): 78-85.
12. Grzybowska E, Zientek H, Jasińska A, et al. High frequency of recurrent mutations in BRCA1 and BRCA2 genes in Polish families with breast and ovarian cancer. *Hum Mut* 2000; 16 (6): 482-90.
13. Shih I, Kurman R. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 2004; 164 (5): 1511-8.
14. Schutter EM, Davelaar EM, van Kamp GJ, et al. The differential diagnostic potential of a panel of tumor markers (CA 125, CA 15-3, and CA 72-4 antigens) in patients with a pelvic mass. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187 (2): 385-92.
15. Woolas R, Conaway M, Xu F, et al. Combinations of multiple serum markers are superior to individual assays for discriminating malignant from benign pelvic masses. *Gynecol Oncol* 1995; 59 (1): 111-6.
16. van Hafften-Day C, Shen Y, Xu F, et al. OVX1, macrophage-colony stimulating factor, and CA125 as tumor markers for epithelial ovarian carcinoma: a critical appraisal. *Cancer* 2001; 92 (11): 2837-44.
17. Spentzos D, Levine D, Ramoni M, et al. Gene expression signature with independent prognostic significance in epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4648-58.
18. Wong K, Cheng R, Mok S. Identification of differentially expressed genes from ovarian cancer cells by MICROMAX cDNA microarray system. *Biotechniques* 2001; 30: 670-75.
19. Hellstrom I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian cancer. *Cancer Res* 2003; 63 (13): 3695-3700.
20. Mok S, Chao J, Skates S, et al. Prostatein, a potential serum marker for ovarian cancer: identification through microarray technology. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93 (19): 1458-64.
21. Kim J, Skates SJ, Uede T, et al. Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer. *JAMA* 2002; 287 (13): 1671-9.
22. Diamandis E, Yousef G. Human tissue kallikreins: a family of new cancer biomarkers. *Clin Chem* 2002; 48 (8): 1198-1205.
23. Luo L, Katsaros D, Scorilas A, et al. The serum concentration of human kallikrein 10 represents a novel biomarker for ovarian cancer. *Cancer Res* 2003; 63 (4): 807-11.
24. Rosenblatt K, Bryant-Greenwood P, Killian K, et al. Serum proteomics in cancer diagnosis and management. *Ann Rev Med* 2004; 55: 97-112.
25. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002; 359 (9306): 572-7.
26. Kozak K, Amneus M, Pusey S, et al. Identification of biomarkers for ovarian cancer using strong anion-exchange Protein Chips: potential use in diagnosis and prognosis. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100 (21): 12343-48.
27. Yones M, Krutzsch H, Shu H, et al. Proteomic analysis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer. *Proteomics* 2002; 2 (1): 76-84.
28. Ardekani A, Liotta L, Petricoin EF 3 rd. Clinical potential of proteomics in the diagnosis of ovarian cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2002; 2 (4): 312-20.
29. Ye B, Cramer D, Skates S, et al. Haptoglobin-alpha subunit as potential serum biomarker in ovarian cancer: identification and characterization using proteomic profiling and mass spectrometry. *Clin Cancer Res* 2003; 9 (8): 2904-11.
30. Bast Jr R, Badgwell D, Lu z, et al. New tumor markers: CA 125 and beyond. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15: 273-81.
31. Boyce E, Kohn E. Ovarian cancer in the proteomics era: diagnosis, prognosis, and therapeutic targets. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15 Suppl 3: 266-73.
32. Carr K, Rosenblatt K, Petricoin E, et al. Genomic and proteomic approaches to study human cancer: prospects for true patient-tailored therapy. *Hum Genomics* 2003; 1 (2): 32-38.