

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA BAČNIK

**CD44 IN OSTEOPONTIN KOT BIOMARKERJA
PRI RAKU JAJČNIKOV**

**CD44 AND OSTEOPONTIN AS BIOMARKERS
IN OVARIAN CANCER**

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem opravljala na Inštitutu za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc.dr. Katarine Černe, univ.dipl.biol. in somentorstvom prof.dr. Mojce Kržan, dr.med.

Zahvala

Doc.dr. Katarini Černe, univ.dipl.biol. se zahvaljujem za obilo strokovnih napotkov, za pomoč pri izdelavi diplomske naloge in veliko mero potrpežljivosti.

Zahvaljujem se tudi prof.dr. Mojci Kržan, dr.med za napotke in pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Doc.dr. Borutu Kobalu, dr.med., predstojniku Kliničnega oddelka za ginekologijo na UKC Ljubljana, se zahvaljujem, da sem v okviru njegove študije lahko uporabila vzorce tudi za diplomsko nalogo.

Zahvala je namenjena tudi tehnični sodelavki Nevenki Dolžan, ki mi je vlivala pogum in veselje ob izdelavi diplomske naloge.

Posebno zahvalo prejmete vi, družina, Gregor in prijatelji, ki ste me naučili vztrajati in verjeti vase.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc.dr. Katarine Černe, univ.dipl.biol. in somentorstvom prof.dr. Mojce Kržan, dr.med.

Ana Bačnik

Predsednik komisije: prof.dr. Janja Marc, mag.farm., spec.med.biokem.

Članica diplomske komisije: doc.dr. Petra Kocbek, mag.farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK	III
KAZALO PREGLEDNIC	IV
POVZETEK	V
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	IX
1 UVOD.....	1
1.1 RAK JAJČNIKOV	1
1.2 SEROZNI EPITELIJSKI RAK JAJČNIKOV	3
1.3 TEORIJE KANCEROGENEZE JAJČNIKOV	4
1.4 ŠIRJENJE RAKA JAJČNIKOV	5
1.5 BIOMARKERJI	7
1.5.1 Biomarkerji pri raku jajčnikov	8
1.6 MEHANIZMI SPROŠČANJA TOPNIH PROTEINOV	9
1.7 CD44var (v6).....	11
1.7.1 Vloga CD44-v6 pri raku jajčnikov	13
1.7.2 CD44 kot potencialni biomarker pri raku jajčnikov.....	14
1.8 OSTEOPONTIN	15
1.8.1 Vloga osteopontina pri napredovanju tumorja	17
1.8.2 Osteopontin kot potencialni biomarker raka jajčnikov.....	17
1.9 ZDRAVLJENJE RAKA JAJČNIKOV: kirurško in zdravila	19
1.9.1 Celični receptor CD44 in osteopontin kot novi mesti delovanja	20
2 NAMEN DELA	22
3 MATERIALI.....	23
3.1 BIOLOŠKI MATERIAL	23
3.2 KEMIČALIJE	23
3.2.1 Analizni komplet za CD44-v6.....	23
3.2.2 Analizni komplet za osteopontin.....	24
3.3 APARATURE IN DROBNI LABORATORIJSKI MATERIAL.....	24
4 METODE.....	25
4.1 PREISKOVANKE	25
4.2 VZORCI.....	25
4.2.1 Vzorčenje in shranjevanje vzorcev	25
4.3 PRETOČNA CITOMETRIJA.....	26
4.4 The Cell Lab Quanta™ SC MPL, Beckman Coulter®.....	27
4.5 PRINCIPI TESTA NA OSNOVI FLUORESCENTNIH KROGLIC	29
4.6 ANALIZA S PRETOČNIM CITOMETROM NA OSNOVI FLUORESCENTNIH KROGLIC	31
4.6.1 Priprava reagentov in vzorcev	31
4.6.2 Testni protokol z uporabo filtracijske plošče in naprave za vakuumsko filtracijo	33
4.6.3 Meritev na citometru	34
4.7 TOČKOVNI DIGRAM	34
4.8 STATISTIČNE METODE	35

5	REZULTATI.....	36
5.1	ZNAČILNOSTI PREISKOVANK	36
5.2	STANDARDNE KRIVULJE	37
5.3	KONCENTRACIJA sCD44-v6 V SERUMU ter PERITONEALNI TEKOČINI (PT) oz. ASCITESU.....	39
5.4	KORELACIJA MED SERUMOM in PERITONEALNO TEKOČINO (PT) oz. ASCITESOM za sCD44-v6	41
5.5	KONCENTRACIJA OSTEOPONTINA (sOPN) V SERUMU ter PERITONEALNI TEKOČINI (PT) oz. ASCITESU.....	42
5.6	PRIMERJAVA MED KONCENTRACIJAMI sCD44-v6 in sOPN	44
5.6.1	Serum.....	44
5.6.2	PT oz. ascites.....	44
6	RAZPRAVA	46
7	SKLEP	51
8	VIRI IN LITERATURA	53

KAZALO SLIK

Slika 1: Večstopenjski proces širjenja tumorskih celic jajčnikov	5
Slika 2: Shematski prikaz proteina CD44	11
Slika 3: Genomska struktura in različni produkti gena CD44	12
Slika 4: Predlagan model interakcij med HA, CD44 in verzican, rakavimi celicami in mezotelijskimi peritonealnimi celicami, ki omogočajo invazijo raka jajčnikov in peritonealno razširjanje.....	13
Slika 5: Hipotetična struktura osteopontina, zasnovana na zaporedju AK in predvideni sekundarni strukturi proteina	16
Slika 6: Poenostavljena shema delovanja pretočnega citometra	27
Slika 7: Glavni optični elementi pretočnega citometra pri instrumentu The Cell Lab Quanta TM SC MPL, Beckman Coulter®.....	29
Slika 8: Shematski prikaz principa testa na osnovi fluorescentnih kroglic	30
Slika 9: Shematski prikaz priprave standardov (S2-S7).....	31
Slika 10: Primer točkovnega diagrama za nastavitev pretočnega citometra.....	35
Slika 11: Standardna krivulja za sCD44-v6 (levo) in sOPN (desno)	38
Slika 12: Koncentracija sCD44-v6 v serumu kontrolnih preiskovank in bolnic s seroznim rakom jajčnikov ter PT kontrolnih preiskovank in ascitesu bolnic s seroznim rakom jajčnikov.....	40
Slika 13: Koncentracija sCD44-v6 v serumu in PT kontrolnih preiskovank ter v serumu in ascitesu bolnic s seroznim rakom jajčnikov.....	40
Slika 14: Pozitivna korelacija koncentracije sCD44-v6 v serumu in PT pri kontrolni skupini	41
Slika 15: Pozitivna korelacija koncentracije sCD44-v6 v serumu in ascitesu pri skupini bolnic s seroznim rakom jajčnikov.....	41
Slika 16: Koncentracija sOPN v serumu kontrolnih preiskovank in bolnic s seroznim rakom jajčnikov	43
Slika 17: Koncentracija sOPN v serumu in PT kontrolnih preiskovank ter v serumu in ascitesu bolnic s seroznim rakom jajčnikov.....	43
Slika 18: Koncentracija sCD44-v6 in sOPN v serumu	45
Slika 19: Koncentracija sCD44-v6 in sOPN v peritonealni tekočini oz. ascitesu testnih skupin.....	45

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I:	Kirurška klasifikacija FIGO	2
Preglednica II:	Histološka klasifikacija raka jajčnikov.....	2
Preglednica III:	Prednosti in slabosti biomarkerjev	7
Preglednica IV:	Osnovni in specifični analizni komplet za CD44-v6	23
Preglednica V:	Osnovni in specifični analizni komplet za OPN	24
Preglednica VI:	Koncentracije standardov in njihove intenzitete fluorescence za CD44-v6	32
Preglednica VII:	Koncentracije standardov in njihove intenzitete fluorescence za OPN.....	32
Preglednica VIII:	Značilnosti kontrolnih preiskovank.....	36
Preglednica IX:	Koncentracije standardov in odstopanja za sCD44-v6	37
Preglednica X:	Koncentracije standardov in odstopanja za sOPN	38

POVZETEK

Rak jajčnikov je kljub napredku operativnih tehnik in kemoterapije, vodilni z ginekološkimi raki povezan vzrok smrti. Več kot 90 % rakov jajčnikov izhaja iz epitelijskega na površini jajčnikov in serozni histološki podtip je najpogostejše diagnosticiran ovarijski karcinom. Za napredovalo obliko bolezni je značilno širjenje iz primarnega tumorja in adhezijo na peritonej ter druge trebušne organe. Pri širjenju malignih celic po trebušni votlini igra pomembno vlogo ascites.

Pri epitelijskem raku jajčnikov se trenutno v laboratorijski diagnostiki najbolj uporablja tumorski biomarker karboanhidratni antigen ali 125 (CA-125), ki pa ni dovolj občutljiv in specifičen za zgodnje odpravljanje bolezni. V diplomski nalogi smo tako preučevali dva nova alternativna biomarkerja, transmembranski protein tipa I CD44-v6 in glikofosfoprotein osteopontin (OPN), ki sta izražena na celicah seroznega ovarijskega karcinoma in obstajata tudi v topni obliki (sCD44-v6 in sOPN). Določili smo koncentracijo sCD44-v6 in sOPN v telesnih tekočinah (serum, peritonealna tekočina (PT) oz. ascites) pri 20 preiskovankah, razdeljenih v dve skupini: bolnice s seroznim epitelijskim rakom jajčnikov stadija III in IV po klasifikaciji *International Federation of Gynecology and Obstetrics* - FIGO in kontrolne preiskovanke, katere so predstavljale ženske brez obolenja jajčnikov in jajcevodov oziroma so imele na teh mestih benigne tumorje. Proteina smo analizirali s pretočno citometrijo na osnovi fluorescentnih kroglic, ki se je izkazala kot alternativna metoda do sedaj bolj uporabljeni ELISI. Koncentracija sCD44-v6 v serumu pri bolnicah s seroznim ovarijskim karcinomom je bila statistično značilno nižana v primerjavi s serumom kontrolne skupine; razlika v koncentraciji sCD44-v6 med ascitesom pri bolnicah s seroznim rakom jajčnikov in PT pri kontrolni preiskovankah ni bila statistično značilno različna, čeprav je bila pri bolnicah nekoliko višja. Prisotna je pozitivna korelacija ($r = 0,797$) med koncentracijo sCD44-v6 v serumu in ascitesu bolnic s seroznim ovarijskim karcinomom ter med koncentracijo sCD44-v6 v serumu in PT kontrolnih preiskovank ($r = 0,964$). Koncentracija sOPN je v serumu in ascitesu pri bolnicah s seroznim ovarijskim karcinomom povišana v primerjavi s serumom in PT kontrolne skupine. Za sOPN nismo uspeli dokazati korelacije med koncentracijama v serumu in ascitesu bolnic oz. v serumu in PT kontrolnih preiskovank.

Rezultati naše diplomske naloge so osvetlili prednosti in omejitve sCD44-v6 in sOPN kot potencialnih biomarkerjev pri raku jajčnikov. Glavna prednost sCD44-v6 je pozitivna korelacija med lokalno tekočino in serumom. Vrednost ima tudi različna koncentracija sCD44-v6 v serumu bolnic in kontrolnih preiskovank. Glavna njegova pomankljivost je ta, da med bolnicami in kontrolnimi preiskovankami ni bilo signifikantne razlike v koncentraciji sCD44-v6 v lokalni tekočini. Prednost sOPN je, da je njegova koncentracija povišana tako v serumu kot v lokalni tekočini. Povišana koncentracija sOPN v lokalni tekočini v primerjavi s sistemskim obtokom, nam je utrdila prepričanje, da je lokalno okolje bližje izvoru raka, bolj specifično za detekcijo izločenih topnih molekul, ki igrajo vlogo pri raku jajčnikov, saj se tu kopičijo v znatno večjem obsegu kot v krvnem obtoku, ki se napaja iz vseh delov telesa. Pomankljivost sOPN pa je, da ni bilo korelacije med

serumom in lokalno tekočino. Zaključimo lahko, da sta oba biomarkerja primerna kandidata za nadaljne raziskave na večjem številu bolnic.

Ključne besede: serozni rak jajčnikov, biomarker sCD44-v6 in sOPN, ascites, serum, pretočna citometrija

ABSTRACT

Despite advances in surgery and combination chemotherapy, ovarian cancer is first in terms of death rates of gynaecological malignancies. More than 90% of ovarian cancers arise from surface epithelium and the serous histological subtype is the most commonly diagnosed epithelial ovarian carcinoma. Extensive seeding of the peritoneal cavity, shedding from ovarian epithelium and adhesion on peritoneum by tumour cells is often associated with ascites, particularly in advanced, high-grade serous carcinomas.

Currently carbohydrate antigen 125 (CA-125) is the most widely used biomarker in the diagnosis of women with epithelial ovarian cancer. However, CA-125 is not specific and sensitive enough for an early detection of disease. Therefore, in this study we examined two new alternative biomarkers. Transmembrane protein type I, CD44-v6, and glykophosphoprotein osteopontin (OPN), which are expressed on cells of serous ovarian carcinoma and are also in soluble form (sCD44-v6 and sOPN). We determined concentrations of sCD44-v6 and sOPN in body fluids (serum, peritoneal fluid (PT) or ascites) of 20 patients, divided into two groups: patients with advanced serous ovarian cancer (International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) stage III and IV, and control group, which presented women without adnexal pathology and with benign adnexal pathology. We used bead-based flow cytometry, which has proved as an alternative method to ELISA.

Serum concentration of sCD44-v6 by patients with serous ovarian carcinom was significantly lower compared to serum of controls; difference in concentration of sCD44-v6 in ascites in patients group with serous ovarian cancer and PT in control group was not significant, although it was slightly higher in patients group. The positive correlation between concentration of sCD44-v6 in serum and ascites of patients with serous ovarian cancer was detected, as well as positive correlation between serum and PT of the control group. The sOPN concentration in serum and ascites of patients with serous ovarian cancer is higher than in serum and PT of controls. We did not succeed to determine the correlation for sOPN in serum and ascites of patients or in serum and PT of controls.

Results of our study highlight advantages and limitations of sCD44-v6 and sOPN as potential ovarian biomarkers. The main advantage of sCD44-v6 is positive correlation between local fluid and serum. Of value is also different serum concentration of sCD44-v6 in patients and contorols. sCD44-v6's main disadvantage is non-significant difference in concentration in local fluid between both groups. The advantage of sOPN is, that it's concentration was increased in both, serum and local fluid. Increased concentration of sOPN in local fluid compared to systemic circulation proved, that local environment, closer to the origin of cancer, is better for detection of cancer secreted molecules. Here, they accumulate in higher numbers than in bloodstream, coming from all parts of the body. The disadvantage of sOPN is that there was no correlation between serum and local fluid. We can conclude that both biomarkers are worthy of exploration on greater number of patients.

Keywords: serous ovarian cancer, biomarker sCD44-v6 and sOPN, ascites, serum, flow cytometry

SEZNAM OKRAJŠAV

AB – (angl. assay buffer) pufer za poskus
ADAM – (angl. a disintegrin and metalloprotease) dizintegrin in metaloproteaze
AK- aminokisline
BioC – (angl. biotin-conjugate) z biotinom konjugirana sekundarna protitelesa
BM – (angl. bead mixture) mešanica kroglic
CA-125 – (angl. carbohydrate antigen 125) karboanhidratni antigen 125
CD44-v6 – variantna izoforma 6 proteina CD44
CT – računalniška tomografija
DNA – (angl. deoxyribonucleic acid) deoksiribonukleinska kislina
ELISA – (angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) encimskoimunski test
EV – elektronski volumen
FIGO – (angl. International Federation of Gynecology and Obstetrics) Mednarodna zveza za ginekologijo in porodništvo
FL – (angl. fluorescent light) fluorescentna svetloba
HA – hialuron
HE4 – (angl. human epididymis protein 4) človeški obmodni protein 4
KARCINOM – epiteljski tumor
NMR – (angl. nuclear magnetic resonance) jedrska magnetna resonanca
STADIJ III in IV – stadij III in IV po FIGO klasifikaciji
OPN – osteopontin
PE – (angl. phycoerythrin) fikoeritrin
PCR - (angl. polymerase chain reaction) verižna reakcija s polimerazo
PI3-K – fosfatidilinozitol-3-kinaza
PMT – (angl. photomultiplier tubes) fotopomnoževalka
PT – peritonealna tekočina
RDB – (angl. reagent dilution buffer) pufer za razredčitve
RGD zaporedje – (angl. Arginine-Glycine-Aspartic acid) zaporedje arginin-glicin-asparaginska kislina
RNA – (angl. ribonucleic acid) ribonukleinska kislina
S – standard oz. standardne mešanice
SB – (angl. setup beads) nastavitvene kroglice
SC MPL – (angl. SC multi-platform loading)
sCD44-v6 – (angl. soluble form of CD44-v6) topna oblika CD44-v6
SEM – (angl. standard error of measurement) standardna napaka aritmetične sredine
sOPN – (angl. soluble form of osteopontin) topna oblika osteopontina
SPE – (angl. streptavidin-phycoerythrin) streptavidin-fikoeritrin
SSC – (angl. side scatter detector) detektor stranskega sipanja svetlobe
UZ – ultrazvok
VFM – (angl. vacuum filtration manifold) naprava za vakuumsko filtracijo

1. UVOD

1.1 RAK JAJČNIKOV

Čeprav rak jajčnikov po podatkih Registra raka za Slovenijo ni najpogostejši med ginekološkimi raki, saj je za rakom maternične sluznice in materničnega vratu na tretjem mestu, pa je že mnoga leta tisti, zaradi katerega umre največ bolnic tako pri nas kot v svetu. Na lestvici najpogostejših vzrokov smrti povezanih z rakom pri ženskah zaseda v svetu kar peto mesto, v Sloveniji pa sedmo mesto. Kljub napredkom v kirurgiji in kombinirani kemoterapiji s svojo visoko stopnjo agresivnosti terja v svetu skoraj 125.000 smrti letno [1,2].

Tako velika stopnja smrtnosti se odraža v dejstvu, da je le manj kot 20 % vseh rakov jajčnikov diagnosticiranih v zgodnji fazi bolezni. Zgodnjo odkrivanje otežujejo neznačilni simptomi bolezni in premajhna specifičnost diagnostičnih metod oziroma biomarkerjev. Trenutno ni na voljo zanesljivega ne-invazivnega diagnostičnega testa; pri večini bolnic se bolezen odkrije v napredovali obliki raka jajčnikov, kjer so pogosto prisotne metastaze peritoneja in ascites. Čeprav se bolnice z rakom jajčnikov sprva dobro odzivajo na kemoterapijo, se pri njih pogosto pojavi rezistenca na zdravlila. Ponovitev bolezni je skoraj vedno povezana z razvojem farmakorezistence in razširitve bolezni v peritonej, ki je ni mogoče operativno odstraniti [3].

Diagnosticiranje raka jajčnikov: Pomembna je anamneza, natančen splošni pregled, vaginalni in rektalni pregled, ultrazvočni pregled (UZ) abdomna, vaginalni UZ, priporočljiva je tudi računalniška tomografija (CT) abdomna. Nujne so hematološke in biokemične preiskave krvi in določitev vrednosti tumorskega označevalca CA-125. Stadij bolezni se pri raku jajčnikov vedno določa kirurško s pregledom abdomna.

Operater obvezno pregleda in opiše:

- Ascites (da/ne), odvzame vzorec oziroma naredi izpirek trebušne votline za citološko preiskavo,
- Pregleda peritonej in serozo in opiše morebitne zasevke: njihovo število, velikost in lokalizacijo; če jih ni, so potrebne biopsije peritoneja iz sumljivih mest, slepe biopsije in bris diafragme,
- Pregled in palpacija zgornjega abdomna in opis organov,
- Opis tumorja v mali medenici,
- Pregled retroperitoneja v medenici in paraaortno [4].

Najpomembnejši napovedni dejavnik poteka bolezni je razširjenost raka, ki ga opišemo s kliničnim stadijem. Rak jajčnikov lahko klasificiramo z uporabo kirurške klasifikacije Mednarodne zveze za ginekologijo in porodništvo (*International Federation of Gynecology and Obstetrics* – FIGO, 1988) (Preglednica I) ter glede na histološki tip nastanka (Preglednica II). **V diplomski nalogi bomo uporabili izraz stadij, ki se bo vedno nanašal na stadij klasifikacije FIGO.**

KLASIFIKACIJA (povzeto po *Ginekološki malignom; Onkološki inštitut v Ljubljani, Univerzitetna ginekološka klinika v Ljubljani*)[4].

Preglednica I: Kirurška klasifikacija FIGO - International Federation of Gynecology and Obstetrics (1988).

Stadij I	Maligni tumor enega ali obeh jajčnikov
Ia	Maligni tumor enega jajčnika brez ascitesa in brez površinske rašče z intaktno kapsulo
Ib	Maligni tumor obeh jajčnikov, brez ascitesa in z intaktno kapsulo
Ic	Maligni tumor stadija Ia ali Ib z rastjo na površini jajčnikov in/ali z rupturo kapsule in/ali z malignimi celicami v ascitesu ali izpirku trebušne votline
Stadij II	Maligni tumor jajčnikov z vraščanjem v organe male medenice
IIa	Razraščanje ali metasteziranje v maternico ali jajcevode
IIb	Razraščanje ali metasteziranje v druge organe v mali medenici
IIc	Maligni tumor stadija IIa ali IIb z raščo po površini jajčnikov in/ali s prekinjeno kapsulo in/ali z malignimi celicami v ascitesu ali izpirku trebušne votline
Stadij III	Maligni tumor jajčnikov z razraščanjem zunaj male medenice; pozitivne medenične in/ali obaortne bezgavke, metastaze na površini jeter, črevesja in/ali v veliki pečici
IIIa	Mikroskopske metastaze po peritoneju zgornje trebušne votline
IIIb	Metastaze po peritoneju zgornje trebušne votline manjše od 2 cm
IIIc	Metastaze po peritoneju večje od 2 cm in/ali pozitivne retroperitonealne in ingvinalne bezgavke
Stadij IV	Maligni tumor jajčnikov z oddaljenimi metastazami; citološko potrjen plevralni izliv in/ali parenhimske jetrne metastaze in/ali metastaze v drugih organih

Preglednica II: Histološka klasifikacija raka jajčnikov

A: Epitelijski ovarijski tumorji	B: Neepitelijski ovarijski tumorji
➤ Serozni	I: <i>Germinalni ovarijski tumorji</i>
➤ Mucinozni	II: <i>Stromalni tumorji</i>
➤ Endometrioidni	III: <i>Metastatični ovarijski tumorji</i>
➤ Svetlocelični	
➤ Brennerjev tumor	
➤ Mešani epitelijski	
➤ Nediferencirani (anaplastični)	
➤ Neklasificirani	

5-letno preživetje bolnic z rakom jajčnikov s stadijem III, za katere je značilno razširjanje tumorja in metastaze peritoneja izven medenice, je 35 %. Ta doba preživetja pa strmo pade na 10 % pri bolnicah z oddaljenimi metastazami (stadij IV). Ravno nasprotno pa je pri bolnicah v stadiju I, kjer je maligni tumor omejen na jajčnika, 5-letna doba preživetja višja od 95 % [5].

Znaki bolezni: Bolnice v zgodnjih stadijih nimajo nobenih težav. Težave se pojavijo v kasnejših stadijih: bolnice opisujejo bolečine v trebuhu, tipen tumor, bolečine v hrbtu, zaprtje, uhajanje urina, utrujenost, izgubo teže. V trebuhu se lahko nabira tekočina (ascites). Pogosto je prvi znak raka jajčnikov tumor, odkrit ob naključnem ultrazvočnem pregledu [6].

Mnogo bolnic z napredovalo obliko raka izkazuje hitro rast intraperitonealnega tumorja, skupaj z abdominalno napihnjenostjo kot rezultat nabiranja ascitesa v peritonealni votlini. Ascites se pojavi, ko maligne celice izločajo proteine, rastne dejavnike in citokine, ki vodijo v (neo)angiogenezo, povečano filtracijo telesne tekočine in/ali limfatično obstrukcijo, kar se kaže v nastanku serumu podobne tekočine v abdomnu – ascites [7].

Dejavniki tveganja: V večini primerov je vzrok za nastanek raka jajčnikov neznan. Večjemu tveganju so izpostavljene starejše ženske in tiste, pri katerih je za isto boleznijo zbolela sorodnica v prvem ali drugem kolenu. Tveganje je povečano tudi pri ženskah, ki niso nikoli rodile, pri tistih z zgodnjo menarho in pozno menopavzo, neplodnih, ženskah z endometrioza in pri tistih, ki jemljejo hormonsko nadomestno zdravljenje. Uporaba kombiniranih oralnih kontraceptivov je zaščitni dejavnik, prav tako kot zgodnja prva nosečnost in pozna zadnja nosečnost. Tveganje je manjše pri ženskah s kirurško zaprtimi jajcevodmi oz. po histerektomiji (odstranitvi maternice) brez odstranitve jajcevodov. Dedne oblike raka jajčnikov so povezane z mutacijami genov *BRCA 1* in *BRCA 2*. Takih bolnic je manj od 5 %. Pozitivna družinska anamneza raka maternice, raka debelega črevesa ali drugih gastrointestinalnih rakov lahko kaže na prisotnost Lynchevega sindroma (dedni nepolipozni črevesni rak), kar pomeni večje tveganje za rak jajčnikov. Raziskovali so tudi vpliv številnih zunanjih dejavnikov tveganja, vendar se nobeden ni izkazal za statistično pomembnega [6].

1.2 SEROZNI EPITELIJSKI RAK JAJČNIKOV

Epitelijske ovarijske neoplazme predstavljajo široko histološko heterogenost in jih delimo v tri podtipе: benigni, mejno maligni (angl. borderline) in maligni. Poglavitni štirje histološki tipi epitelijskega ovarijskega karcinoma so: serozni, endometrioidni, svetlocelični in mukozni, ki se klinično razlikujejo in imajo vsak svoje molekulske značilnosti. Več kot 90 % ovarijskih karcinomov izhaja ravno iz epitelijskega na površini jajčnikov, med katerimi je serozni histološki podtip najširše zastopan in največkrat vzrok smrti v povezavi z rakom jajčnikov [3]. Zato smo se s tem podtipom raka srečali tudi v tem diplomskem delu.

Serozni karcinom je lahko nizke stopnje malignosti (nizko maligni) ali visoke stopnje malignosti (visoko maligni)

Trenutno je v veljavi model po Shinu in Kurmanu, ki sta razdelila histološke podtipе ovarijskega karcinoma v dve skupini [8]. Poizkušala sta uskladiti histološke podtipе z genetskimi spremembami ter zasnovala dve glavni molekularni poti, ki vodita do ovarijskega karcinoma. Prva skupina je sestavljena iz nizko malignega serozno-papilarnega, endometrioidnega in mejno-malignega tumorja. V grobem rečeno je to skupina s seroznim karcinomom nizke stopnje malignosti. V drugo skupino pa sta uvrstila serozni karcinom z visoko stopnjo malignosti.

Genetske spremembe pri dobro diferenciranih seroznih neoplazmah nizke stopnje malignosti se akumulirajo skozi čas in preoblikujejo benigni epitelij v nizko maligni tumor. Tovrstni tumor se skoraj vedno pojavi v obstoječi serozni neoplazmi, ponavadi je to serozni mejno maligni tumor z mikropapilarno zgradbo [8].

Pri seroznem karcinomu visoke stopnje malignosti imamo tri potencialna mesta nastanka: epitelij na površini jajčnikov; epitelij jajcevoda ter mezotelij, ki prekriva površino peritonealne votline. Klinične izkušnje in nedavne raziskave nakazujejo, da serozni karcinom visoke stopnje malignosti hitro raste in se razširja v peritonealni votlini, prekrito z mezotelijskimi celicami. Najpogostejša genetska sprememba pri visoko malignem seroznem karcinomu vključuje mutacijo gena *p53*, *BRCA 1* in *BRCA 2* ter povečano izražanje genov fosfatidilinozitol 3-kinaze (PI-3-kinaza). Nizko maligni serozni karcinom je značilen za mlajše bolnice in tiste z relativno rezistenco na standardno kemoterapijo (karboplatin + paklitaksel). Visoko maligni serozni karcinom pa ima prevalenco pri postmenopavzalnih ženskah in je na začetku zdravljenja zelo občutljiv na kemoterapijo, vendar imajo te bolnice nizko stopnjo preživetja [8].

1.3 TEORIJE KANCEROGENZE JAJČNIKOV (neoplazija) [3]

Znanih je kar nekaj možnih mehanizmov nastanka raka jajčnikov; pomembnejši so:

- Hipoteza o nenehni ovulaciji predpostavlja, da je razvoj ovarijskega karcinoma posledica ponavljajočih se mikropoškodb na površini epitelija med ovulacijo.
- Gonadotropinska hipoteza zagovarja izpostavitve epitelija na površini jajčnikov previsoki koncentraciji gonadotropinov.
- Hormonska hipoteza o progesteronu; v eksperimentalnih študijah progesteron uravnava izražanje gena *p53*, inhibira proliferacijo epitelijskih celic jajčnikov in sproži apoptozo normalnih ter malignih epitelijskih celic jajčnikov.
- Hipoteza o "Müllerjevem vodu" sloni na ideji, da se karcinom lahko razvije iz ene same predhodne celice, ki pride iz Müllerjevega voda (Müllerjevi vodi se razvijejo tekom embrionalnega razvoja iz celomskega epitelija. Iz Müllerjevih vodov se oblikujejo jajcevodi, maternica, maternični vrat in zgornji del nožnice).
- Hipoteza o zarodnih celicah temelji na podobnostih med normalnimi in tumorskimi zarodnimi celicami (matične celice imajo neomejeno sposobnost samoohranitvene delitve).

1.4 ŠIRJENJE RAKA JAJČNIKOV

Rak jajčnikov se širi z lokalnim razraščanjem, širjenjem v trebušni votlini, z limfo, s krvjo in/ali s prehodom skozi diafragmo [9]. Nenavadno je, da se v primerjavi z ostalimi raki rak jajčnikov zelo redko širi po krvni poti [8]. Za napredovalo obliko bolezni je značilno širjenje malignih celic z luščenjem s površine jajčnikov in adhezijo na peritonej ter organe trebušne votline. Obenem so pogosti zasevki v bezgavkah male medenice z močno korelacijo med zasevki intraperitonealno in v bezgavkah [10].

Širjenje tumorskih celic v trebušni votlini pa je najpogostejše opisan proces pri ovarijskem karcinomu in poteka kot večstopenjski proces (slika 1):

Korak 1: Rezistenca na anoikis in izguba kontaktne inhibicije gibanja:

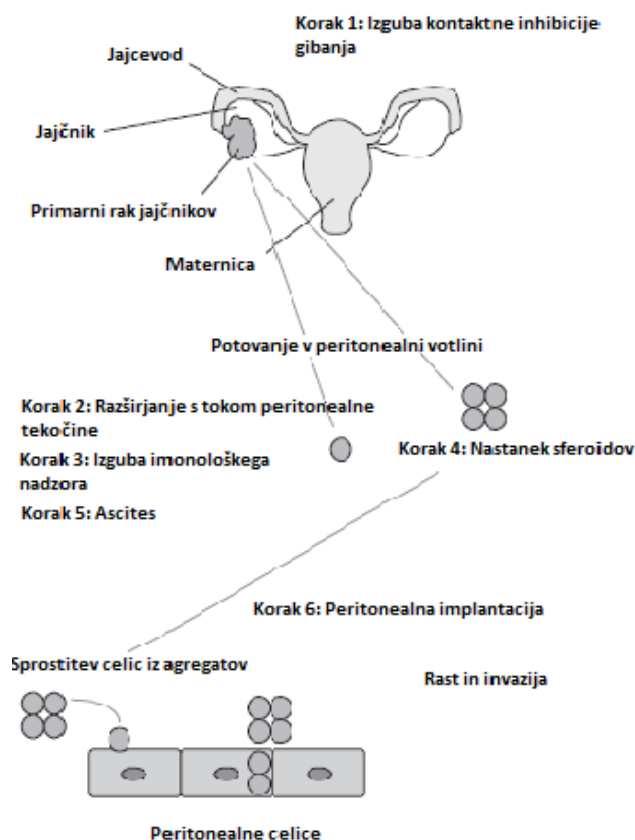
Korak 2: Razširjanje rakavih celic s fiziološkim tokom peritonealne tekočine

Korak 3: Izguba imunološkega nadzora

Korak 4: Nastanek sferoidov

Korak 5: Ascites – metastatsko okolje

Korak 6: Peritonealna implantacija (zasevanje) [11].



Slika 1: Večstopenjski proces širjenja tumorskih celic jajčnikov

Anoikis se nanaša na proces, pri katerem gre celica v apoptozo zaradi izgube stika z medceličnino. Velja, da je razvoj rezistence na anoikis ključni dogodek v procesu metastaziranja. Sprožilni mehanizem, da celice pridejo v gibanje pa je epitelno-mezenhimska transformacija (EMT), ki je proces spremembe fenotipa celice iz epiteljskega v mezenhimski, pri katerem celice postanejo podobne fibroblastom [11]. Sprva rakave celice jajčnikov tvorijo zasevke na sosednjih organih, posebno na jajcevodih, maternici in na adneksih na nasprotni strani kot je oboleli jajčnik. Po lokalnem širjenju, se tumorske celice ločijo od primarnega tumorja in potujejo s peritonealno tekočino v trebušni votlini [8, 11]. Prosta tekočina v peritonealnem prostoru nastaja kot filtrat plazme skozi kapilarne membrane peritonelane seroze in ima lastnosti lubrikanta – zmanjšuje trenje pri drsenju organov. Tok peritonealne tekočine sprva določa gravitacija in gre tako najprej v spodnje predele, nato pa se s pomočjo podtlaka, ki nastane pri dihanju, obrne navzgor v smeri glave in gre po žlebu ob kolonu do diafragme [11]. Fiziološko gibanje peritonealne tekočine tako določa pot širjenja tumorskih celic [3].

Obsežna naselitev peritonealne votline z rakavimi celicami jajčnikov je pogosto povezana z nastankom ascitesa – zlasti pri napredovalem, visoko malignem seroznem karcinomu [8]. Ascites je definiran kot patološko povečan volumen tekočine (nad 50 ml), ki nastane iz različnih vzrokov [12] in se nabira v peritonealni votlini. Poleg hipoalbumije zaradi kaheksije, lahko ascites nastane vsaj iz treh drugih vzrokov, in sicer zaradi zmanjšane limfne drenaže iz peritonealne votline kot posledica obstrukcije limfnih žil zaradi tumorskih celic, hiperpermeabilnosti mikrožilja v peritonealni votlini in tumorske (neo)angiogeneze [11].

Ascites je sestavljen iz celic in tekoče medceličnine. V celični frakciji ascitesa najdemo predvsem rakave celice jajčnikov, limfocite ter mezotelijske celice. Rakave celice v ascitesu se pojavljajo samostojno ali pa v skupku kot agregati, imenovani sferoidi. Na drugi strani, pa je tekočina bogata z molekulami, katere se izločajo iz rakavih celic. Le-te skupaj z ostalimi topnimi molekulami v ascitesu (npr. citokini, rastni faktorji, adhezijske molekule, razni encimi za razgradnjo zunajceličnega matriksa) ustvarjajo mikrookolje, ki spodbuja nadaljnje širjenje bolezni [11]. Ascites je tako idealni medij za določanje specifičnih biomarkerjev pri ovarijskem karcinomu [7].

Po pritrditvi na mezotelijske celice peritoneja, se rakave celice sprostijo iz agregatov in začno vdirati v mezotelij. Čeprav mehanizem peritonealne implantacije še ni pojasnjen, se zdi, da vključuje različne adhezijske molekule, prekinitev celičnih stikov med mezotelijskimi celicami in pritrditev rakavih celic na medceličnino pod mezotelijem, kjer nato uspešno proliferirajo [13].

Rakave celice v procesu migracije dodobra preoblikujejo svoj citoskelet in si prilagodijo zunajcelični matriks. Poleg tega, rakave celice nenehno spreminjajo način pritrditve na površino. Spremembe v adheziji ne omogočajo le potovanja rakavih celic, temveč tudi spremenijo komunikacije med rakavimi in ostalimi celicami ter spreminjajo signalizacijo od in do zunajceličnega matriksa [3].

Čeprav je širjenje raka jajčnikov s krvjo redko, pa transcelomska pot (po telesni votlini) omogoča neposreden dostop v sistemski obtok. Ascites iz abdominalne votline vstopa preko diafragme v limfo, ta pa vstopi v torakalni vod, ki se nadalje zlija v levo subklavijsko veno [11].

1.5 BIOMARKERJI

Glavni izziv pri proučevanju raka jajčnikov še vedno ostaja določanje novih tumorskih označevalcev za zgodnje odkrivanje bolezni in spremljanje zdravljenja.

Termin biomarker je definirala Hulk s sodelavci, kot: » celične, biokemijske ali molekulske spremembe, ki so merljive v bioloških medijih: tkivih, celicah, ali tekočinah [14].« Kasneje so definicijo razširili na biološko značilnost, ki je lahko objektivno izmerjena in ovrednotena kot kazalec fiziološkega ali patološkega procesa ali odgovor na zdravlila.

V praksi nam biomarkerji služijo kot orodja za številne namene: z njimi lahko identificiramo bolezensko stanje, detektiramo zgodnjo stopnjo bolezni, podamo napoved izida terapije, spremljamo ponovitev izbruha bolezni, obenem pa so ustrezni kazalci uspešnosti terapije. Biomarkerji pripomorejo k razumevanju napovedi bolezni, vzroku in tveganju za nastanek bolezni, diagnozi, napredovanju in regresiji bolezni [14].

Lastnosti idealnega biomarkerja so:

- specifičnost,
- občutljivost,
- pridobljen z ne-invazivno metodo,
- nedestruktiven,
- predvidljiv,
- lahko merljiv [15].

Preglednica III: Prednosti in slabosti biomarkerjev (Povzeto po [14].)

PREDNOSTI	SLABOSTI
Objektivna ocena	Odvisnost rezultata od časa vzorčenja
Natančnost merjenja	Dragi stroški analize
Metodo lahko validiramo, Zanesljivost	Obstojnost vzorcev za analizo z biomarkejem
Manj pristranski od vprašalnikov	Laboratorijske napake
Omogočajo raziskavo mehanizmov nastanka	Težko ugotoviti mejno območje ki razlikuje zdrave in bolne

Čeprav imajo biomarkerji številne prednosti, je variabilnost glavna skrb. Interindividualna variabilnost se kaže v skupku vseh dejavnikov iz okolja, ki vplivajo na posameznike. Intraindividualna variabilnost je običajno povezana s pridruženimi patološkimi stanji pri posamezniku. Prisotna je tudi variabilnost med skupinami, a ponavadi je to želeni rezultat študije. Očitno je, da je najbolje, če so razlike med skupinami velike [14].

Zmožnost razlikovanja med preiskovanimi skupinami se meri z občutljivostjo in specifičnostjo, dvema zelo pomembnima karakteristikama biomarkerjev. Noben od do sedaj obetajočih markerjev ali kombinacij markerjev (ki velja za bolj učinkovito in bolj specifično), ni izpolnil pričakovanja, da je sposoben napovedati rak jajčnikov z dovolj visoko stopnjo občutljivosti in specifičnosti.

Glede na nizko prevalenco ovarijskega karcinoma (0,04 % pri post-menopavzalnih ženskah), mora uspešna presejalna metoda za zgodnje odkrivanje bolezni dosegati minimalno specifičnost 99,6 % in več kot 75 % občutljivost. Ti vrednosti sta potrebni, da se izognemo nesprejemljivi stopnji lažno-pozitivnih rezultatov, in da dosežemo pozitivno napovedno vrednost v višini 10 % [16, 17]. Zato ostaja potreba po odkrivanju in validiranju novih biomarkerjev za ovarijski karcinom, ki bodo ustrezni za zgodnje odkrivanje, napovedovanje bolezni in izida zdravljenja.

1.5.1 Biomarkerji pri raku jajčnikov:

Narava raka jajčnikov je v zgodnji fazi brez simptomov, zato se si je ta bolezen prislužila naziv »tihi ubijalec«. Dejstvo, da je približno 70 % vseh bolnic z epitelijskim rakom jajčnikov odkritih pri naprednih oblikah III. in IV. stadija bolezni, poudarja klinično potrebo po zanesljivih in točnih biomarkerjih [5]. Preživetje bolnic je toliko večje, če bolezen odkrijemo prej.

Ženske z visoko stopnjo tveganja ovarijskega karcinoma lahko opravijo presejalni test s trans-vaginalnim ultrazvokom ali s serumskim tumorskim označevalcem **CA-125** (angl. carbohydrate antigen 125) [3]. Določanje povišanih serumskih vrednosti CA-125 je preoperativno uporabno za napoved malignega potenciala. Uporablja se tudi za oceno odziva tumorja jajčnikov na kemoterapijo in za spremljanje ponovitve bolezni, saj raven CA-125 korelira z napredovanjem ali začasnim izboljšanjem bolezni [5].

Čeprav ima šibko napovedno vrednost za zgodnjo obliko bolezni, CA-125 še vedno ostaja vodilni marker pri odkrivanju raka jajčnikov. Celotno pri zelo tvegani populaciji žensk so zaznani primeri, ko se je povišana vrednost CA-125 pojavila šele pri razviti obliki bolezni [3]. Vendar pa, pri približno 15 % pacientk, CA-125 ne izkazuje realnega stanja bolezni oziroma njenega napredovanja, saj se povišane vrednosti pojavijo tudi pri benignem raku jajčnikov kot tudi pri stanjih, ki niso povezana z ginekološko patologijo [5].

Nedavno so poleg CA-125 uvedli tudi biomarker **HE4** – (angl. human epididymis protein 4) – protein, ki ga v normalni površini epitelijskega jajčnika ne najdemo. Pri analizi različnih biomarkerjev, se je HE4 izkazal za marker z najvišjo stopnjo občutljivosti pri odkrivanju stadija I raka jajčnikov [5]. HE4 v kombinaciji s CA-125 napoveduje malignom s 76 % občutljivostjo in 95 % specifičnostjo [18].

Ker za zgodnje odkrivanje bolezni raka jajčnikov še nimamo na razpolago učinkovitega markerja, potekajo na tem področju številne raziskave. Trenutno znani biomarkerji izhajajo iz štirih različnih skupin, to so: genski biomarkerji raka jajčnikov, proteinski biomarkerji raka jajčnikov, novejši biomarkerji raka jajčnikov in kombinacija biomarkerjev raka jajčnikov. Ob upoštevanju tesne povezave med genetskimi spremembami in tumorigenezo

je jasno, da raziskovanje na ravni genov obljublja potencialne biomarkerje (vključno s študijami dednih genskih mutacij, epigenetskih sprememb in gensko ekspresijo). Med njimi sta najbolj izpostavljeni mutaciji v genu *BRCA1* in *BRCA2* [19].

Osredotočili se bomo le na izločene, odcepljene biomarkerje, ki so prisotni v človeških tekočinah. To so proteinski biomarkerji raka jajčnikov, ki jih najdemo s pomočjo zmogljive tehnologije, proteomike. Ta nam omogoča obsežno karakterizacijo proteinov z uporabo masne spektrometrije, vključno z njihovimi zapletenimi lastnostmi kot so izoforme, modifikacije, interakcije in funkcionalne strukture. Eden glavnih ciljev proteomike je določanje bolezenskih biomarkerjev v tkivih in telesnih tekočinah. Kljub prepričljivim odkritjem novih biomarkerjev s proteomiko, ima ta metoda še vedno določene pomankljivosti; ena glavnih je ponovljivost priprave vzorcev. Zagotovo pa bo v prihodnosti dobila svoje mesto v naboru uveljavljenih metod na tem področju [19].

V zadnjem času se posveča posebno pozornost novejšim biomarkerjem raka jajčnikov, ki odpirajo dve novi področji pridobivanja biomarkerjev: mikro-RNA biomarkerji, ki jih identificirajo s pomočjo mikromrež in PCR v realnem času ter biomarkerji, ki so udeleženi v presnovi in jih identificirajo z NMR spektroskopijo in masno spektrometrijo. Glede na kompleksnost in heterogenost raka jajčnikov, je malo verjetno da bi bil en sam biomarker zmožen zaznati vse podtipe in stadije bolezni z visoko stopnjo občutljivosti in specifičnosti. Zato se uporablja več biomarkerjev v kombinaciji, da dosežemo boljše rezultate [19].

Idealen biomarker bi se uporabljal v širokem presejalnem procesu in bi omogočil diagnozo še ne-simptomatskih žensk. Če želimo z njim doseči široko uporabnost v diagnostiki, mora biti za njegovo določanje na razpolago poceni ne-invazivna metoda. Snovi, ki jih izločajo tumorska tkiva, normalna tkiva pa ne, ali tumorsko specifični imunomarkerji, ki jih zlahka določimo v telesnih tekočinah, so le nekaj primerov idealnih biomarkerjev [19].

1.6 MEHANIZMI SPROŠČANJA TOPNIH PROTEINOV

Proteini obstajajo tudi v topni obliki, ki jo lahko kvantitativno določimo v bolnikovih telesnih tekočinah in supernatantu tumorskih celičnih linij. Telesne tekočine so se izkazale kot odličen medij za raziskovanje novih biomarkerjev. S kliničnega vidika sta zanimiva predvsem kri in urin, ker omogočata ne-invazivno oziroma minimalno invazivno preiskavo.

Trije poglobitni mehanizmi, ki povzročajo nastanek in/ali sprostitvev topnih molekul s celične membrane in iz citoplazme, so: (i) odcep ektodomene, (ii) alternativno spajanje (ang. splicing) prepisov mRNA in (iii) odcepljanje mešičkov. Oba mehanizma, odcep ektodomene in alternativno spajanje, v osnovi vodita do okrnjene topne oblike, ravno nasprotno od odcepljanja mešičkov, ki sprostijo molekulo iz celice v svoji polni velikosti [3].

(i) **odcep ektodomene**: številni integralni plazemski proteini se pojavijo v topni obliki. Te topne oblike pogosto izvirajo iz membranske oblike, v tem primeru način sproščanja

oziroma izločanja vključuje njihovo selektivno post-translacijsko hidrolizo iz površine celice. Ta način izločanja, ki ga pogosto imenujemo tudi luščenje (angl. »shedding«) ali solubilizacija, vključuje bodisi proteaze bodisi fosfolipaze, odvisno od tipa proteina na membrani [20].

(ii) **alternativno spajanje prepisov mRNA**: lahko povzroči izločanje različnih variant molekul ali krajšanje vezanih molekul v membrani.

(iii) **odcepljanje mešičkov**: membranski mešički so z membrano prekriti celični fragmenti, odluščeni od praktično vseh tipov celic, konstitutivno in kot odgovor na aktiviran signal. Proces luščenja mešičkov je zelo aktiven v proliferajočih celicah, kot so rakave celice. Nomenklatura še vedno ni enotna, trenutno vsi spadajo v skupino membranskih mešičkov. Termin eksosom vključuje mešičke velikostnega razreda od 30 do 100 nm, večji pa so poznani pod imenom mikrovezikli. Odcepljeni mešički iz tumorskih celic pogosto spadajo v kategorijo eksosomov [21]. Eksosomi vsebujejo paket molekul, proteine vezane na membrane, lahko tudi RNA, DNA, lipide. Z eksocitozo se ti eksosomi odcepijo in potujejo naprej po krvi, kar predstavlja hiter prenos informacij na dolge razdalje. Sproščajo se lahko kjerkoli; to je fiziološki proces katerekoli hitro proliferajoče se celice. Predlagano je, da sproščeni eksosomi iz tumorskih celic, zaradi svoje bogate proteolitske in adhezivne aktivnosti, lahko spodbujajo celično invazijo in gibanje med metastazo. Eksosomi tako predstavljajo nosilec za izvoz različnih molekul, med drugim tudi CD44 ([22]).

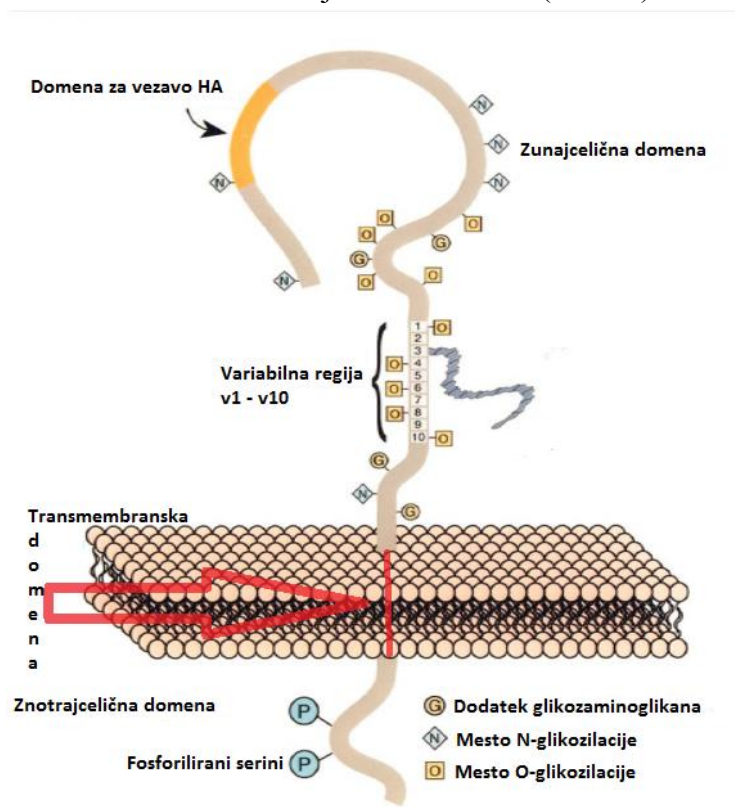
CD44-v6 je variantna izoforma 6 glikoproteina CD44, ki je izražen v številnih tumorjih, posebno pri tumorjih ginekološkega izvora. Osteopontin (OPN) je sekretorni, integrin-vezajoči glikofosfoprotein, ki ga v povečani meri izločajo tumorske celice in bi zato lahko služil kot serumski biomarker. Tako CD44-v6 kot OPN spadata med adhezijske molekule. Ker obstajata tudi v topni obliki, ju lahko določamo v telesnih tekočinah preiskovank (npr. serum, ascites, peritonealna tekočina). sCD44-v6 nastane z mehanizmom sproščanja preko odcepa ektodomene z encimi ADAM [3], alternativnega spajanja in z odcepljanjem mešičkov [22], medtem ko se sOPN sprošča preko alternativnega spajanja [23] in s cepitvijo s trombinom [24].

Pomembne značilnosti izločenih ali odcepljenih proteinov, zaradi katerih nam lahko služijo kot biomarkerji, vključujejo visoko stopnjo izločanja, specifično s strani tumorskih celic in nizko plazemsko koncentracijo v normalnih pogojih [3].

1.7 CD44var (v6)

Oznaka CD44 opisuje skupino transmembranskih proteinov tipa I, katerim je skupno N-terminalno in C-terminalno zaporedje. Molekule se razlikujejo v centralni zunajcelični domeni glede na zaporedje, ki ga kodira deset variant eksonov. Ti so lahko vključeni v različnih kombinacijah ali pa imajo različne dodatke glikozaminoglikanov in sestavine ogljikovih hidratov, glede na tip celic [25]. CD44 je transmembranski protein, široko zastopan tako v epitelijskih kot neepitelijskih tkivih [26].

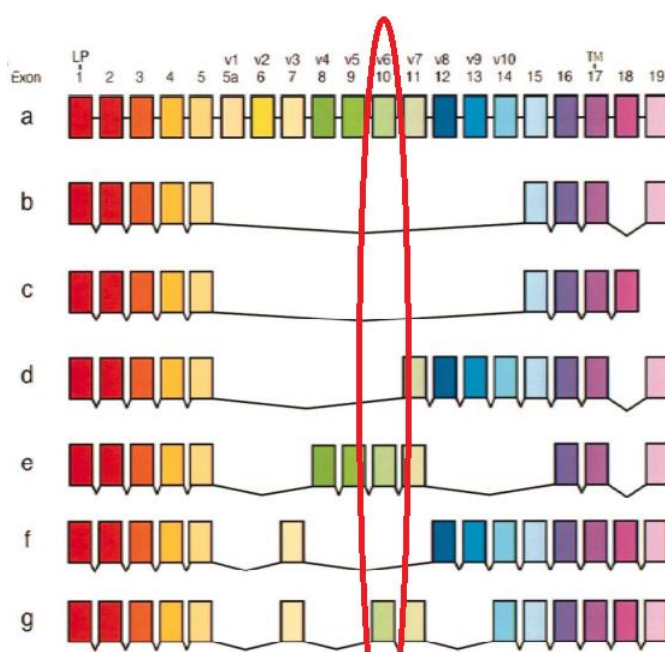
CD44 je polimorfni glikoprotein, ki sodeluje v širokem spektru medceličnih interakcij in interakcij celicami in zunajceličnim matriksom. To vključuje zadrževanje (ang. homing) limfocitov, B in T celični imunski odgovor, zasevanje in vnetje [27]. Zmožnost povezave proteina CD44 z zunajceličnim citoskeletom in vezavo na komponente medceličnine (fibronektin, kolagen I in IV, hialuron, osteopontin), ga vodi do opisa kot medcelični receptor tipa III (ECM-III; angl. extracellular matrix receptor III). Znan je tudi pod drugimi imeni, kot glavni receptor za vezavo hialurona (HA), kot Hermes antigen ter kot HUTCH-I [25]. Gen za CD44 se nahaja na človeškem kromosomu 11, in vsebuje najmanj 20 eksonov. Eksoni 1-16, vključno z eksonom 5a, kodirajo zunajcelično domeno proteina; ekson 17 kodira kratko transmembransko domeno, eksona 18 in 19 pa kodirata domeno citoplazme [25]. Poenostavljeno rečeno, struktura proteina CD44 vsebuje tri različna področja oziroma tri domene, ki jih sestavljajo različna zaporedja aminokislin: znotrajcelična, transmembranska in zunajcelična domena (Slika 2).



Slika 2: Shematski prikaz proteina CD44. Struktura proteina CD44 vsebuje 3 različna področja oz. 3 domene, ki jih sestavljajo različna zaporedja aminokislin: zunajcelična, transmembranska in znotrajcelična domena. (Povzeto po [25].)

Velika heterogenost proteinov je posledica alternativnega spajanja mRNA od eksona 5a do eksona 14. Teh deset eksonov je poznanih tudi pod imenom variante proteina CD44 oziroma variante eksonov v1 – v10, ki so lahko spojeni v 700 različnih zaporedij zunajcelične domene. Poleg alternativnega spajanja eksonov, heterogenost proteinov CD44 še povečuje celično specifično dodajanje glikozaminoglikanov in ogljikovih hidratov [25]. Vse isoforme CD44 so različno glikozilirane. Najmanjša poznana oblika CD44, se imenuje standardna isoforma (CD44s), ki je brez vseh deset variant eksonov. CD44s je dominantna oblika in jo lahko najdemo v večini tkiv razvitega organizma [25]. CD44-v6 je tako večja oblika proteina CD44, ki ima izbrano zaporedje 10. eksona na proksimalni strani posamezne membrane v zunajcelični domeni (slika 3).

V nasprotju s standardno obliko CD44s, imajo različne variante CD44 bolj omejeno distribucijo npr. na keratinocitih (eksoni v3-v10), epiteljskih celicah (eksoni v8-v10), aktiviranih limfocitih in makrofagih (ekson v6) [27].



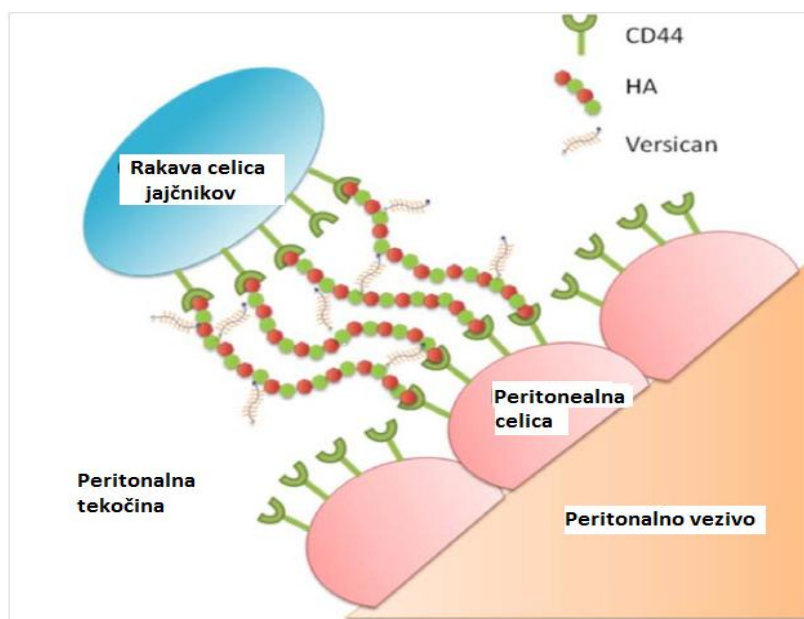
Slika 3: Genomska struktura in različni transkripcijski produkti gena CD44.

Genomska struktura je predstavljena na vrhu (a) z vodilnim peptidom (LP) in transmembransko domeno (TM). Variante eksonov so zapisane nad eksoni 5a-14. Spodaj (b-h) je nekaj primerov transkriptov gena CD44, CD44-v6 je označena z rdečo obrobo in predstavljena na primeru (e) in (g). (Povzeto po [25].)

Variante proteina CD44 (predvsem v4-v7) izkazujejo metastatsko obnašanje pri podganjem modelu raka; detektirali pa so tudi različne variante proteina na različnih tumorskih človeških celičnih linijah in pri primarnem kot tudi pri metastatskem tumorju pri ljudeh. Različno obnašanje (povečana/ zmanjšana koncentracija) proteina CD44 in njegovih variant je bilo raziskano pri tumorju možganov, raku debelega črevesa in danke, raku želodca, raku pljuč, raku na dojkah, limfomu, kožnemu raku, HIVu in boleznih, ki jih spremlja vnetje. Odkrivanje nenormalne uravnanosti spajanja CD44 bi torej lahko pomagala pri diagnozi raka in vrednotenju bolezni [27].

1.7.1 Vloga CD44-var6 pri raku jajčnikov

S širjenjem bolezni rakave celice jajčnikov metastazirajo v peritonealno votlino. Mezotelijske celice peritoneja izločajo številne proteine medceličnine, adhezijske molekule in ostale dejavnike, ki omogočijo razširitev bolezni. Mezotelijske peritonealne celice ustvarjajo mikro okolje, v katerem najdemo molekulo medceličnine HA in CD44 kot njegov receptor. Modelne študije so pokazale, da je povečano izločanje HA tesno povezano s stopnjo invazivnosti in metastatskim potencialom pri raku jajčnikov. Pri seroznem ovarijskem karcinomu visoka koncentracije HA v vezivnem tkivu ob tumorju tudi korelira s prisotnostjo CD44 in verzicana – vezavno mesto za HA [28]. Miranda P. Ween s sod. je v *in vitro* študiji opisala možen mehanizem interakcij med makromolekulami medceličnine (HA, CD44 in verzicanom), rakavimi celicami jajčnikov in mezotelijskimi peritonealnimi celicami [28]. Verzican v vezivnem tkivu ob tumorju veže HA v medceličnini. Nastanek stabilne povezave med HA in verzicanom, v pericelularnem matriksu varuje celice raka jajčnikov pred mehanskimi silami ter omogoča njihovo močno adhezijo na CD44 na mezotelijskih peritonealnih celicah. Ta mehanizem predstavlja osnovo za nadaljnje širjenje raka jajčnikov v abdominalni votlini [28] (Slika 4).



Slika 4: Predlagan model interakcij med HA, CD44 in verzican, rakavimi celicami in mezotelijskimi peritonealnimi celicami, ki omogočajo invazijo raka jajčnikov in peritonealno razširjanje. Na sliki je jasno razvidno, da se CD44 nahaja tako na rakavih celicah jajčnikov, kot tudi na mezotelijskih peritonealnih celicah. (Povzeto po [28].)

Predvidevajo, da ima interakcija med CD44 in HA dvojno naravo, po eni strani NH₂-terminalna skupina proteina CD44 na membrani rakavih celic, lahko veže HA v medceličnini, kar regulira gibanje in funkcije celic, po drugi strani pa se lahko obenem

CD44 veže tudi na HA plašč mezotelijskih celic peritoneja. Ta dva dogodka ključno prispevata k invazivnosti in metastazam peritoneja. Po drugi strani, pa razpadni produkti hialuronske kisline lahko spodbujajo rast lokalnega žilja kot osnovo za invazivnost in metastaziranje [26, 29].

1.7.2 CD44 kot potencialni biomarker pri raku jajčnikov

Družina proteinov CD44 je vpletena v celično adhezijo, gibljivost celic in metastaziranje raka jajčnikov, zato bi lahko bila zanimiva kot potencialni biomarker.

Zanimanje za različne variante CD44 se je pojavilo že pri začetnem odkritju tega proteina, ko so ugotovili, da variante CD44 lahko predajajo metastatski potencial nemetastatskim celicam. Veliko študij je nakazalo na dejstvo, da različne variante CD44, posebno varianta 6 (CD44-v6), verjetno spodbuja rakave celice da se pritrdijo na žilni endotelij in jim tako okrepi sposobnost prehajanja skozi žilno steno, kar je najverjetneje glavni razlog za invazijo in metastaziranje pri različnih vrstah raka, čeprav ne smemo pozabiti, da je širitev bolezni po krvni poti pri raku jajčnikov redka [29]. Zeimet s sod. je primerjal serumske vrednosti sCD44-v6 pri bolnicah z rakom jajčnikov in pri zdravih kontrolnih preiskovankah. Med obema skupinama ni dokazal statistično signifikantne razlike. Dokazal pa je statistično signifikantno nižjo koncentracijo sCD44-v6 v ascitesu v primerjavi s serumom bolnic z rakom jajčnikov [30]. Podobno študijo je izvedel tudi Stickeler s sod. in določil povišano serumsko koncentracijo celokupnega CD44 (izraženega kot sCD44std) in znižano koncentracijo sCD44-v6 v primerjavi z zdravimi prostovoljci [31].

Wei-Guo Dong s sod. je določil diagnostični prag oziroma mejno vrednost za sCD44-v6, ki mora biti dosežena oziroma presežena da govorimo o malignem ascitesu raka jajčnikov, pri povprečni koncentraciji 63,59 ng/mL (območje $44,42 \pm 19,17$ ng/mL). To vrednost so določili s 73,9 % občutljivostjo in 88,7 % specifičnostjo sCD44-v6 za diagnozo malignega ascitesa [29]. V omenjeni študiji so poročali o povečani koncentraciji sCD44-v6 pri malignem ascitesu v primerjavi z ne-malignim (benigni). To pomeni, da povišana koncentracija sCD44-v6 korelira z invazivnostjo in metastaziranjem tumorskih celic v peritonealno votlino [29], kar je temu biomarkerju prispevalo dodano vrednost nadaljnjega preučevanja.

Gaducci s sod. je analiziral serumske ravni pri 51 bolnicah z epitelijskim rakom jajčnikov in ugotovil signifikantno znižanje sCD44-v5 in sCD44-v6 pri napredovalem stadiju bolezni (stadij III-IV) v primerjavi z zgodnjim stadijem I [32]. Sillanpää s sod. je v svoji študiji s pomočjo imunohistokemijske metode dokazal povečano izražanje CD44 pri dobro diferenciranem mucinoznem ovarijskem karcinomu [26]. Ugotovil je tudi, da se tumorji s povišano vrednostjo CD44 bolje odzivajo na adjuvantno kemoterapijo. Nižje izražanje CD44 je povezano z napredovalo obliko tumorja, velikim rezidualnim primarnim tumorjem, ponovitvijo bolezni in umrljivostjo.

Glede na rezultate študij težko rečemo kakšno prognozično vlogo ima CD44. Znižane vrednosti CD44 in njegovih variant pri melanomu, raku prostate in raku debelega črevesa in danke, so povezane s slabim izidom, medtem ko, na drugi strani povečane vrednosti pri ledvičnem raku, raku pljuč, raku dojke stadija II in III, raku materničnega vratu stadija FIGO Ib, CD44 napovedujejo nizko preživetje. Neskladje rezultatov napovedne vrednosti CD44 najdemo tudi pri epiteljskem raku jajčnikov. Nekatere študije povezujejo povišane vrednosti CD44 z relativno dobro prognozo, druge izključujejo kakršno koli povezavo CD44 z ovarijskim karcinomom, tretje pa kažejo pri zvišanih vrednostih kažejo na nizko prognozo preživetja [26].

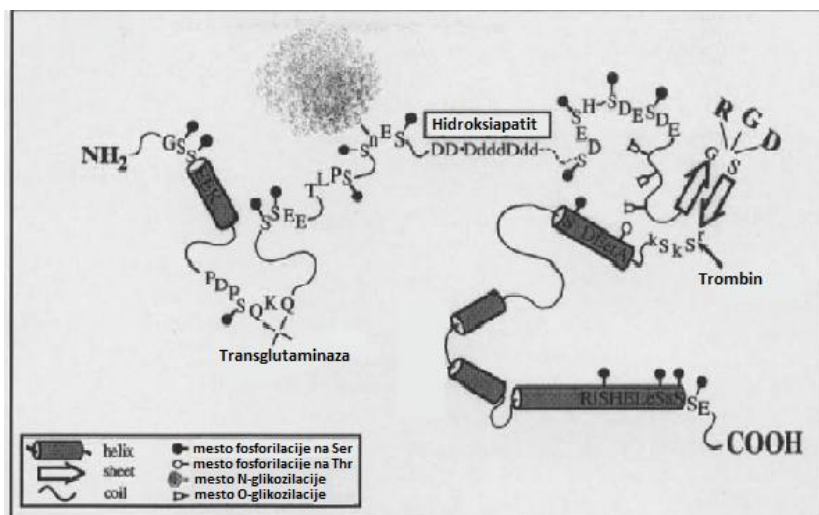
1.8 OSTEOPONTIN

Osteopontin (OPN), znan tudi kot kostni sialoprotein I (*angl.* BSP-1, *bone sialoprotein-1*), zgodnji aktivator limfocitov T (*angl.* ETA-1, *early T-lymphocyte activation*) in sekretorni fosfoprotein I (*angl.* SPP-1; *secreted phosphoprotein*) [33]. Oldberg s sod. je sialoprotein leta 1986 poimenoval kot osteopontin, ki označuje da je produkt celic v osteoidnem matriksu (lat. *osteo* – kost) in da lahko ustvari most med celicami in minerali v matriksu (lat. *pons* – most) [34]. Ime osteopontin si je torej zaslužil zaradi prve identifikacije v osteoblastih kot protein nekolagenskega kostnega matriksa, čeprav ima pomembno vlogo tako v imunskem sistemu, kjer regulira nastanek citokinov in celični promet, kot tudi v žilnem sistemu, kjer inhibira ektopično mineralizacijo in akumulacijo makrofagov. Protein je različno fosforiliran in se kopiči v telesnih tekočinah, njegova močna afiniteta do hidroksiapatita pa vodi do akumulacije v kosteh in ostalih mestih mineralizacije [35]. Človeški gen za OPN vsebuje 7 eksonov, nahaja pa se na kromosomu 4 [24]. Je zunajcelični strukturni protein in zato tudi organska komponenta kosti, skupno vsebuje 300 aminokislin (AK) in je bogat s kislinskimi ostanki (predvsem -COOH skupine asparaginske in glutaminske AK), kar mu daje visok negativni naboj. Poleg omenjenih AK, vsebuje tudi veliko serina in zaporedje (*angl.* motif) poliasparaginske kisline preko katerega se protein veže na hidroksiapatit in kalcijeve ione. Glavne regije proteina so: Arg-Gly-Asp (RGD) zaporedje, ki uravnava pritrditev celic; trombin cepitveno mesto, mesta fosforilacije serina in treonina ter mesta N- in O- glikozilacije (Slika 5). Raznolikost v posttranslacijskih modifikacijah (fosforilizaciji- katalizirani s kinazami, glikozilaciji in sulfataciji) in cepitev OPN s trombinom, ustvarja različne funkcionalne oblike OPN [24]. Protein v razviti obliki meri 33 kDa; po posttranslacijski modifikaciji pa mu molekulska masa naraste na 44 kDa. OPN se nahaja v različnih tkivih, kot so kosti, zobje, ledvica, endometrijska tkiva, prav tako pa ga najdemo tudi v makrofagih, različnih tumorjih, celicah T in celicah gladkih mišic. Vključen je v kostno resorpcijo (nastajanje, migracija in pritrdjevanje osteoklastov ter njihovo resorptivno aktivnost), imunski odgovor, angiogenezo, celično preživetje, obnovo ran in biologijo raka [24, 33]. Njegova biološka vloga je remodulacija kosti, ki poteka na naslednji način: izražanje OPN, ki je povezano z zgodnjim razvojem osteoklastov, je uravnavano s CD44 pri razlikovanju osteoklast / makrofagi in lahko uravnava nastajanje, aktivnost in preživetje osteoklastov.

Osteogeni predhodniki izražajo znotrajcelični OPN, povezan s celično gibljivostjo in izločajo nizko fosforiliran OPN, ki se obnaša kot citokin pri oblikovanju kosti. Osteogene celice izražajo OPN, ki se poveže z ne-kolagensko cementno plastjo. Osteoblasti pa proizvajajo visoko fosforiliran OPN, ki uravnava rast kristala hidroksiapatita in se v veliki količini nahaja na strani mineralizacije ter se vključi v interfibrilarni matriks. OPN se nalaga v mejni lamini - sloju med mineralizirano površino kosti in osteociti [24]. Imunološko vlogo pa ima na ravni kemotakse, celične aktivacije in apoptoze. OPN varuje celice pred apoptozo ter spodbuja njihovo proliferacijo. Zaradi sposobnosti vezave OPN na mnoge receptorje na površini celice, igra pomembno vlogo v mnogih fizioloških in patoloških procesih, vključno s celjenjem ran, tumorigenezo, vnetjem in pri imunskem odzivu [33].

OPN s celicami komunicira preko integrinov in receptorjev CD44 na celični površini, med tem ko je njegova znotrajcelična vloga še nepojasnjena, verjetna pa naj bi bila vezava OPN na CD44 na notranji strani celične membrane [35]. Zhang s sod. je vezavno mesto za CD44 določil na C-terminalnem delu OPN in ugotovili, da je CD44 in njegove izoforme (v3-v6) eno izmed poglavitnih receptorskih mest za OPN [36]. Receptor CD44 je izražen v osteoblastih, osteoklastih, osteocitih, fibroblastih, celicah gladkih mišic ter epitelijskih in endotelijskih celicah [24].

OPN v topni obliki se obnaša kot nedotaknjen protein ali kot njegovi različni fragmenti, odcepljeni s pomočjo trombina. Arg-Gly-Asp (RGD) zaporedje OPN komunicira preko integrinov, medtem ko se C-terminalni del veže na variante CD44, kar kasneje aktivira signalno pot PI3-K-Akt [37].



Slika 5: Hipotetična struktura osteopontina, zasnovana na zaporedju AK in predvideni sekundarni strukturi proteina, je predstavljena skupaj s potencialnimi mesti posttranslacijske modifikacije. Prikazano je AK zaporedje na končnem delu RGD (motiv za pritrditev celice), zaporedje poliasparaginske kisline, mesta fosforilacije in glikozilacije, trombin cepitveno mesto in mesto navzkrižne povezave s transglutaminazo. Zaradi nezadostnih hidrofobnih AK in visokega števila nabitih AK, je pričakovana razvita in temu prilagojena struktura proteina (Povzeto po [24].)

1.8.1 Vloga osteopontina pri napredovanju tumorja:

Čeprav je iz mnogih študij jasno razvidno, da je na rakavih celicah izražanje OPN povečano in da je serumska koncentracija povišana pri bolnicah z rakom jajčnikov, pa mehanizmi, kako OPN dejansko deluje pri razvoju tumorja, še vedno niso dodobra pojasnjeni [38, 39, 40, 41].

Dokazano je, da OPN zavira apoptozo in prispeva k preživetju celic s svojo fosforilacijo, interakcijo s CD44, aktivacijo jedrskega dejavnika kapa B (NF- κ B), spremenjenim izražanjem proapoptotski proteinov *Bim*, *Bak* and *Bax* in aktivacijo signalne poti PI3-K/Akt. Ravno aktivacija signalne poti PI3-K/Akt pa je tudi ena izmed poti, ki omogoči celicam raka jajčnikov preživetje pod stresnimi pogoji [38]. Zmožnost OPN, da poveča preživetje celic z zaviranjem apoptoze, lahko pojasni povečano metastaziranje rakavih celic s povečanim izražanjem OPN [24].

1.8.2 Osteopontin kot potencialni biomarker pri raku jajčnikov:

OPN ni specifičen za raka jajčnikov, saj ga najdemo v številnih tkivih pri fizioloških in patoloških razmerah. Zato moramo biti previdni, če ga želimo uporabiti kot biomarker za prognozo raka jajčnikov. Povišane vrednosti OPN se pojavljajo tudi pri sepsi, ledvični odpovedi in pri kardiovaskularnih boleznih. Tudi pri ljudeh, ki imajo diagnosticiran karcinom, so lahko krvne koncentracije OPN povišane na račun vzrokov, ki niso povezani z rakom [35].

Drži pa dejstvo, da so njegove vrednosti povišane v mnogih tumorjih vključno z rakom jajčnikov. Zavedati se moramo, da ima različen celični in tkivni izvor OPN, lahko različne prognostične vrednosti. Poleg prisotnosti OPN vezanega na celično membrano v tumorjih in zdravih tkivih, je OPN prisoten v topni obliki (sOPN) v telesnih tekočinah. Povišano koncentracijo sOPN so našli v plazmi in serumu bolnikov z rakom dojk, debelega črevesa, ledvic, prostate in jajčnikov [42]. Kim s sod. je v svoji študiji dokazala, da je sOPN v plazmi lahko potencialni diagnostični biomarker pri raku jajčnikov, saj so bile predoperativne plazemske vrednosti sOPN višje pri tumorskih bolnicah kot pri zdravih, benignih in preiskovankah z ostalimi ginekološkimi raki [42]. Rezultati imunohistokemične metode v študiji nakazujejo na dejstvo, da imajo različni histološki podtipi raka jajčnikov, različno stopnjo izražanja sOPN. Tako ima na primer, serozni podtip, povišano raven sOPN v pssamoznih telescih, laminarnih kalcinacijah, ki jih pogosto najdemo pri seroznemu raku [42]. S pomočjo metode ELISA, so pred operacijo izmerili koncentracijo sOPN v plazmi pri bolnicah z epitelijskim ovarijskim karcinomom in pri zdravih ženskah. Ugotovili so, da je predoperativna koncentracija sOPN statistično značilno povišana pri bolnicah z rakom jajčnikov ($p < 0,001$) v primerjavi z zdravimi ženskami. Koncentracija sOPN pri bolnicah z ovarijskim karcinomom je bila tudi statistično značilno povišana v primerjavi z bolnicami z ostalimi tipi ginekoloških rakov (npr. materničnega vratu in maternične sluznice) [42]. Tudi Nakae s sod. je dokazal signifikantno zvišano koncentracijo plazemske koncentracije sOPN pred operacijo pri

pacientkah z rakom jajčnikov kot pri pacientkah z benignim rakom jajčnikov, ostalimi ginekološkimi boleznimi ali pri zdravih [43].

Brakora s sod. je primerjal serumske koncentracije sOPN pri bolnicah po odstranitvi jajčnikov s ponovitvijo bolezni in zdravih preiskovankah [44]. Njegova študija ni dokazala statistično značilne razlike v koncentraciji sOPN med obema skupinama, dokazali pa so, da se serumska koncentracija sOPN poviša pri tistih bolnicah, kjer se bolezen ponovi v primerjavi z bolnicami z začasnim izboljšanjem bolezni [44]. John O. Schorge poroča o znižani plazemski koncentraciji sOPN pri 77 % preiskovank z epiteljskim rakom jajčnikov po operaciji [40].

Mnogo pomembnih študij [43, 44] je dokazalo koristnost tega markerja pri odkrivanju ponovljenega raka jajčnikov. Izkazalo se je, da so koncentracije signifikantno povišane pri napredovali obliki bolezni. V kombinaciji s CA-125 so dosegli visoko občutljivost, kar 93,8 %, toda nizko stopnjo specifičnosti le 33,7 %. OPN kot samostojni biomarker, ima nižjo napovedno vrednost kot CA-125, saj njegova občutljivost znaša 81,3 %. Vredno pa je opozoriti, da imajo bolnice z občutno višjo koncentracijo sOPN precej slabšo prognozo [45].

Na eni strani, zasledimo kar nekaj študij, ki predlagajo sOPN kot nov, obetajoč biomarker v naboru že obstoječih markerjev za zgodnjo detekcijo in kot pomoč pri pridobitvi ocene občutljivosti in specifičnosti presejalnih testov. Po drugi strani pa je predlagana uporaba sOPN kot dodatka k CA-125 pri napovedi ponovitve bolezni. Po prvem operativnem posegu in uspešni kemoterapiji, bolezen pri večini pacientk miruje. Za spremljanje bolnic po odpustu se še vedno najbolj uporablja CA-125, zagotovo pa bi nov, klinično uporaben marker izboljšal nekatere postoperativne odločitve. Zgodnje odkrivanje rezistence zdravljenja z zdravili lahko pospeši zamenjavo zdravil ali uporabo manj škodljivih zdravil. In kot zadnje, če dovolj zgodaj odkrijemo bolezen, občutljivo na zdravljenje z zdravili, ki vsebujejo platino, lahko bolnicam izboljšamo preživetje s kirurškim zmanjšanjem recidivnega tumorja (sekundarna citoredukcija). OPN ima torej potencialno vrednost markerja, ki bi omogočal oceno uspešnosti zdravljenja, tako kirurškega kot s citostatiki, in bi bil uporaben za spremljanje bolnic na kontrolnih pregledih [40].

Osteopontin je tudi izbrani proteinski biomarker, ki ga je odbor SPORE (Posebni program za odličnost v znanosti, *angl. Specialized Program of Research Excellence*) vključil v svoje raziskave zaradi visoke stopnje občutljivosti in specifičnosti v razlikovanju epiteljskega raka jajčnikov od zdravega epitelija jajčnikov [19].

1.9 ZDRAVLJENJE RAKA JAJČNIKOV: kiruško in zdravila

Zdravljenje bolnic z epitelijskim rakom jajčnikov [4]

Primarna terapija je kirurška s čimbolj radikalno odstranitvijo tumorskih mas (citoredukcija).

Kirurško zdravljenje: Standardni kirurški poseg obsega odstranitev maternice z obojimi jajčniki in jajcevodni (adneksi), odstranitve pečice (omentuma); slepiča ter tumorskih mas v trebuhu in za peritonejem. Prognostično najpomembnejši dejavnik je radikalnost operacije – temeljita citoredukcija. Zelo pomembno je, da kirurške posege izvedejo v ustanovi z izurjeno ginekološko in kirurško ekipo, dobro preoperativno pripravo in odlično pooperativno nego. Prizadevamo si za popolno odstranitev vseh tumorskih zasevkov ali vsaj minimalne ostanke bolezenskega tkiva, katerih premer naj ne bo večji od 1 cm. Operacijski zapisnik mora biti natančen z dobrim opisom stanja v trebušni votlini (*angl. staging*) ter opisom lege in velikosti rezidualnega tumorja.

Dodatno sistemsko zdravljenje je odvisno od stanja zmogljivosti bolnice, stadija bolezni, velikosti ostanka tumorja po operaciji in od diferenciacije tumorja.

Napredovali stadiji (FIGO IIB,c, III, IV) [4]

Kar 75 do 80% bolnic z rakom jajčnikov odkrijemo v stadiju II, III in IV. Primarna terapija je kirurška, sledi standardna sistemska kemoterapija. S kemoterapijo moramo pričeti najkasneje do 28. dneva po operativnem posegu. Pri kirurškem posegu naj bi dosegli maksimalno zmanjšanje tumorske mase (ostanek manjši od 1 cm).

Standardna kemoterapija: karboplatin + paklitaksel/ 3 tedne 6 krogov

cisplatin + paklitaksel / 3 tedne 6 krogov

Če pri postavitvi diagnoze ni bilo doseženo maksimalno zmanjšanje tumorske mase, je pri bolnicah, ki so odgovorile na kemoterapijo z izboljšanjem bolezni (remisijo) ali umiritvijo bolezni, indicirana intervalna reduktivna kirurgija, najbolje po 3 zaporednih kemoterapijah, tem pa sledijo še 3 zaporedne kemoterapije. Pri bolnicah z delnim izboljšanjem bolezni po 6 krogih kemoterapije, pri katerih opazimo trend padanja CA 125, lahko nadaljujemo s kemoterapijo še 3 kroge.

Druge možnosti zdravljenja [4]

Pri primarno neoperabilnih tumorjih določimo stadij bolezni z **laparoskopijo**. Pri tem posegu odvzamemo več biopsij iz tumorja in zasevkov. Takoj po laparoskopiji začnemo s kemoterapijo (**neoadjuvantna KT**). Po dveh do štirih krogih kemoterapije sledi kirurški poseg, nato zdravljenje nadaljujemo s štirimi ali več krogi kemoterapije.

Pri kontraindikacijah za sistemsko zdravljenje, ali če bolnica tak način zdravljenja odkloni, lahko v stadiju II in IIIa brez makroskopskega ostanka po kirurškem posegu, bolnici predlagamo vsaj dodatno zdravljenje z radioterapijo – **abdominalna kopel**.

Zdravljenje bolnic s ponovitvijo raka jajčnikov [4]

Pri ponovitvi bolezni razvrščamo bolnice glede na prognozo sekundarnega zdravljenja v dve skupini:

- tiste, pri katerih je prišlo do ponovne bolezni prej kot v 6 mesecih po primarnem zdravljenju;
- tiste, pri katerih je prišlo do ponovitve bolezni po pol leta ali še kasneje.

Pri prvi skupini bolnic le-te vključujemo v klinične študije z uporabo novih citostatikov, pri drugi skupini pa konzilij odloča o tem, ali uvedemo sekundarno sistemsko terapijo, obsevanje ali pa zdravimo kirurško (če je ponovitev bolezni prisotna le na enem mestu).

Nadzorovanje (angl. follow up) [4]

Prva tri leta po zdravljenju priporočamo kontrolne preglede na 4 mesece, pozneje na pol leta do pet let po zdravljenju bolezni, nato enkrat na leto v obdobju desetih let. Pri vsakem pregledu poleg anamneze, ginekološkega vaginalnega in rektalnega pregleda odvezamemo še kri za določitev CA-125. Pri kontrolnih pregledih nam je v pomoč UZ abdomna.

Od leta 1996 velja standardna kemoterapija kot kombinacija zdravila, ki vsebuje platino in paklitaksel. Študija GOG 111 je pokazala signifikantno razliko prednosti uporabe kombinacije cisplatina in paklitaksela. Pozneje so v študiji GOG 114 cisplatin nadomestili s karboplatinom in izkazalo se je, da ima karboplatin v primerjavi s cisplatinom, enako učinkovitost in manj resnih neželenih učinkov [46].

Znanstveniki so v zelo obsežni študiji (n=4312) preizkušali uspešnost zdravljenja z dodatnim citostatikom k uveljavljeni standardni kemoterapiji (karboplatin + paklitaksel + gemcitabin in karboplatin + paklitaksel + doksorubicin v liposomih). Izkazalo se je, da kombinacija treh zdravil ni niti bolj učinkovita niti nima drugih prednosti kot standardna kombinacija dveh citostatikov [46].

Trenutno ni podatkov o novih kombinacijah zdravil, zato karboplatin + paklitaksel ostaja kombinacija zdravil prvega izbora [46].

Novejši pristopi zdravljenja raka jajčnikov so usmerjeni v uravnavanje delovanja različnih molekul v telesu. Inhibitor vaskularnega endotelijskega rastnega faktorja (VEGF) bevacizumab se je nedavno izkazal za obetajoče zdravilo v III. fazi kliničnega preizkušanja. Prav tako je v III. fazi kliničnega preizkušanja zdravilo oregovomab, ki deluje na CA-125 in bo služil kot samostojno zdravilo vzdrževalne terapije po kemoterapiji pri napredovalem raku jajčnikov [47].

1.9.1 Celični receptor CD44 in osteopontin kot novi mesti delovanja

CD44 in OPN sta novi potencialni mesti delovanja zdravil za zdravljenje raka jajčnikov. Zdravilo, ki deluje preko OPN je še v predklinični fazi testiranja in deluje preko PI3-K signalne poti [8], medtem ko je CD44 v II. fazi kliničnega preizkušanja [51].

CD44 kot novo mesto delovanja

CD44, receptor za različne molekule medceličnine, je obetavna tarča zdravljenja raka. Metode, ki so jih preizkusili za zaviranje aktivnosti CD44 vključujejo uporabo nevtralizacijskih protiteles, siRNA, protismiselne RNA, cDNA cepivo in naravno prisotni

inhibitor CD44 – silibinin. Silibinin, izoliran iz rastline pegasti badelj, je znan po svojih protitumorskih lastnostih pri raku dojk, raku pljuč in raku debelega črevesa in danke [40]. Pri ovarijskem karcinomu, je Casey s sod. pokazal, da monoklonska protitelesa proti CD44 niso zavrla invazije celic raka jajčnikov, so pa zavrla metastaziranje [48]. Strobel s sod. je dokazal zmanjšano skupno število peritonealnih metastaz raka jajčnikov pri miših, katere so prejemale protitelesa proti CD44 [49]. Kljub obetajočim študijam *in vitro*, se je nevtralizacija protiteles proti CD44 v kliničnih preizkušanjih izkazala kot nesprejemljiva zaradi številnih neželenih učinkov [50]. V prihodnosti bo potrebno odkriti bolj varna zdravila, ki učinkujejo preko CD44 [40].

Trenutno se s CD44 mestom delovanja zdravil ukvarja podjetje Ångstrom [51]. Učinkovina nosi oznako A6 in je v kliničnem preizkušanju za zdravljenje raka jajčnikov ter v pred-kliničnem razvoju za zdravljenje diabetične retinopatije. A6 se veže na celični receptor CD44 in inhibira celično migracijo. Polovična minimalna inhibitorna koncentracija je v območju nM-pM in deluje še 18 do 20 h po odstranitvi A6. A6 je stabilna v fosfatnem pufru več kot 5 let, če jo shranjujemo pri temperaturi od 2 do 8 °C. A6 se je izkazala kot varna učinkovina v študijah na živalih, saj zaenkrat še ni znanega toksičnega odmerka. Podjetje je nedavno zaključilo zgodnjo fazo II kliničnega preizkušanja pri ženskah z rakom jajčnikov, pri katerih se je bolezen ponovila. Pri pacientkah, ki so prejemale A6, se je čas napredovanja bolezni podvojil v primerjavi s kontrolno skupino, ki je prejemale placebo. Klinične študije so bile in bodo še naprej potekale v sodelovanju z Nacionalnim inštitutom za raka, Nacionalnih inštitutov zdravja, Bethesda, ZDA [51].

Zdravilo A6 je zasnovano tako, da preprečuje razvoj novih krvnih žil (neo)angioogenezo), ki so bistvenega pomena za rast tumorja. Udeleženske študije si bodo same dajale dnevne injekcije A6 štiri tedne. Temu sledi 7-dnevni premor brez zdravila. Raziskovalci so dejali, da se cikel lahko ponovi 11-krat, če bolezen miruje in zdravilo ne povzroči resnejših neželenih učinkov [52].

2. NAMEN DELA

Že skoraj 30 let potekajo številne raziskave, da bi odkrili boljši marker za zgodnejše odkritje raka jajčnikov kot je CA-125 in s tem zmanjšali umrljivost zaradi te bolezni, a brez uspeha. Zaradi lege jajčnikov globoko v medenici bolezni v zgodnji fazi poteka brez simptomov. Poznani simptomi raka jajčnikov so tisti, ki se najpogosteje pojavljajo pri že napredovali obliki stadija III in IV po klasifikaciji FIGO. Poleg simptomov: bolečin v trebuhu, hrbtu, zaprtja in uhajanja urina, je prisotnost ascitesa osrednji znak, ki je vpleten v razvoj bolezni. Ascites je prekomerno kopičenje tekočine v trebuhu. V njem najdemo številne topne proteine in rakave celice, slednje se v tem okolju hitro širijo po trebušni votlini. Med topne proteine štejemo tudi adhezijske molekule, komor spadata sCD44-v6 in sOPN, ki smo ju izbrali kot možna kandidata v naboru biomarkerjev za identifikacijo in spremljanje raka jajčnikov.

Namen diplomske naloge bo določiti koncentracijo sCD44-v6 in sOPN v telesnih tekočinah bolnic s seroznim epitelijskim rakom jajčnikov stadija III in IV po klasifikaciji FIGO in jo primerjati s koncentracijo pri kontrolnih ženskah. Serozni epitelijski rak jajčnikov bomo izbrali, ker je prav ta histološki podtip največkrat vzrok smrti v povezavi z rakom jajčnikov. Kontrolno skupino bodo predstavljale ženske, ki nimajo obolenja jajčnikov in jajcevodov oziroma imajo na teh mestih benigne tumorje. Koncentracijo sCD44-v6 in sOPN bomo merili v serumu in peritonealni tekočini oziroma ascitesu ter primerjali te vrednosti med seboj in med skupinama. Za sOPN koncentracija v peritonealni tekočini in ascitesu še ni bila določena, za sCD44 pa ne v peritonealni tekočini.

Oba proteina sta izražena na rakavih celicah jajčnikov in sodelujeta pri razvoju bolezni, zato nas zanima ali je koncentracija pri bolnicah povišana v primerjavi s kontrolnimi preiskovankami. Izbrana metoda je pretočna citometrija, kot alternativa bolj uveljavljeni metodi ELISA. Rezultati bodo osvetlili prednosti in omejitve sCD44-v6 in sOPN kot biomarkerja pri raku jajčnikov.

V diplomskem delu bomo preverili naslednje delovne hipoteze:

- sCD44-v6 in sOPN sta v merljivih koncentracijah prisotna v serumu, peritonealni tekočini in ascitesu preiskovank.
- Koncentracija sCD44-v6 je v serumu in ascitesu pri bolnicah s seroznim ovarijskim karcinomom povišana v primerjavi s koncentracijo sCD44-v6 v serumu in peritonealni tekočini kontrolnih preiskovank.
- Koncentracija sOPN je v serumu in ascitesu pri bolnicah s seroznim ovarijskim karcinomom povišana v primerjavi s koncentracijo sOPN v serumu in peritonealni tekočini kontrolnih preiskovank.
- Prisotna je pozitivna korelacija med koncentracijo sCD44-v6 v serumu in ascitesu bolnic ter med koncentracijo sCD44-v6 v serumu in peritonealni tekočini kontrolnih preiskovank.
- Prisotna je pozitivna korelacija med koncentracijo sOPN v serumu in ascitesu bolnic ter med koncentracijo sOPN v serumu in peritonealni tekočini kontrolnih preiskovank.

3. MATERIALI

3.1 BIOLOŠKI MATERIAL

Vzorci bolnic s seroznim rakom jajčnikov in vzorce kontrolnih preiskovank, smo pridobili na Ginekološki kliniki v UKC Ljubljana. Pri bolnicah s seroznim rakom jajčnikov so vzorci zajemali serum in ascites; pri kontrolnih preiskovankah pa serum in peritonealno tekočino (PT). Sveže odvzete vzorce smo ustrezno obdelali za shranjevanje – zamrznitev na -80°C – po protokolu za posamezno vrsto vzorca.

3.2 KEMIKAJIJE

Pri analizi vzorcev za posamezni biomarker smo uporabili dva različna seta reagentov proizvajalca eBioscience, linije FlowCytomix™ Multiple Analyte Detection. Prvi, osnovni set reagentov je za CD44 in OPN enak.

3.2.1 Analizni komplet za CD44-v6 [27]

Preglednica IV: Osnovni in specifični analizni komplet za CD44-v6.
(Povzeto po [27].)

OSNOVNI KOMPLET (Human Basic Kit FlowCytomix BMS8420FF)	SPECIFIČNI KOMPLET sCD44 var (v6) (Human CD44var (v6) FlowCytomix Simplex Kit BMS80210FF)
Nastavitvene kroglice (Setup bead – SB)	175 μL fluorescentnih kroglic (20x), prekritih z monoklonskimi protitelesi proti človeškemu CD44var (v6), kroglice populacije A7
50 mL pufra za poskus –PBS z 10 % BSA (AB 10 %)	2 viali liofiliziranega standarda človeškega CD44var (v6): 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$
13 mL pufra za razredčitve (RDB)	350 μL z biotinom konjugirana sekundarna protitelesa (20x) BioC; monoklonska protitelesa proti človeškemu CD44var (v6)
200 μL streptavidin-fikoeritrin (SPE)	
Mikrotitrna plošča s 96 luknjami	
Adhezivni filter	

3.2.2 Analizni komplet za OSTEOPONTIN [33]

Preglednica V: Osnovni in specifični analizni komplet za OPN.

(Povzeto po [33].)

OSNOVNI KOMPLET (Human Basic Kit FlowCytomix BMS8420FF)	SPECIFIČNI KOMPLET OPN (Human Osteopontin FlowCytomix Simplex Kit BMS82066FF)
Nastavitvene kroglice (Setup bead – SB)	175 µL fluorescentnih kroglic (20x), prekritih z monoklonskimi protitelesi proti človeškemu osteopontinu; kroglice populacije A5
50 mL pufra za poskus –PBS z 10% BSA (AB 10%)	2 viali liofiliziranega standardnega človeškega osteopontina: 4000 ng/mL
13 mL pufra za razredčitve (RDB)	350 µL z biotinom konjugirana sekundarna protitelesa (20x) BioC; poliklonska protitelesa proti človeškemu osteopontinu
200 µL streptavidin-fikoeritrin (SPE)	
Mikrotitrna plošča s 96 luknjami	
Adhezivni filter	

3.3 APARATURE IN DROBNI LABORATORIJSKI MATERIAL

- Centrifuga (Sigma 3K30)
- Pretočni citometer Quanta™ SC MPL, Beckman Coulter
- Vakuumska črpalka
- Vibracijski mešalnik (Vortex)
- Vodna kopel
- Multikanalna avtomatska pipeta, Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- Ročna pipeta
- Nastavki za pipetiranje
- Centrifugirne epruvete 1,5 mL in 2,0 mL
- Naprava za vakuumsko filtracijo (VFM)

4. METODE

4.1 PREISKOVANKE

V prospektivno klinično študijo smo vključili 20 bolnic, operiranih laparoskopsko na Ginekološkem oddelku, UKC Ljubljana, razdeljenih v dve skupini:

1. Prva skupina: 10 bolnic z rakom jajčnikov (serozni adenokarcinom, stadij III in IV).
2. Druga skupina: 10 kontrolnih bolnic, ki smo jih opredelili kot bolnice, ki nimajo obolenja jajčnikov in jajcevodov (indikacije za sprejem v študijo: miom uterusa, pelvialgija, družinska obremenjenost z rakom jajčnikov) oziroma imajo na teh mestih benigne tumorje (benigna cista jajčnikov).

Vse kontrolne bolnice so imele prisotno peritonealno tekočino v Douglasovem prostoru. Vzorci so bili odvzeti ne glede na fazo menstrualnega cikla razen med samo menstruacijo. Fazo cikla smo določili s pomočjo datuma zadnje menstruacije. Bolezni, ki bi lahko bile povezane s povečano koncentracijo CD44-v6 ali OPN v serumu, smo ustrezno zabeležili.

Študijo je Ginekološki kliniki odobrila Etična komisija RS za medicinsko etiko (Št. 82/01/11; datum izdaje: 18.01.2011).

4.2 VZORCI

Pri bolnicah so vzorci zajemali serum in ascites; pri kontrolnih preiskovankah pa serum in PT. Kri je bila odvzeta pred operacijo, med operacijo pa ascites oziroma PT. PT je prisotna fiziološko v Douglasovem prostoru v volumnu do 50 mL. Ascites smo definirali kot prekomerno nabiranje PT (nad 50 ml) zaradi raka jajčnikov [12].

4.2.1 Vzorčenje in shranjevanje vzorcev

- Serum

Pred operacijo so preiskovanki odvzeli 4 mL krvi v vakuumsko epruveto brez dodatkov. Kri smo 30 min pustili na sobni temperaturi, da koagulira, nato smo jo 15 min centrifugirali na 2000xg pri temperaturi 4 °C. Supernatant smo razdelili v alikvote in jih zamrznili na -80 °C.

- Ascites

Na začetku operacije oz. takoj po vstopu v trebušno votlino je operater odvzel 10 mL ascitesa, ki smo ga 10 min centrifugirali na 1000xg pri temperaturi 4 °C. Supernatant smo razdelili v alikvote in jih zamrznili na -80 °C.

- PT

Na začetku operacije oz. takoj po vstopu v trebušno votlino, je operater iz Douglasovega prostora aspiriral vso prisotno peritonealno tekočino. V laboratoriju smo izmerili volumen PT in jo nato centrifugirali na 1000xg pri temperaturi 4 °C. Supernatant smo razdelili v alikvote in jih zamrznili na -80 °C.

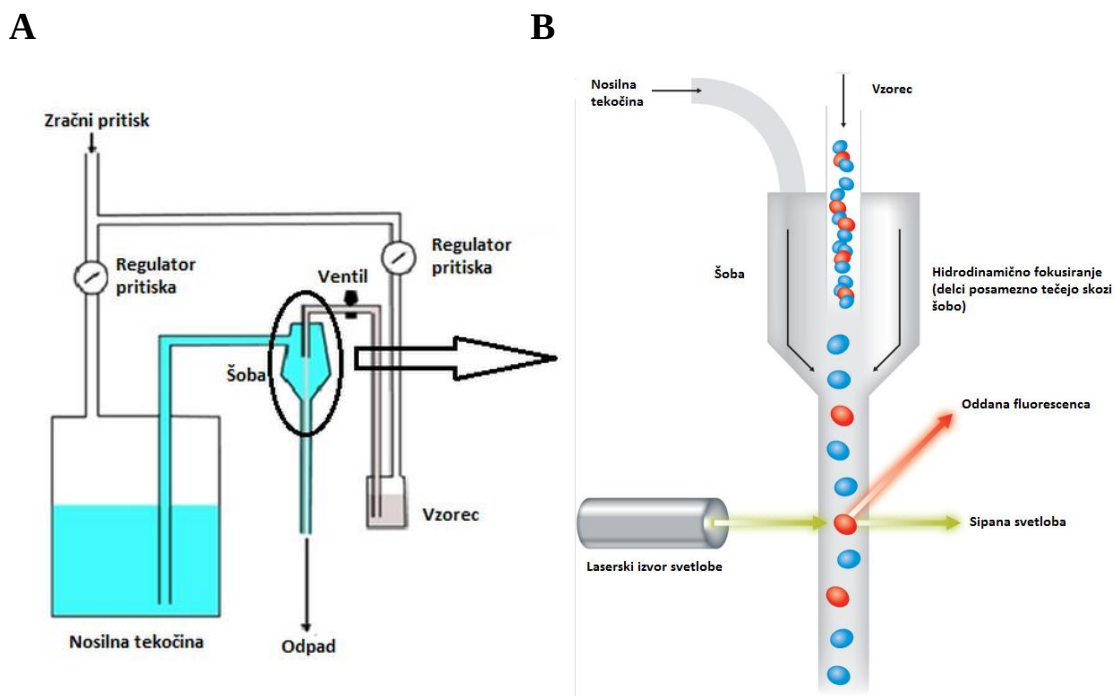
4.3 PRETOČNA CITOMETRIJA

Pretočna citometrija je metoda za merjenje lastnosti celic ali drugih delcev v tekočih vzorcih. Sodobni citometer lahko analizira več tisoč delcev vsako sekundo, hkrati pa jih ločuje glede na določeno lastnost delca [53].

Vsak citometer je sestavljen iz 4 osnovnih delov:

1. Enega ali več virov svetlobe določene valovne dolžine.
2. Hidrodinamskega sistema, ki omogoča kontroliran pretok posameznih celic skozi merilno enoto.
3. Detekcijski sistem, ki zazna sprejeto svetlobo.
4. Računalniški sistem, ki izmerjeno svetlobo na detektorju spremeni v signal [53].

Poenostavljena shema delovanja pretočnega citometra je predstavljena na sliki 7 [54] in sliki 8 [55]. Vzorec predhodno primerno obdelamo, da dobimo suspenzijo celic oziroma drugih delcev. Vzorec se v pretočnem citometru zaradi zračnega tlaka oblikuje v zelo tanek curek tekočine, ki omogoča, da celice ali drugi delci posamezno eden za drugim tečejo skozi šobo (vzorec je hidrodinamično fokusiran). Zračni tlak je odgovoren tudi za potisk nosilne tekočine v šobo. Hitrost pretoka vzorca je regulirana z regulatorjem pritiska, ki ima tri nastavitve: visok, srednji ali nizek. Z ventilom kontroliramo, ali v šobo dovedemo vzorec ali ne [54]. V šobo je usmerjena laserska svetloba, na drugi strani pa z različnimi detektorji zaznamo sipanje svetlobe ali oddano fluorescenco, kar nam da informacije o velikosti, granuliranosti in ostalih lastnostih posamezne celice ali delcev [56]. Stransko sipanje oziroma fluorescenco, ki je odvisna od granuliranosti celic, zaznajo stranski detektorji sipanja (SSC). Kombinacija zaznane sipane svetlobe in oddane fluorescence, je detektirana in analizirana [55]. Če celice ali delce predhodno označimo s protitelesi, na katera so vezani fluorokromi, lahko merimo tudi fluorescenco pri različnih valovnih dolžinah [56].



Slika 6: A: Poenostavljena shema delovanja pretočnega citometra.

B: Vzorec se v pretočnem citometru zaradi zračnega pritiska oblikuje v zelo tanek curek tekočine, ki omogoča, da delci posamezno eden za drugim tečejo skozi šobo (vzorec je hidrodinamično fokusiran). (Povzeto po [54, 55].)

Glavne optične elemente citometra bomo opisali pri instrumentu **The Cell Lab Quanta™ SC MPL, Beckman Coulter®** [57], ki smo ga uporabili pri našem diplomskem delu. To je tribarvni citometer, kjer fluorescentno svetlobo (FL – fluorescent light) zaznajo tri različne fotopomnoževalke (PMT). Zelena nosi oznaka FL1, oranžna FL2 in rdeča FL3. Namesto celic smo uporabili kroglice (angl. bead), ki že same po sebi fluorescirajo pri daljni rdeči (FL3). Kroglice smo označili s protitelesi z vezanim fikoeritrinom, ki oranžno fluorescira (FL2). Pri analizi smo uporabili graf FL3 v odvisnosti od FL2 [57].

4.4 The Cell Lab Quanta™ SC MPL, Beckman Coulter® [57]

Glavna funkcija citometra je kvalitativno in kvantitativno merjenje bioloških in fizičnih lastnosti celic oziroma delcev – v našem primeru kroglic. Oznaka MPL opisuje možnost, da vzorce lahko črpa iz mikrotitrne plošče s 24, 96 ali 384 luknjicami. Omogoča pa tudi stresanje in/ali razpihovanje vzorca.

The Quanta SC MPL Collection software kontrolira citometer, sproži začetek analize – injiciranje vzorcev, in shranjuje informacije v bazo podatkov.

The Quanta SC MPL Analysis software uporablja podatke iz baze SQL. Uporabniku omogoča da vidi in analizira podatke takoj za tem, ko so bili shranjeni v bazi podatkov z aplikacijo Collection software.

The Quanta SC MPL System je tribarvni pretočni citometer. Ima dva neodvisna ekscitacijska izvora svetlobe, laser z valovno dolžino 488 nm in živosrebreno arc svetilko s tremi valovnimi dolžinami: 366, 405 in 435 nm.

Sistem zmore:

- natančno določiti elektronski volumen (EV – angl. Electronic Volume) kot parameter velikosti z uporabo Coulterjevega principa. To je svetovno priznana metoda štetja in določanja velikosti delcev.
- izmeriti do 3 različna fluorescentna barvila;
- izmeriti koncentracijo vzorca;
- izmeriti granuliranost vzorca z uporabo stranskega sipanja svetlobe (angl. Side Scatter);
- izračunati dva nova parametra: površinsko gostoto fluorescence in koncentracijo fluorescence glede na površino;
- zagotovi absolutno štetje.

Slika 7 prikazuje poenostavljen princip delovanja instrumenta za merjenje fluorescence celic/ kroglic, ki so označeni s fluoresceinom ali fikoeritriinom (PE).

Sistem istočasno zbira optične meritve in meritve elektronskega volumna (EV).

Kroglice tečejo skozi cev s prerezom enakostraničnega trikotnika, ki ustvarja velik hidrodinamski tlak in tako fokusira tok vzorca skozi center cevi. Kroglice suspendirane v šibki elektrolitski raztopini polzijo mimo odprtine med dvema elektrodama, med katerima teče rahel električni tok. Ob prehodu posamezne kroglice skozi ta prostor se poveča upornost med elektrodama, ki jo izmerimo preko **spremembe v velikosti električnega toka** ($U = IR$). **Velikost spremembe je odvisna od velikosti kroglice, kar označimo kot EV**; tako veliki delci ustvarijo višji in manjši nižji odziv. Ta meritev je neodvisna od barve, oblike ali refrakcijskega indeksa vzorca. To je referenčna metoda za avtomatsko štetje in določanje velikosti delcev.

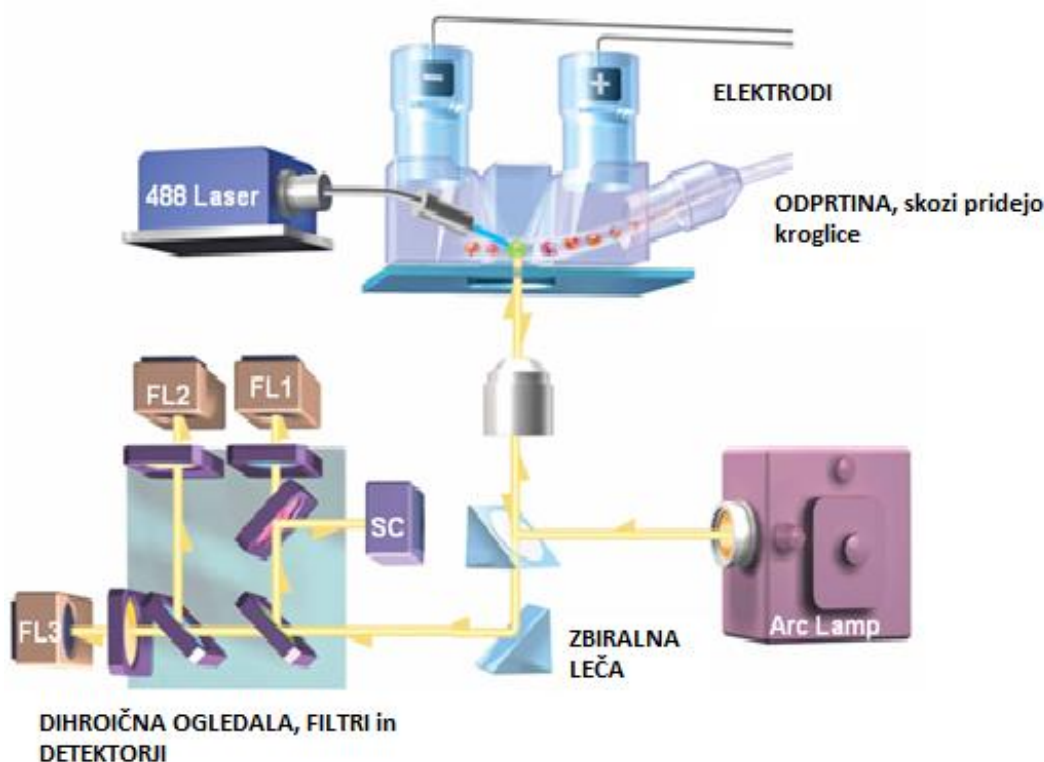
Svetloba za optični del meritve izvira iz modrega Ar laserja (488 nm) ali živosrebrove Arc svetilke in jo uporabimo za vzbujanje fluorescentnega barvila, vezanega na kroglice. Ko delci potujejo mimo izvora svetlobe, se iz barvila izseva svetloba, ki jo preko filtrov pošljemo na fotopomnoževalke (PMT). Iz njih dobimo električni odziv glede na količino fluorescence (FL1, FL2, FL3).

Pri meritvah smo uporabili laserki žarek. Pravokotno nanj je postavljena zbiralna leča, ki usmeri svetlobo na serijo dihroičnih (polprepustnih) zrcal. Namen teh zrcal je, da iz žarka izberejo svetlobo različnih valovnih dolžin. Prvo dihroično zrcalo zbira svetlobo valovne dolžine 550 nm in manj (modra). Le-to dodatno filtriramo in svetlobo valovne dolžine 488 nm, ki predstavlja stransko sipanje, pošljemo na detektor SC. PMT v detektorju jo pretvori v električni signal.

Preostala modra svetloba, gre skozi zeleni filter (525 nm) na fotopomnoževalko FL1. Naslednje dihroično zrcalo prepusti svetlobo z valovno dolžino nad 600 nm na detektor rdeče svetlobe (FL3). Svetloba pod 600 nm pa se lomi pod pravim kotom in gre skozi oranžni filter na FL2 [57].

Vse tri signale (odziv elektronskega volumna, odziv fluorescence in odziv stranskega sipanja) ojačamo, digitaliziramo in določimo jakost odziva. Izmerki posamezne meritve so nadalje uporabljeni za prikaz grafov na zaslonu, ki ga vidi uporabnik.

Sistem zmore razlikovati delčke velikostnega razreda od 3 μm do 40 μm [57].



Slika 7: Glavni optični elementi pretočnega citometra pri instrumentu The Cell Lab Quanta™ SC MPL, Beckman Coulter® (Povzeto po [57].)

4.5 PRINCIPI TESTA NA OSNOVI FLUORESCENTNIH KROGLIC [58, 59]

- Test na osnovi fluorescentnih kroglic ima enak pristop kot sendvič ELISA

Kroglice so prekrte s protitelesi, ki specifično reagirajo s posameznim analitom, ki ga bomo detektirali v sistemu. Kroglice razlikujemo po njihovi velikosti in glede na njihovo fluorescenco.

Mešanico kroglic s specifičnimi primarnimi protitelesi inkubiramo z vzorcem ali mešanico standardov (*Slika 8A*).

Prisotni analit iz vzorca se veže na protitelesa na fluorescentnih kroglicah. (Same kroglice s primarnimi protitelesi oddajajo svetlobo z valovno dolžino 700nm – oddaljena rdeča, angl. far red.) (*Slika 8B*).

Nato dodamo mešanico sekundarnih protiteles: z biotinom konjugiranih nevtralnih molekul, ki ojačajo signal. Ta protitelesa se vežejo na analite, ujete na primarnih protitelesih (Slika 8C).

Zadnji korak vključuje dodatek raztopine barvil streptavidin-fikoeritrin (SPE), ki se veže na kompleks vzorec, primarno in sekundarno protitelo in oddaja fluorescentne signale pri valovni dolžini 575nm (Slika 8D).

Uporabimo pretočno citometrijo za diferenciacijo populacije kroglic, glede na velikost kroglic in fluorescentno intenziteto (Slika 8E).

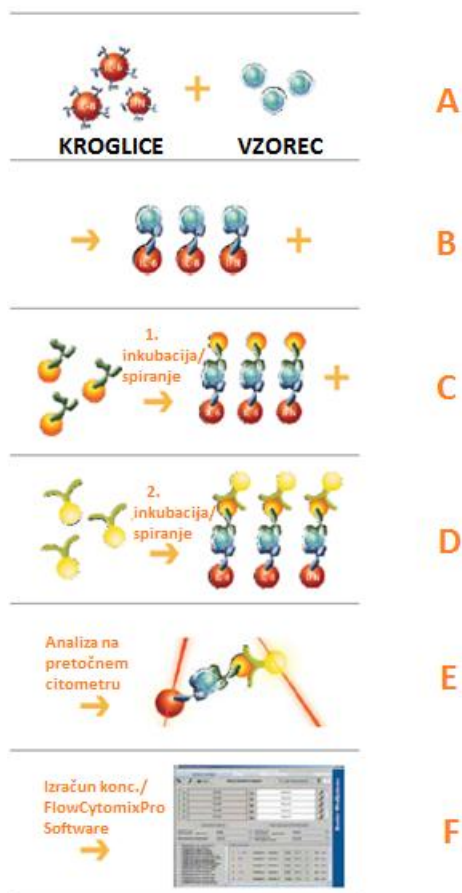
FlowCytomix™Pro Software enostavno izračuna koncentracijo preiskovane molekule v vzorcih (Slika 8F).

Za FlowCytomix sta na razpolago dva seta različnih velikosti kroglic:

velikost A: 5 μm velikost B: 4 μm (Slika 8E)

Kroglice velikosti A sestavlja 11 populacij kroglic, medtem ko jih velikosti B le 9. Kroglice so obarvane z različnimi intenzitetami fluorescenčnega barvila, glede na to, ali pripadajo velikosti A ali B (Slika 8F).

Barvilo ekscitiramo z Argon ali He-Ne laserjem in emitira pri oddaljeni rdeči (700 nm). Z dvema različnima velikostma kroglic lahko razlikujemo 20 setov kroglic v enem fluorescentnem kanalu. Teh 20 različnih kroglic, ki se razlikujejo v intenziteti notranjega barvila in velikosti, omogoča simultano kvantifikacijo 20 analitov v majhnem volumnu enega vzorca.



Slika 8: Shematski prikaz principa testa na osnovi fluorescentnih kroglic. (Povzeto po [59].)

4.6 ANALIZA S PRETOČNIM CITOMETROM NA OSNOVI FLUORESCENTNIH KROGLIC

Določanje koncentracije sCD44-var6 in sOPN v krvi, ascitesu in peritonealnem izpirku s pomočjo pretočne citometrije

Pretočna citometrija je tehnika, ki omogoča meritev koncentracije topne oblike sCD44-v6 in sOPN v telesnih tekočinah s pomočjo fluorescentno obarvanih kroglic premera 5 μm , na katere so vezana specifična protitelesa (eBioscience Human Basic Kit FlowCytomix BMS8420FF in Human Osteopontin FlowCytomix Simplex Kit BMS82066FF oziroma Human CD44var (v6) FloxCytomix Simplex Kit BMS80210FF). Pri tej metodi je spodnja meja detekcije za CD44-var6 126 pg/mL in za osteopontin 432 pg/mL. Obe koncentraciji sta dovolj nizki glede na pričakovano koncentracijo v naših vzorcih. Standardne vrednosti v metodi so za sCD44-v6 v območju 137-100.000 pg/mL ter za sOPN med 274-200.000 pg/mL. Zaradi optimizacije metode smo določali v vzorcih posebej koncentracije sCD44-v6 in koncentracije sOPN. Izvor svetlobe je argonski laser z valovno dolžino 488 nm. Za meritev smo uporabili EV in naslednje detektorje: SSC (stransko sipanje svetlobe, angl. *side scatter*), FL2 (filter 575 nm) in FL3 (filter 670 nm). Za analizo rezultatov smo uporabili računalniški program FlowCytomix Pro 2.4 [27, 33, 58].

4.6.1. PRIPRAVA REAGENTOV IN VZORCEV

V prvem koraku izračunamo volumne reagentov s pomočjo računalniškega programa FlowCytomix Pro Software. Določimo število lukenj na plošči, ki jih potrebujemo za vzorce, standarde in kontrolo (kamor damo vse reagente razen vzorca).

1. Najprej pripravimo pufer za poskus (Assay Buffer- AB, 10x), ki ga razredčimo z destilirano vodo, da dobimo AB (1x).

2. Priprava standardov (S1-S7)

Da se liofiliziran standard zbere na dnu vial priporočajo, da še predno odpremo vialo, le-to centrifugiramo na 3000 obratov/ 15 s. Po centrifugiranju dodamo 55 μL destilirane vode in vorteksiramo, da se vse raztopi. Nato pripravimo standardne mešanice. 7 vial označimo z S1-S7. Za S1 uporabimo razredčitev 1:20, za S2-S7 pa razredčitev 1:3 (slika 9).



Slika 9: Shematski prikaz priprave standardov (S2-S7). (Povzeto po [58].)

Za CD44-v6 in OPN imamo tako 7 standardov z naslednjimi koncentracijami:

Preglednica VI: Koncentracije standardov in njihove intenzitete fluorescence za CD44-v6

(Povzeto po [27].)

Koncentracija (pg/mL)	Intenziteta fluorescence (FI)
S1 100000	387,70
S2 33333	186,24
S3 11111	48,54
S4 3704	10,27
S5 1235	2,78
S6 412	1,46
S7 137	1,29
Kontrola 0	1,17

Preglednica VII: Koncentracija standardov in njihove intenzitete fluorescence za OPN

(Povzeto po [33].)

Koncentracija (pg/mL)	Intenziteta fluorescence (FI)
S1 200000	20,67
S2 66667	16,70
S3 22222	7,29
S4 7407	2,21
S5 2469	0,90
S6 823	0,62
S7 274	0,39
Kontrola 0	0,37

3. Priprava mešanice kroglic (bead mixture - BM)

Izračunamo koliko kroglic potrebujemo: 25 µL BM x št. lukenj oz. testov = končni volumen. Vialo s kroglicami premešamo in odpipetiramo 1/20 končnega volumna v drugo vialo, dodamo pufer za razredčitev ter centrifugiramo na 3000 obratov/ 5 min. Previdno odstranimo tekočino s površine tako, da je 50 µL pustimo v viali. Nato dodamo enak volumen pufera kot smo ga odvzeli.

4. Priprava mešanice biotin-konjugata (BioC)

Izračunamo koliko BioC potrebujemo: 50 µL BioC x št. lukenj oz. testov = končni volumen.

Odpipetiramo 1/20 od končnega volumna v vialo in dodamo ustrezen volumen pufera za razredčitev.

5. Priprava raztopine streptavidin-fikoeritrina (SPE)

Opomba: Raztopino pripravimo šele 10 min pred koncem inkubacije plošč z biotin-konjugatom, zaradi občutljivosti na svetlobo!

Koncentrat SPE razredčimo s pufrom AB (1x) glede na vrednosti, ki smo jih izračunali z računalniškim programom.

6. Priprava vzorcev

Vzorci odtalimo na sobni T in previdno pomešamo. Lipemične vzorce centrifugiramo tik pred uporabo pri 16000 obratih/ 5 min. Vzorce redčimo s pufrom AB. Za CD44-v6 smo uporabili razredčitev 1:10, za OPN pa 1:5. Na ploščo pipetiramo 25 µL vzorca.

4.6.2. TESTNI PROTOKOL

- **z uporabo filtracijske plošče in naprave za vakuumsko filtracijo (angl. vacuum filtration manifold) (VFM)**

Adhezivni film položimo preko lukenj, ki jih ne potrebujemo. Vse preostale luknje omočimo s 50 µL pufru AB (1x) in ploščo aspiriramo z VFM. V odgovarjajoče luknje na plošči dodamo 25 µL različnih razredčitev standarda (S1-S7) razen S1, ki ga dodamo v 3 luknje (ena je za nastavitev instrumenta), ostale standarde dodamo v dveh paralelkah, v kontrolni luknji (angl. blank, B) pa dodamo 25 µL pufru AB (1x).

Vzorci dodamo v odgovarjajoče luknje, vsakega po 25 µL. Nato dodamo v vse luknje, vključno s kontrolnima luknjicama, po 25 µL kroglic in po 50 µL BioC. Vse luknjice pokrijemo z adhezivnim filmom, ploščo zaščitimo pred svetlobo z aluminijasto folijo in inkubiramo 2 h pri sobni T (18 do 25 °C) na stresalniku 100 obratov/min. V času inkubacije pripravimo raztopino SPE.

Po inkubaciji odstranimo adhezijski film in izpraznimo luknjice s pomočjo VFM. Zopet v vsako luknjico dodamo 100 µL pufru AB (1x) in jih izpraznimo z VFM. Ta korak ponovimo še enkrat.

V vse luknje, vključno s kontrolnima luknjicama, dodamo 100 µL pufru AB (1x) in 50 µL SPE. Ploščo pokrijemo z adhezivnim filmom, ploščo zaščitimo pred svetlobo z aluminijasto folijo in inkubiramo 1 h pri sobni T (18 do 25 °C) na stresalniku 100 obratov/min.

Po inkubaciji odstranimo adhezijski film in izpraznimo luknjice s pomočjo VFM. Zopet v vsako luknjico dodamo 100 µL pufru AB (1x) in jih izpraznimo z VFM. Ta korak ponovimo še enkrat. Pred naslednjim korakom s papirnato brisačo odstranimo vso tekočino z dna plošče.

Dodamo 200 µL pufru AB (1x) v vsako luknjico. Plošča je pripravljena za meritev.

4.6.3. MERITEV NA CITOMETRU

1. Nastavitev instrumenta

Najprej preverimo pretok (angl. flow check) za kontrolo stabilnosti sistema. Odpremo nov protokol in naredimo dva grafa: prvi je za manjše kroglice – 4 μm ; drugi za večje kroglice - 5 μm (CD44-v6 in OPN):

X os: **FL2 log** = PE emisija (575 nm)

Y os: **FL3 log** = emisija v daljnem rdečem delu spektra (700 nm)

Nato določimo merljive spremenljivke še na tretjem grafu:

X os: **elektronski volumen (lin)**

Y os: **stransko sipanje – side scatter (lin)**

Že v naprej pripravimo dve ovalni regiji; eno za manjšo in drugo za večjo populacijo kroglic (slika 10).

2. Nastavitev s kroglicami (angl. setup bead - SB)

Nastavitev s posebnimi kroglicami je potrebna, da vemo kje zajemati kroglice pri vzorcih; s tem si določimo območje. Prilagodimo parametre za elektronski volumen in stransko sipanje tako, da bosta obe populaciji kroglic vidni. Popravimo regijo 1 in 2 okoli obeh velikosti kroglic na grafu, ki smo ga naredili pod točko 1 (slika 10D).

Prilagodimo tudi napetost na FL2 za PE emisijo na X osi tako, da so kroglice vrednosti na levi strani grafa. To zagotavlja, da je standard z najvišjo koncentracijo (S1) viden na grafu. Prilagodimo tudi napetost na FL3 za Y os, tako da so vrednosti za določeno velikost kroglice jasno ločene (slika 10B in 10C).

3. Nastavitev s standardom 1

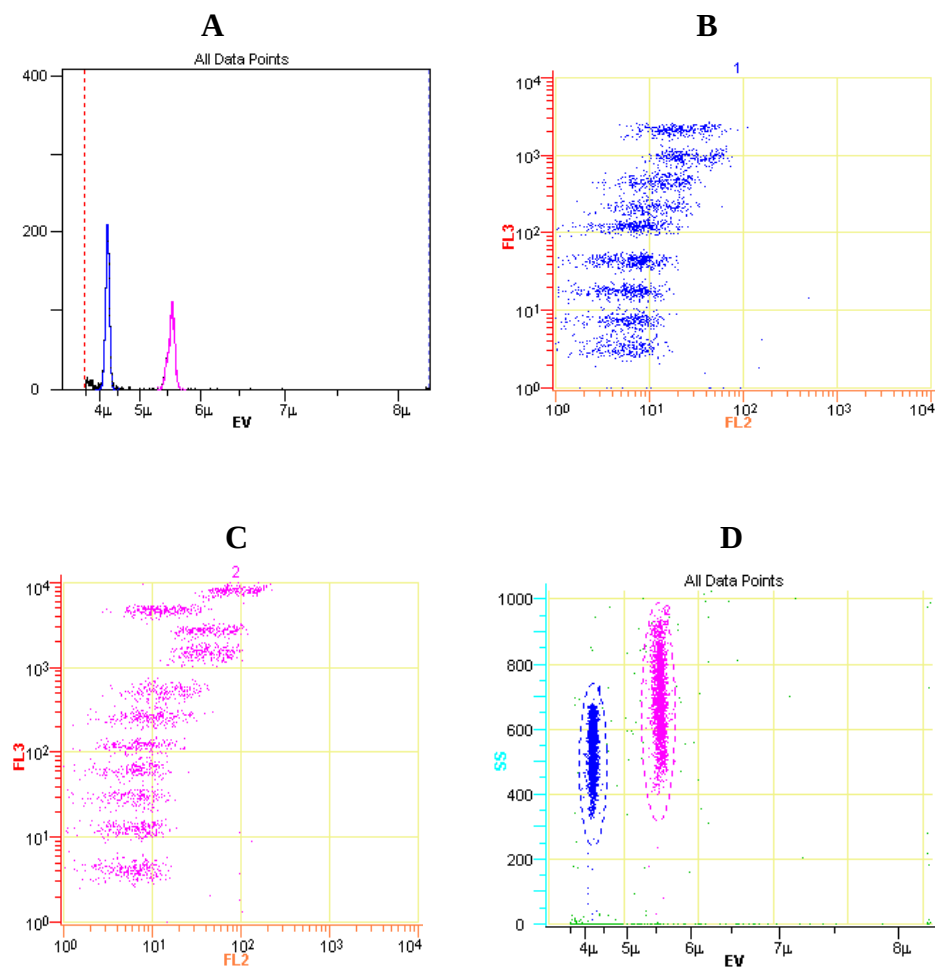
Tu prilagajamo nastavitve z uporabo standarda 1, ki da najvišji PE signal. Prilagodimo parametre na FL2 za PE emisijo na X osi tako, da je standard z najvišjo koncentracijo (S1) čim bolj na desni strani grafa. To omogoča, da detektiramo najnižje koncentracije analita.

4. Meritve standardov in vzorcev

Naredimo delovno listo po kateri instrument zajema vzorce in določimo volumen za zajem (100 μL). Določimo tudi kriterij za zaustavitev meritve, in sicer je to število dogodkov (300) na analit za regijo z CD44-v6 oz. OPN (to je regija z večjimi kroglicami) ter spravimo v protokol. Nato izmerimo standarde in vzorce.

4.7 TOČKOVNI DIAGRAM

Vse teste, kjer smo uporabljali komercialne kite, smo izvajali po navodilih proizvajalcev. Rezultati testov so točkovni diagrami, ki jih izriše računalniški program na osnovi meritev s pretočnim citometrom. Točkovni diagram je v tem primeru prikazan le kot vpogled v način pridobivanja podatkov, ki jih nadalje pretvorimo v uporabno informacijo (koncentracijo) z računalniškim programom SoftwarePro.



Slika 10: Primer točkovnega diagrama za nastavitev pretočnega citometra. **A:** Diagram dveh populacij kroglic, razporejenih po velikostnih razredih. **B:** Diagram odvisnosti FL2 od FL3 za manjšo populacijo kroglic – 4 μm. **C:** Diagram odvisnosti FL2 od FL3 za večjo populacijo kroglic – 5 μm (CD44-v6 in OPN). **B in C:** Prilagodimo parametre na X osi tako, da so vrednosti na *levi strani* grafa. Prilagodimo parametre na Y osi tako, da so vrednosti za določeno velikost kroglic jasno ločene. **D:** Prilagodimo parametre za elektronski volumen in stransko sipanje tako, da bosta obe populaciji kroglic vidni.

4.8 STATISTIČNE METODE

Vse vrednosti so izražene kot aritmetična sredina ± standardna napaka aritmetične sredine (SEM).

Korelacijo med dvema spremenljivkama smo določili s Pearsonovim koeficientom korelacije.

Statistično značilno razliko med aritmetičnimi sredinami smo izračunali s Studentovim t-testom pri primerjavi dveh skupin rezultatov. Statistično značilno razliko predstavlja stopnja tveganja največ 0,05. Statistično značilne razlike smo označili takole: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ in *** $p < 0,001$.

Za izračun smo uporabili računalniški program SigmaStat verzije 3.5, za risanje grafov pa SigmaPlot verzije 10,0.

5. REZULTATI

5.1 ZNAČILNOSTI PREISKOVANK

Srednja starost bolnic v kontrolni skupini je bila nižja (39; območje:21-69) kot v skupini bolnic s karcinomom jajčnikov (65; območje:43-83). Značilnosti kontrolnih preiskovank so v preglednici VIII.

V kontrolni skupini je bilo 7 bolnic, ki niso imele obolenja na jajčnikih in jajcevodih, 3 pa so imele benigne ovarijske ciste. Pri preiskovanki, ki je bila zdrava, je bila laparoskopija izvedena v diagnostičen namen. Dve sta imeli malo povišano vrednost C-reaktivnega proteina. Nobena ni imela povečane vrednosti za CA-125, ki je standardni tumorski marker za ovarijski karcinom.

Povprečni volumen peritonealne tekočine je znašal 11 mL (območje 0,8-28 mL).

Preglednica VIII: Značilnosti kontrolnih preiskovank.

<i>Značilnosti</i>	
Srednja starost (območje)	39 (21-69)
<i>Diagnostika</i>	<i>(št. pacientk)</i>
Miom uterusa	4
Benigna ovarijska cista	3
Pelvialgija	1
Družinska obremenjenost z rakom jajčnikov	1
Zdrava	
<i>Menopavzalni status</i>	<i>(št. pacientk)</i>
Premenopavzalni	9
Postmenopavzalni	1
<i>Menstrualni cikel</i>	<i>(št. pacientk)</i>
Folikularna faza	7
Lutealna faza	2
<i>C-reaktivni protein</i>	<i>(št. pacientk)</i>
Normalno	8
Povišano (območje; mg/mL):	2 (11-18)
Majhne spremembe (5-100 mg/mL)	2 (11-18)
<i>Število belih krvničk</i>	<i>(št. pacientk)</i>
Normalno	10
<i>Serumska vrednost CA-125</i>	<i>(št. pacientk)</i>
<i>(diagnostični prag ≥ 35 U/mL)</i>	
Normalno	10

5.2 STANDARDNE KRIVULJE

Standardno krivuljo za posamezni biomarker smo določili z uporabo komercialnega standarda in sicer tako, da smo pripravili 7 različnih razredčitev (S1-S7) v dveh paralelkah (slika 11, Metode). Glede na meritve program prilagodi najboljšo krivuljo in iz nje preračuna povprečne izhodne koncentracije standardov (povprečje dveh meritev, *angl.* BackCalc Conc. Mean). Pri tem srednjo intenziteto fluorescence (MFI) vzorca deli s srednjo fluorescenco kontrole (*angl.* blank, B), množi s 100 ($MFI/MFI_Blank \times 100$) ter izračuna kakšna so odstopanja od koncentracije, ki smo jo pričakovali (*angl.* Back Calculation Bias). Program smo nastavili tako, da je bilo sprejemljivo 30 % odstopanje. Za vsak poskus smo naredili svojo standardno krivuljo. V preglednicah IX, X in na sliki 13 smo prikazali primer standardne krivulje pri enem poskusu.

Standardne krivulje za sCD44-v6 in sOPN

Preglednica IX : Koncentracije standardov in odstopanja za sCD44-v6

sCD44-v6					
	Standardna konc. v pg/mL	»BackCalc Conc.« * v pg/mL (MFI)	B_B0 (MFI/MFI_Blankx100)	»BackCalc Conc.«* v pg/mL (Povprečje)	»Back Calculation Bias«**
B	0,00	N/A	100,00	N/A	N/A
S6	411,52	306,58 227,14	128,68	266,86	35.15 %
S5	1.234,57	1.594,16 1.389,24	402,54	1.491,70	20.83 %
S4	3.703,70	3.673,62 3.364,91	1.825,65	3.519,26	4.98 %
S3	11.111,11	11.204,24 11.204,24	17.314,23	11.204,24	0.84 %
S2	33.333,33	32.961,56 33.656,52	86.030,36	33.309,04	0.07 %
S1	100.000,0	120.064,83 83.346,93	200.888,57	101.705,88	1.71 %

*Nazaj iz krivulje izračunane izhodne koncentracije standarda

**Odstopanje od pričakovane koncentracije

Odstopanje večje od 30 %

B_B0 (MFI/MFI_Blankx100) pomeni, da srednjo intenziteto fluorescence vzorca deli s srednjo intenziteto fluorescence kontrole in množi s 100

N/A ni uporabno

Preglednica X: Koncentracija standardov in odstopanja za sOPN

sOPN					
	Standardna konc. v pg/mL	»BackCalc Conc.« * v pg/mL (MFI)	B_B0 (MFI/MFI_Blankx100)	»BackCalc Conc.«* v pg/mL (Povprečje)	»Back Calculation Bias«**
B	0,00	N/A	100,00	N/A	N/A
S7	274,35	323,68 487,74	104,02	405,71	47.88 %
S6	823,04	585,04 774,59	112,32	679,82	17.40 %
S4	7.407,41	7.800,38 7.000,28	1.424,78	7.400,33	0.10 %
S3	22.222,22	23.645,64 20.791,38	8.925,27	22.218,51	0.02 %
S2	66.666,67	70.107,97 63.410,72	29.542,89	66.759,34	0.14 %
S1	200.000,00	254.767,02 160.928,53	49.632,79	207.847,78	3.92 %

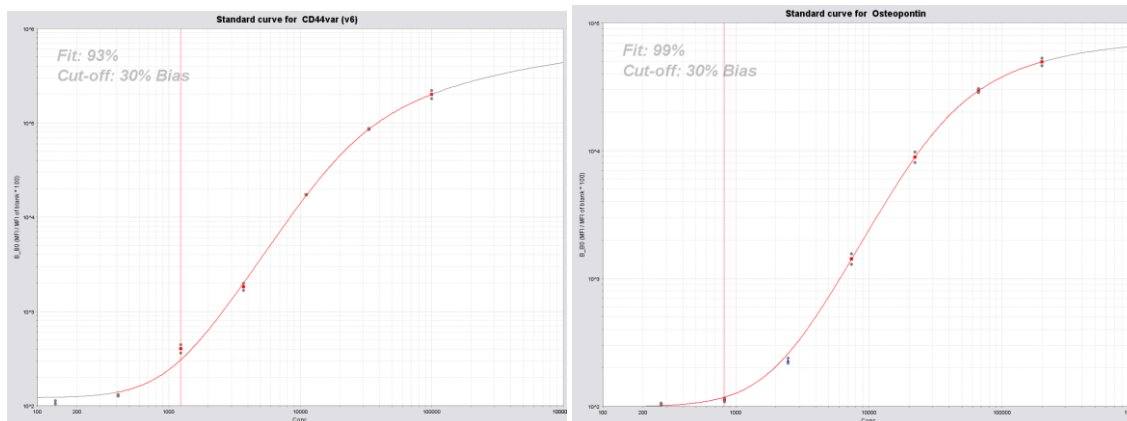
*Nazaj iz krivulje izračunane izhodne koncentracije standarda

**Odstopanje od pričakovane koncentracije

Odstopanje večje od 30 %

B_B0 (MFI/MFI_Blankx100) pomeni, da srednjo intenziteto fluorescence vzorca deli s srednjo intenziteto fluorescence in množi s 100

N/A ni uporabno



Slika 11: Standardna krivulja za sCD44-v6 (levo) in sOPN (desno).

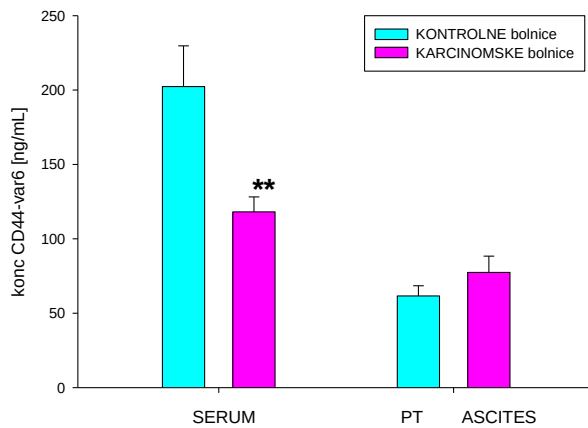
Odvisnost koncentracije od B_B0 (MFI/MFI_Blankx100).

5.3 KONCENTRACIJA sCD44-v6 V SERUMU ter PERITONEALNI TEKOČINI (PT) oz. ASCITESU

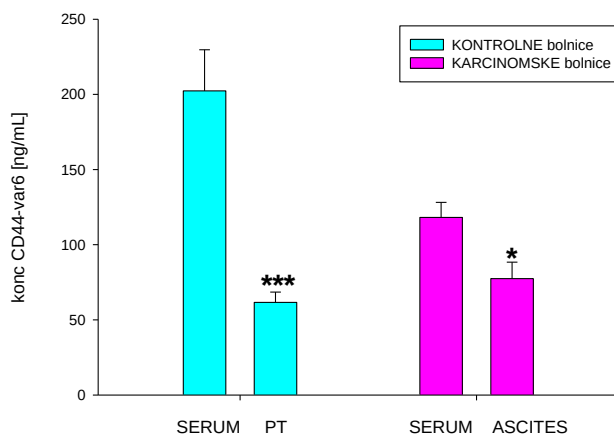
Z imunokemijsko reakcijo vezave specifičnih protiteles proti CD44-v6 na človeški CD44-v6 v telesnih tekočinah, smo dokazali merljive koncentracije sCD44-v6 tako v serumu in PT kontrolnih preiskovank kot v serumu in ascitesu bolnic s seroznim rakom jajčnikov. Koncentracija sCD44-v6 v serumu je bila pri skupini bolnic s seroznim rakom jajčnikov v primerjavi s kontrolnimi preiskovankami statistično signifikantno znižana ($p = 0,01$). V skupini bolnic s seroznim rakom jajčnikom je bila povprečna koncentracija sCD44-v6 v serumu $118,17 \pm 10,04$ ng/mL, v skupini kontrolnih preiskovank pa $202,36 \pm 27,32$ ng/mL. Pri lokalnih tekočinah pa razlika v koncentraciji sCD44-v6 med ascitesom pri bolnicah s seroznim rakom jajčnikov in PT pri kontrolnih preiskovankah ni bila signifikantno različna, čeprav je bila pri bolnicah nekoliko višja (bolnice s seroznim rakom jajčnikov: $77,42 \pm 10,98$ ng/mL; kontrolne preiskovanke: $61,66 \pm 6,81$ ng/mL) (slika 12).

Preverili smo tudi statistično razliko v koncentracijah različnih telesnih tekočin znotraj posameznih skupin. Dokazali smo statistično značilno večjo ($p < 0,001$) koncentracijo sCD44-v6 v serumu ($202,36 \pm 27,32$ ng/mL) kot v peritonealni tekočini ($61,66 \pm 6,81$ ng/mL) pri kontrolnih preiskovankah. Prav tako se je primerjava koncentracije sCD44-v6 v serumu ($118,17 \pm 10,04$ ng/mL) in ascitesu ($77,42 \pm 10,98$ ng/mL) karcinomskih preiskovank, izkazala za statistično različno ($p = 0,014$) (slika 13).

Znižana vrednost sCD44-v6 se nahaja v serumu bolnic z rakom jajčnikov v primerjavi s kontrolno skupino.



Slika 12: Koncentracija sCD44-v6 v serumu kontrolnih preiskovank in bolnic s seroznim rakom jajčnikov ter PT kontrolnih preiskovank in ascitesu bolnic s seroznim rakom jajčnikov. Prikazane so srednje vrednosti $\pm$ SEM (n = 10). **p < 0,01 v primerjavi s kontrolnimi preiskovankami.



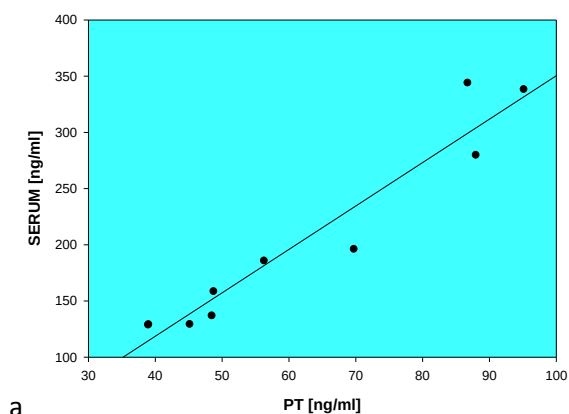
Slika 13: Koncentracija sCD44-v6 v serumu in PT kontrolnih preiskovank ter v serumu in ascitesu bolnic s seroznim rakom jajčnikov. Prikazane so srednje vrednosti $\pm$ SEM (n = 10). ***p < 0,001 v primerjavi s serumom kontrolnih preiskovank. *p = 0,014 v primerjavi s serumom bolnic s seroznim rakom jajčnikov.

5.4 KORELACIJA MED SERUMOM in PERITONEALNO TEKOČINO (PT) oz. ASCITESOM za sCD44-v6

Zanimalo nas je tudi ali je koncentracija sCD44-v6 v serumu odvisna od koncentracije v peritonealni tekočini oz. ascitesu.

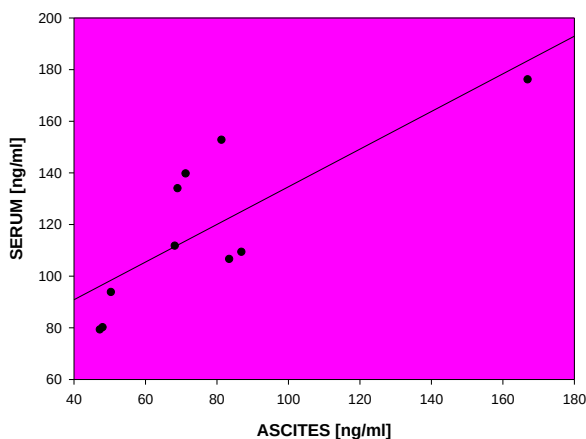
Med spremenljivkama serum in PT pri kontrolni skupini velja pozitivna povezanost ($r = 0,964$), ki je statistično značilna ($P = 0,000007$) (slika 14).

Tudi pri skupini karcinomskih bolnic smo dokazali pozitivno povezanost spremenljivk seruma in ascitesa ($r = 0,797$), ki je statistično značilna ($P = 0,006$) (slika 15).



Slika 14: Pozitivna korelacija koncentracije sCD44-v6 v serumu in PT pri kontrolni skupini.

$r = 0,964$; $P = 0,000007$



Slika 15: Pozitivna korelacija koncentracije sCD44-v6 v serumu in ascitesu pri skupini bolnic s seroznim rakom jajčnikov. $r = 0,797$; $P = 0,00573$

5.5 KONCENTRACIJA OSTEOPONTINA (sOPN) V SERUMU ter PERITONEALNI TEKOČINI (PT) oz. ASCITESU

Z imunokemijsko reakcijo vezave specifičnih protiteles proti OPN na človeški OPN v telesnih tekočinah, smo dokazali merljive koncentracije sOPN tako v serumu in PT kontrolnih preiskovank kot v serumu in ascitesu bolnic z rakom jajčnikov. Povišano koncentracijo sOPN smo določili pri obeh telesnih tekočinah (serum in ascites) bolnic z napredovalo serozno obliko epiteljskega raka jajčnikov v primerjavi s kontrolno skupino.

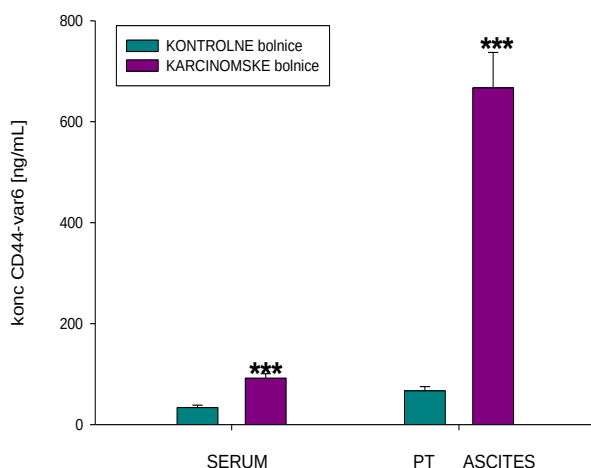
Preiskovanke z napredovalo obliko seroznega epiteljskega raka jajčnikov imajo statistično signifikantno povišano serumsko koncentracijo sOPN v primerjavi s kontrolno skupino ($p < 0,001$). V skupini s seroznim rakom jajčnikov je bila povprečna koncentracija sOPN v serumu $92,00 \pm 8,82$ ng/mL, v skupini kontrolnih preiskovank pa $33,85 \pm 4,60$ ng/mL. Primerjava koncentracij obeh lokalnih tekočin se je prav tako izkazala za statistično signifikantno, in sicer koncentracija sOPN je bila povišana v ascitesu skupine bolnic v primerjavi s peritonealno tekočino kontrolnih preiskovank ($p < 0,001$). Povprečna koncentracija sOPN v ascitesu bolnic je bila $667,23 \pm 70,09$ ng/mL, v peritonealni tekočini kontrolne skupine pa $67,04 \pm 8,32$ ng/mL (slika 16).

Znotraj skupine kontrolnih bolnic je koncentracija sOPN v peritonealni tekočini ($67,04 \pm 8,32$ ng/mL) statistično signifikantno višja ($p = 0,003$) od koncentracije v serumu ($33,85 \pm 4,60$ ng/mL). Znotraj skupine bolnic z rakom jajčnikov pa je koncentracija sOPN v ascitesu ($667,23 \pm 70,09$ ng/mL) signifikantno višja ($p < 0,001$) od koncentracije v serumu ($92,00 \pm 8,82$ ng/mL) (slika 17).

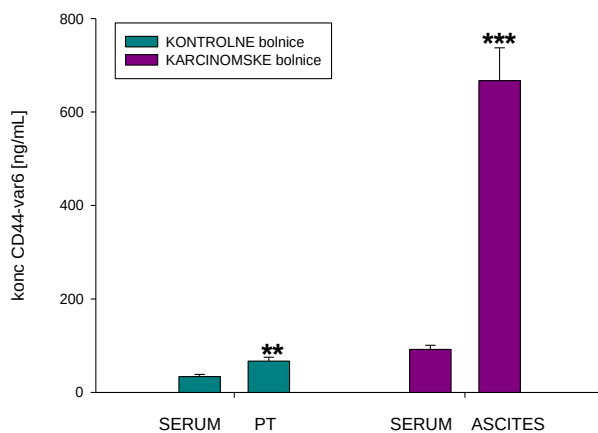
Koncentracija sOPN v ascitesu bolnic z rakom jajčnikov je signifikantno višja kot v serumu obeh, kontrolne skupine ($p = 0,003$) in skupine bolnic z rakom jajčnikov ($p < 0,001$) (slika 16 in 17).

Zanimalo nas je tudi ali je koncentracija sOPN v serumu odvisna od koncentracije v peritonealni tekočini oz. ascitesu, a korelacije nismo dokazali (rezultatov nismo prikazali).

Povišana vrednost sOPN se nahaja v serumu in ascitesu bolnic z rakom jajčnikov v primerjavi s kontrolno skupino.



Slika 16: Koncentracija sOPN v serumu kontrolnih preiskovank in bolnic s seroznim rakom jajčnikov ter peritonealni tekočini kontrolnih preiskovank in ascitesu bolnic s seroznim rakom jajčnikov. Prikazane so srednje vrednosti $\pm$ SEM ($n = 10$). *** $p < 0,001$ v primerjavi s kontrolnimi preiskovankami.



Slika 17: Koncentracija sOPN v serumu in PT kontrolnih preiskovank ter v serumu in ascitesu bolnic s seroznim rakom jajčnikov. Prikazane so srednje vrednosti $\pm$ SEM ($n = 10$). *** $p < 0,001$ v primerjavi s serumom bolnic s seroznim rakom jajčnikov. ** $p = 0,003$ v primerjavi s serumom kontrolnih preiskovank.

5.6 PRIMERJAVA med koncentracijami sCD44-v6 in sOPN

5.6.1 Serum

Serumska koncentracija pri ovarijskem karcinomu je za sCD44-v6 signifikantno znižana, pri sOPN pa signifikantno zvišana v primerjavi s kontrolo (slika 12, 16, 18).

Pri primerjavi obeh biomarkerjev, sCD44-v6 in sOPN v serumu kontrolne in karcinomske skupine, smo pri kontrolni skupini dokazali signifikantno večjo koncentracijo ($p < 0,001$) sCD44-v6 ($202,36 \pm 27,32$ ng/mL) v primerjavi z sOPN ($33,85 \pm 4,60$ ng/mL). Poleg tega je vrednost sCD44-v6 najvišja v serumu kontrolne skupine ($202,36 \pm 27,32$ ng/mL) tudi v primerjavi z obema biomarkerjema v skupini karcinomskih bolnic (sCD44-v6: $118,17 \pm 10,04$ ng/mL; sOPN: $92,00 \pm 8,82$ ng/mL).

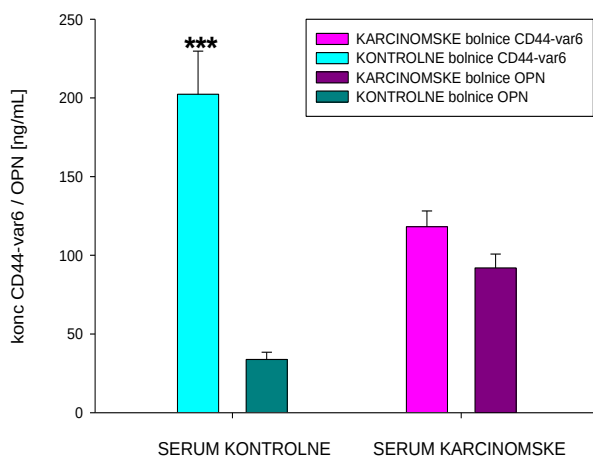
V serumu karcinomskih bolnic med obema biomarkerjem nismo določili statistično signifikantno razlike (slika 18).

5.6.2 PT oz. ascites

Koncentracija v lokalni tekočini pri ovarijskem karcinomu je za sOPN signifikantno zvišana, za sCD44-v6 pa ni razlike v primerjavi s kontrolnimi preiskovankami (slika 12, 16, 19).

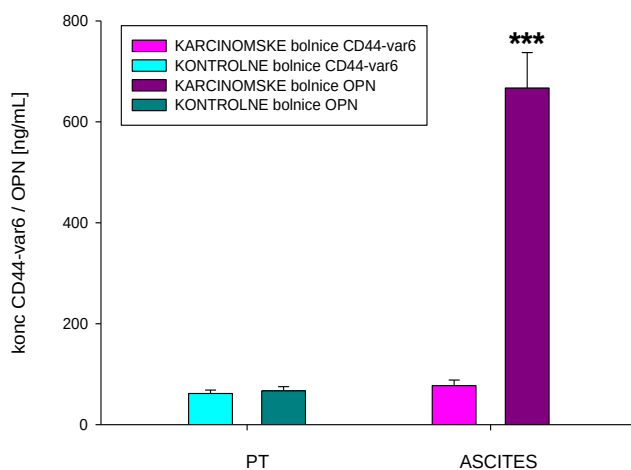
Primerjava biomarkerjev v dveh lokalnih tekočinah, ascitesu pri bolnicah s seroznim rakom jajčnikov in peritonealni tekočini pri kontrolnih bolnicah, izkazuje očitne razlike med posameznima biomarkerjema v skupini karcinomskih bolnic. Statistično signifikantno razliko ($p < 0,001$) izkazuje sOPN v ascitesu karcinomskih bolnic ($667,23 \pm 70,09$ ng/mL) v primerjavi sCD44-v6 v enakem vzorcu ($77,42 \pm 10,98$ ng/mL).

V peritonealni tekočini med obema biomarkerjema nismo določili statistično značilne razlike (slika 19).



Slika 18: Koncentracija sCD44-v6 in sOPN v serumu.

Prikazane so srednje vrednosti $\pm$ SEM (n = 10). ***p<0,001 v primerjavi s serumom kontrolne skupine pri OPN.



Slika 19: Koncentracija sCD44-v6 in sOPN v peritonealni tekočini oz. ascitesu testnih skupin.

Prikazane so srednje vrednosti $\pm$ SEM (n = 10). ***p<0,001 v primerjavi z ascitesom skupine bolnic s seroznim rakom jajčnikov pri CD44-v6.

6. RAZPRAVA

Najpogostejše raka jajčnikov ne odkrijemo, dokler ni v napredovali razvojni obliki, ki vodi do visoke stopnje umrljivosti. Za enkrat še ni uradnih smernic, ki bi priporočale kakršne koli rutinske presejalne teste za populacijo žensk. Raziskave novih biomarkejev ponujajo upanje za razvoj učinkovitega presejalnega sistema za ženske, še preden se pri njih razvijejo simptomi bolezni [60].

Topna adhezijska proteina sCD44-v6 in sOPN, ki smo ju izbrali kot možna kandidata v naboru biomarkerjev epiteljskega raka jajčnikov, se izražata tudi na rakavih celicah jajčnikov in sodelujeta pri razvoju bolezni. V tem diplomskem delu smo želeli določiti predoperativno koncentracijo sCD44-v6 in sOPN v telesnih tekočinah bolnic s seroznim epiteljskim rakom jajčnikov stadija III in IV in jo primerjati s koncentracijo pri kontrolnih preiskovankah, za katere smo izbrali ženske, ki nimajo obolenja jajčnikov in jajcevodov oziroma imajo na teh mestih benigne tumorje. Primerjali smo koncentracije v serumu in v lokalni tekočini (PT oz. ascites). Zanimalo nas je, ali je koncentracija pri bolnicah s seroznim rakom jajčnikov povišana v primerjavi s kontrolnimi preiskovankami, in če obstaja korelacija med koncentracijo v krvi in lokalno tekočino.

Iz predhodnih raziskav smo ugotovili, da je sCD44-v6 merljiv v serumu [30, 31, 32] in ascitesu [29, 30, 61], nismo pa zasledili dostopnih literaturnih podatkov o meritvah v PT. Tudi sami smo ugotovili merljive koncentracije sCD44-v6 tako v serumu in PT kontrolnih preiskovank kot v serumu in ascitesu bolnic s seroznim rakom jajčnikov.

Rezultati naše analize so pokazali, da je bila koncentracija sCD44-v6 v serumu pri skupini bolnic s seroznim rakom jajčnikov v primerjavi s kontrolnimi preiskovankami statistično signifikantno znižana ($p = 0,01$), kar je v skladu z literaturnimi podatki raziskovalne skupine E. Stickelerja s sod. [31], ne pa v skladu s podatki študije Zeimet s sod. [30].

Tako je o znižani serumski koncentraciji sCD44-v6 pri raku jajčnikov v primerjavi z zdravimi ženskami, poročal že E. Stickeler s sod ($p = 0,0001$) [31]. Zeimet s sod. pa ni dokazal statistično signifikantne razlike pri bolnicah z rakom jajčnikov v primerjavi z zdravimi kontrolnimi preiskovankami [30]. V obeh omenjenih študijah so uporabili ELISO kot metodo za kvantitativno analizo vzorcev. V serumu skupine bolnic z napredovalo serozno obliko epiteljskega raka jajčnikov smo določili koncentracijo sCD44-v6 $118,17 \pm 10,04$ ng/mL; medtem ko je pri kontrolni skupini znašala $202,36 \pm 27,32$ ng/mL. Če primerjamo svoje rezultate s študijo, pri kateri so ravno tako ugotovili znižanje serumske koncentracije sCD44-v6, so si pri bolnicah zelo podobni, medtem ko so oni pri zdravih ugotovili malo nižje vrednosti. Določili so povprečno koncentracijo v serumu pri bolnicah 115 ng/mL (območje 75-142 ng/mL), medtem ko je bila pri zdravih 131 ng/mL (območje 108-178 ng/mL) [30].

Gaducci s sod. je določil signifikantno zmanjšano serumsko koncentracijo sCD44-v6 pri napredovalnem stadiju bolezni (stadij III in IV) v primerjavi z zgodnjim stadijem I ($p = 0,001$), vendar študija ni vključevala zdravih preiskovank oz. preiskovank, ki ne bi imele

raka jajčnikov. Ta študija nakazuje da padanje serumske koncentracije biomarkerja med potekom bolezni, pomeni poslabšanje bolezni [32]. Povprečna serumska koncentracija sCD44-v6 pri bolnicah v tej študiji je 86 ng/mL (območje 1-243 ng/mL) [32], kar je primerljivo z našim rezultatom.

V delovni hipotezi smo sicer predvidevali povišane koncentracije sCD44-v6 v serumu bolnic v primerjavi s kontrolnimi preiskovankami, a rezultati kažejo ravno nasprotno. Možna razlaga je, da CD44-v6 aktivno prispeva k razvoju širjenja raka jajčnikov in je tako povečano izražen v začetnih fazah razvoja raka, kasneje pa njegovo izražanje upade [26, 32]. Ta razlaga pa ne pojasni, zakaj je pri ženskah brez raka jajčnikov izražanje CD44-v6 še večje. Pomanjkljivost Gaduccijske študije [32] je, da ni vključevala skupine zdravih žensk, pomanjkljivost naše pa, da nismo imeli skupine bolnic z začetno obliko bolezni. Če se upremo na literaturne podatke o izmerjenih serumskih koncentracijah sCD44-v6 pri raku jajčnikov, pa se rezultati dokaj ujemajo, kljub temu da smo uporabili drugo metodo določevanja. Izbira metode je sicer lahko razlog za drugačno povprečno koncentracijo, manj verjetno pa za drugačen trend.

Pri diplomski nalogi smo želeli ugotoviti kakšna je koncentracija sCD44-v6 v telesni tekočini, bližji izvora raka jajčnikov – ascitesu. Koncentracijo v ascitesu smo primerjali s serumom bolnic s seroznim rakom jajčnikov ter s PT, kot lokalno tekočino kontrolnih preiskovank.

Pri analizi lokalnih tekočin so rezultati naše študije pokazali, da razlika v koncentraciji sCD44-v6 med ascitesom pri bolnicah s seroznim rakom jajčnikov in PT pri kontrolni preiskovankah ni bila signifikantno različna, čeprav je bila pri bolnicah nekoliko višja (bolnice s seroznim rakom jajčnikov: $77,42 \pm 10,98$ ng/mL; kontrolne preiskovanke: $61,66 \pm 6,81$ ng/mL). V literaturi nismo našli študije, kjer bi primerjali koncentracijo sCD44-v6 v ascitesu in PT, zato svojih rezultatov ne moremo neposredno primerjati s podatki iz razpoložljive literature. Našli pa smo dve študiji, kjer so primerjali koncentracijo sCD44-v6 v ascitesu z malignomi in ascitesu, ki je nastal zaradi drugih bolezni. Dong s sod. je dokazal statistično signifikantno višjo koncentracijo sCD44-v6 v malignem (ovarijski) ascitesu v primerjavi z ne-maligim ascitesom (cirozni in tuberkulozni) ($p < 0,01$) [29]. Zelo podobne rezultate raziskav so objavili pri organizaciji CancerResearch in prav tako dokazali signifikantno zvišano koncentracijo sCD44-v6 v ascitesu bolnic z rakom jajčnikov v primerjavi s tuberkuloznim ascitesom ($p < 0,01$) [61].

Povprečna koncentracija sCD44-v6 v ascitesu, ki smo jo določili v naši študiji, je primerljiva z literaturnimi podatki. Dong s sod. je v malignem ascitesu določil povprečno koncentracijo $89,22 \pm 38,20$ ng/mL, medtem ko je pri študiji organizacije CancerResearch znašala 102 ± 31 ng/mL [29, 61]. Pri obeh študijah so uporabili drugo metodo kot v naši študiji, in sicer ELISO.

Ne moremo pa primerjati koncentracij v PT z ascitesom, ki je nastal zaradi drugih bolezni, saj tuberkulozni ali cirozni ascites predstavljata drugo mesto nastanka kot PT. Morda je majhno število preiskovank razlog, da nismo dokazali statistično signifikantne razlike. Glede na to, da nismo dokazali statistično značilne razlike med ascitesom in PT, se poraja

vprašanje, kako specifično je povečanje koncentracije sCD44-v6 v krvi, če lokalno koncentracija ni povišana. Ne smemo pa pozabiti da predstavlja ascites precej večji volumen tekočine kot PT. Po definiciji je ascites peritonealna tekočina katere volumen je višji od 50 mL in je patološki pojav; medtem ko je PT fiziološki pojav in je volumen manjši, in sicer od 50 mL. Povprečni volumen ascitesa je lahko tudi do 5 L [62]. Kar pomeni, da je absolutno količina sCD44-v6 v asitesu lahko tudi 100-krat višja kot v PT.

Primerjali smo tudi obe telesni tekočini znotraj posamezne skupine preiskovank. Dokazali smo statistično značilno večjo ($p < 0,001$) koncentracijo sCD44-v6 v serumu kot v PT pri kontrolnih preiskovankah in prav tako statistično značilno večjo koncentracijo sCD44-v6 v serumu kot ascitesu bolnic s seroznim rakom jajčnikov ($p = 0,014$), kar je v skladu z rezultati iz literature [30]. Zeimet s sod. je primerjal koncentracijo biomarkerja v ascitesu in serumu bolnic s seroznim rakom jajčnikov [30]. V skladu z našo študijo je določil signifikantno nižjo vrednost v ascitesu v primerjavi s serumom bolnic ($p < 0,001$). S pomočjo ELISE je tako določil v serumu povprečno koncentracijo 115 ng/mL (75-142 ng/mL) in v ascitesu 58 ng/mL (39-76 ng/mL) [30].

Zanimalo nas je tudi, ali je koncentracija sCD44-v6 v serumu odvisna od koncentracije v ascitesu oz. peritonealni tekočini. S statističnim parametrom korelacije smo potrdili našo delovno hipotezo ter dokazali, da koncentraciji sCD44-v6 v serumu in ascitesu oz. PT, naraščata skupaj in sta pozitivno povezani. Tovrstnih literaturnih podatkov nismo zasledili.

Torej, sCD44-v6 je lahko potencialni serumski biomarker pri seroznem raku jajčnikov, ne pa specifični biomarker v ascitesu, kot lokalni tekočini bližji izvora raka jajčnikov, čeprav je njegova serumska koncentracija odvisna od koncentracije v ascitesu. Na podlagi naših rezultatov ne vemo, kako zanesljiva bi torej bila diagnoza, postavljena na podlagi koncentracij tega biomarkerja.

Ostaja pa nejasno zakaj je povišana koncentracija sCD44-v6 povezana z malignim ascitesom. Lahko je razlog sposobnost sCD44-v6, ki se nahaja v ascitesu, da se pritrdi na površino peritonealnega mezotelija abdominalne votline in omogoči vezavo rakavih celic [29].

Predhodne raziskave so pokazale, da je sOPN merljiv v serumu [44] in plazmi [40, 42, 43], nismo pa zasledili literaturnih podatkov o meritvah sOPN v peritonealni tekočini oz. ascitesu. Dokazali smo merljive koncentracije sOPN v telesnih tekočinah obeh skupin preiskovank.

Naši rezultati kažejo, da imajo bolnice z napredovalo obliko seroznega epiteljskega raka jajčnikov statistično signifikantno povišano serumsko koncentracijo sOPN v primerjavi s kontrolnimi preiskovankami ($p < 0,001$), kar je v skladu s pričakovano delovno hipotezo. Povišano koncentracijo sOPN v plazmi so ugotovili pri dveh študijah, in sicer sta to študiji Kim s sod. ($p < 0,001$) [42] in Nakae s sod. [43]. Pri obeh je bila kontrolna skupina taka kot naša.

Povprečni koncentraciji sOPN, ki smo ju izmerili v serumu (bolnice: 91,99 ng/mL; kontrolne preiskovanke 33,85 ng/mL) sta v primerjavi s študijo, kjer so merili koncentracijo v plazmi, nižje (Kim s sod.: tumorske bolnice 486,5 ng/mL, zdrave 147,1

ng/mL, preiskovanke z benigno obliko bolezni jajčnikov 254,4 ng/mL) [42]. V tej študiji so merili tudi koncentracijo sOPN v plazmi bolnic z drugimi malignimi obolenji rodil in ugotovili, da je koncentracija podobna koncentraciji pri bolnicah z benigno boleznijo (260,9 ng/mL) [42]. Brakora s sod. pa je v svoji študiji primerjal koncentracijo sOPN pri preiskovankah po operaciji raka jajčnikov (25 – 1463 ng/mL) s koncentracijo pri zdravih preiskovankah (25 – 617 ng/mL) in ugotovil, da med njima ni statistično značilne razlike [44]. Pri tej študiji vidimo, da so vrednosti pri obeh skupinah preiskovank zelo različne. Razlog za nižje koncentracije sOPN po operaciji bi bila lahko tudi uspešna odstranitev tumorskih mas (citoredukcija). John O. Schorge s sod. je po operaciji ugotovil znižano plazemsko koncentracijo sOPN pri 77 % bolnic z rakom jajčnikov v primerjavi s koncentracijo pred operacijo [40]. Dejstvo, da se koncentracija sOPN po operaciji (citoredukciji, odstranitvi jajčnikov) zniža, daje sOPN potencialno vrednost markerja, ki omogoča oceno uspešnosti operativnega zdravljenja [40]. Pri vseh omenjenih študijah so merili koncentracijo sOPN z metodo ELISA.

Po naših podatkih smo v naši študiji prvič merili sOPN v peritonealni tekočini oz. ascitesu. Tako kot pri sCD44 v6 smo želeli ugotoviti, kakšna je koncentracija sOPN v telesni tekočini bližji izvora raka jajčnikov – ascitesu. Ascites smo primerjali s serumom bolnic s seroznim rakom jajčnikov ter s peritonealno tekočino, kot lokalno tekočino kontrolnih preiskovank.

Primerjava med koncentracijama sOPN v obeh lokalnih tekočinah se je izkazala za statistično značilno in sicer je bila koncentracija sOPN v ascitesu v primerjavi s PT kontrolnih bolnic približno 6-krat višja ($p < 0,001$). Znotraj obeh skupin smo v lokalni tekočini ugotovili statistično signifikantno višjo koncentracijo sOPN v primerjavi s serumom. Tako je bila koncentracija sOPN v ascitesu statistično signifikantno višja od koncentracije v serumu bolnic s seroznim rakom jajčnikov ($p < 0,001$), koncentracija sOPN v PT pa je bila statistično značilno višja od koncentracije v serumu kontrolnih preiskovank ($p = 0,003$). Čeprav vloga osteopontina pri raku jajčnikov še ni poznana in osteopontin ni specifičen biomarker za to bolezen, saj se povišane krvne vrednosti te molekule nahajajo pri različnih stanjih in boleznih, menimo, da sOPN kot izključno serumski biomarker pri raku jajčnikov verjetno ni dovolj občutljiv. Ravno nasprotno pa je verjetno zaradi močno povišane koncentracije v ascitesu v primeravi s PT, zanimiv kot biomarker v lokalni tekočini. Povišana koncentracija v lokalni tekočini v primerjavi s sistemsko cirkulacijo, kaže, da je lokalno okolje, bližje izvoru raka bolj značilno za določanje topnih molekul, ki imajo določeno vlogo pri raku jajčnikov, saj se tu kopičijo v znatno večjem obsegu kot v krvnem obtoku. To nam potrjuje tudi ugotovitev, da je koncentracija sOPN v ascitesu bolnic s seroznim rakom jajčnikov značilno višja kot v serumu obeh, kontrolne skupine ($p = 0,003$) in skupine bolnic s seroznim rakom jajčnikov ($p < 0,001$).

Torej, sOPN je kot biomarker dovolj specifičen, da se njegove vrednosti močno razlikujejo med različnimi telesnimi tekočinami, s poudarkom na ascitesu, ki je vidna manifestacija napredovale oblike raka jajčnikov. Vrednost v ascitesu je bila tudi najvišja izmerjena vrednost izmed vseh naših meritev.

Pozitivne korelacije med koncentracijo sOPN v serumu in lokalni tekočini sOPN nismo dokazali. Morda bi na večjem številu preiskovank potrdili naša predvidevanja. V literaturi smo tudi zasledili, da serumska koncentracija sOPN korelira s ponovitvijo bolezni v primerjavi z mirovanjem bolezni ter s prisotnostjo ascitesa [44], vendar tega v svoji študiji nismo preiskovali.

Menimo, da sOPN lahko predstavlja učinkoviti biomarker pri napredovali serozni obliki raka jajčnikov, saj se povišane koncentracije nahajajo tako v serumu kot v ascitesu. Vemo, da so metastaze tesno povezane z vnetno reakcijo, OPN pa s samim vnetjem.

Ali bi sOPN lahko služil kot biomarker zgodnjega odkrivanja raka jajčnikov, ne vemo, ker smo imeli skupino bolnic samo z napredovalo obliko bolezni. Verjetno bi potrebovali nadaljnje raziskave na tem področju.

V diplomskem delu smo se odločili za ovrednotenje dveh biomarkerjev pri raku jajčnikov. Vrednost sCD44-v6 in sOPN kot serumskih biomarkerjev je podobna, pri obeh smo ugotovili statistično značilno razliko med bolnicami s seroznim rakom jajčnikov in kontrolnimi preiskovankami. Res pa je, da je koncentracija sCD44 pri bolnicah znižana, medtem ko je pri sOPN povišana. V prihodnosti bi morali ovrednotiti pomen znižane koncentracije sCD44. Za določanje v lokalni tekočini ima prednost sOPN. V tem primeru gre za veliko razliko, saj je bila koncentracija sOPN v ascitesu močno povišana, medtem ko pri koncentraciji sCD44 nismo ugotovili značilne razlike med ascitesom in PT. Po drugi strani pa smo dokazali pozitivno korelacijo med serumom in lokalno tekočino za sCD44, ne pa tudi za sOPN. Na osnovi svojih ugotovitev menimo, da je sOPN boljši biomarker za napredovalo serozno obliko raka jajčnikov kot sCD44.

Ugotovili smo tudi, da je pretočna citometrija na osnovi fluorescentnih kroglic primerna metoda za kvantifikacijo sCD44-v6 in sOPN z visoko produktivnostjo in merljivostjo koncentracij v širokem koncentracijskem območju. To je zelo ugodno predvsem za začetne raziskave, čeprav je za kasnejše, natančnejše študije potrebno optimizirati pogoje metode.

7. SKLEP

V diplomskem delu smo želeli določiti koncentracijo sCD44-v6 in sOPN v serumu pred operacijo ter v ascitesu bolnic s seroznim epitelijskim rakom jajčnikov stadija III in IV in jo primerjati s koncentracijo pri kontrolnih preiskovankah, ki so jih v naši študiji predstavljale ženske brez obolenj na jajčnikih in jajcevodih oziroma so imele na teh mestih benigne tumorje. Naši rezultati pa so osvetlili prednosti in omejitve sCD44-v6 in sOPN kot potencialnih biomarkerjev pri raku jajčnikov.

Na tem področju je bilo opravljeno že veliko raziskav, vendar se rutinsko uporablja večinoma le en biomarker, to je CA-125, ki pa ima več pomankljivosti. Zato smo želeli sistematično ovrednotiti dva potencialna nova biomarkerja, in sicer sCD44-v6 in sOPN. Zato ju nismo določali le v krvi – kjer je lahko izvor druga bolezen vključno s katerimkoli rakom v telesu, ampak tudi v ascitesu, ki je bližje izvoru raka jajčnikov. Pri preučevanju potencialnih novih biomarkerjev se moramo zavedati tudi dejstva, da se rak jajčnikov redko širi s krvjo. Izbira markerja, ki bi nam ponudil odgovor na zastavljeno vprašanje, ni enostavna. Veliko jih je obsojenih na enako zgodbo: obetajo občutljivost in specifičnost, nato pa izzvenijo na poti do klinične uporabe. Omejitve, na primer število bolnic, validacija potencialnega biomarkerja na vzorcih pred postavitvijo diagnoze, majhna specifičnost, zmožnost razlikovanja med zdravimi in obolelimi, kvantitativna detekcija; so zagotovo tista področja, ki zahtevajo dodatna raziskovanja.

Potrdili smo tri; delno ovrgli eno in ovrgli eno izmed zastavljenih hipotez.

- Oba markerja, sCD44-v6 in sOPN sta v merljivih koncentracijah prisotna v serumu, peritonealni tekočini in ascitesu preiskovank.
- Koncentracija sCD44-v6 v serumu pri bolnicah s seroznim ovarijskim karcinomom ni povišana v primerjavi s serumom kontrolne skupine, temveč statistično značilno znižana; razlika v koncentraciji sCD44-v6 med ascitesom pri bolnicah s seroznim rakom jajčnikov in PT pri kontrolni preiskovankah ni bila značilno različna, čeprav je bila pri bolnicah s seroznim rakom jajčnikov nekoliko višja.
- Koncentracija sOPN je v serumu in ascitesu pri bolnicah s seroznim ovarijskim karcinomom povišana v primerjavi s serumom in PT kontrolnih preiskovank.
- Prisotna je pozitivna korelacija med koncentracijo sCD44-v6 v serumu in ascitesu bolnic s seroznim ovarijskim karcinomom ter med koncentracijo sCD44-v6 v serumu in PT kontrolnih preiskovank.
- Pozitivne korelacije med koncentracijami sOPN nismo dokazali.

Glavne ugotovitve naše študije so, da je vrednost sCD44 kot biomarkerja za odkrivanje bolezni raka jajčnikov vprašljiva, med tem ko se je sOPN izkazal kot obetajoči biomarker pri napredovali serozni obliki raka jajčnikov tako za določanje v krvi pred operacijo kot v lokalni tekočini.

Če želimo podaljšati življenjsko dobo bolnic, so na tem področju potrebna dodatna raziskovanja, ki bodo doprinesla k bolj učinkoviti diagnostiki in/ali terapiji. Vredna razmisleka se nam zdi tudi ugotovitev M. Chechlinske, da bi vse potencialne tumorske biomarkerje morali validirati glede na njihovo izražanje pri vnetnih odzivih [63]. Tako bi jim določili od vnetja neodvisno napovedno vrednost. Obstaja namreč začaran krog: vnetje spodbuja razvoj in napredovanje tumorja, medtem ko razvoj in napredovanje tumorja inducira vnetje. Zatorej bi moralo biti sistemsko vnetje kot spremenljivka vključeno v študije tumorskih biomarkerjev [63].

Morda bi se morala stroka ustaviti, stopiti korak nazaj in pogledati kritične točke, na katerih ji spodleti. Kompleksnost študije in sistematično vodenje vseh procesnih spremenljivk, je po našem mnenju odgovor na uspešnost raziskave, ne pa odkrivanje poplave novih biomarkerjev. Če se dotaknemo naše študije, je vsekakor na prvem mestu potrebno povečati število bolnic. Druga stvar, ki se nam zdi zelo pomembna, pa je, da bi morali v študijo vključiti spremljanje bolnic po zdravljenju. To dvoje bi zagotovo pripomoglo k boljšemu ovrednotenju sCD44-v6 in sOPN kot prognostičnih biomarkerjev. Za odkrivanje bolezni pa bi morali v raziskavo vključiti tudi bolnice v zgodnjem stadiju raka jajčnikov.

VIRI IN LITERATURA

- [1] Rak v Sloveniji 2008. Ljubljana: Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije, 2011.
- [2] P. Boyle, B. Levin, International Agency for Research on Cancer, and World Health Organization, World cancer report 2008. WHO Press, Geneva, 2008.
- [3] K. Černe, B. Kobal, Implications of microvesicle and cell surface protein shedding for biomarker studies, cancerogenesis and therapeutic target discovery in ovarian cancer, 2012.
- [4] Onkološki inštitut v Ljubljani, Univerzitetna ginekološka klinika v Ljubljani, Ginekološki malignomi, Doktrina zdravljenja ginekoloških malignomov na Onkološkem inštitutu in Univerzitetni ginekološki kliniki, Tretja revidirana izdaja, Ljubljana 2002.
- [5] C. M. Coticchia, J. Yang in M.A. Moses, Ovarian cancer biomarkers: Current options and future promise, J. Natl. Compr. Cancer Netw. 6 (2008) 795-802.
- [6] http://www.onkologija.si/portal/onco-slov/rak_jajcnikov_
- [7] C. Kuk, V. Kulasingam, C.G. Gunawardana, C.R. Smith, I. Batruch, and E.P. Diamandis, Mining the ovarian cancer ascites proteome for potential ovarian cancer biomarkers, Amerc. S. Biol. and Molec. Biol. (2009) 661-9.
- [8] E. Lengyel, Ovarian Cancer Development and Metastasis, Am. J. Pathol. 177 (2010) 1053-64.
- [9] M.L. Puiffe, C. Le Page, A. Filali-Mouhim, M. Zietarska, V. Ouellet, P.N. Tonin, M. Chevrette, D.M. Provencher, and A.M. Mes-Masson, Characterization of ovarian cancer ascites on cell invasion, proliferation, spheroid formation, and gene expression in an in vitro model of epithelial ovarian cancer, Neoplasia 9 (2007) 820-9.
- [10] N. Tsuruchi, T. Kamura, N. Tsukamoto, K. Akazawa, T. Saito, T. Kaku, N. To, and H. Nakano, Relationship between paraaortic lymph node involvement and intraperitoneal spread in patients with ovarian cancer – a multivariate analysis, Gynecol. Onco. 49 (1993) 51-5.
- [11] D.S. Tan, R. Agarwal, and S.B. Kaye, Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer, Lancet. Oncol. 7 (2006) 925-34.
- [12] A. McGibbon, G.I. Chen, K.M. Peltekian, S. Veldhuyzen van Zanten, An evidence-based manual for abdominal paracentesis, Dig. Dis. Sci 52 (2007) 3307-15.
- [13] M. Rieppi, V. Vergani, C. Gatto, G. Zanetta, P. Allavena, G. Taraboletti, and R. Giavazzi, Mesothelial cells induce the motility of human ovarian carcinoma cells, Int. J. Cancer 80 (1999) 303-7.
- [14] R. Mayeux, Biomarkers: Potential Uses and Limitations, The American Society for Experimental NeuroTherapeutics, Inc. 1 (2004) 182-8.
- [15] P. Pogačnik, A. Pavšič, Biomarkerji, seminarska naloga pri predmetu Toksikološka kemija, FFA, 2005/2006.
- [16] U. Menon and I.J. Jacobs, Ovarian cancer screening in the general population, Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 13 (2001) 61-4.
- [17] Z. Yurkovetsky, S. Skates, A. Lomakin, B. Nolen, T. Pulsipher, F. Modugno, J.

- Marks, A. Godwin, E. Gorelik, I. Jacobs, U. Menon, K. Lu, D. Badgwell, R.C. Bast, Jr., and A.E. Lokshin, Development of a multimarker assay for early detection of ovarian cancer, *J. Clin. Oncol.* 28 2159-66.
- [18] R.G. Moore, A.K. Brown, M.C. Miller, S. Skates, W.J. Allard, T. Verch, M. Steinhoff, G. Messerlian, P. DiSilvestro, C.O. Granai, and R.C. Bast, Jr., The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass, *Gynecol. Oncol.* 108 (2008) 402-8.
- [19] B. Zhang, F.F. Cai, X.Y. Zhong, An overview of biomarkers for the ovarian cancer diagnosis, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 158 (2011) 119-23.
- [20] N.M. Hooper, E.H. Karran, and A.J. Turner, Membrane protein secretases, *Biochem. J.* 321 (Pt2) (1997) 265-79.
- [21] E. Pap, The role of microvesicles in malignancies, *Adv. Exp. Med. Biol.* 714 183-99.
- [22] A. Stoeck, S. Keller, S. Riedle, M.P. Sanderson, S. Runz, F. Le Naour, P. Gutwein, A. Ludwig, E. Rubinstein, and P. Altevogt, A role of exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44, *Biochem. J.* 393 (2006) 609-18.
- [23] B. He, M. Mirza, and G.F. Weber, An osteopontin splice variant induces anchorage independence in human breast cancer cells, *Nature Publishing Group Oncogene* 25 (2006) 2192-202.
- [24] J. Sodek, B. Ganss and M.D. McKee, Osteopontin, *CROBM* 11 (2000) 279-303.
- [25] H. Ponta, D. Wainwright, P. Herrlich, The CD44 protein family, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 30 (1998) 299-305.
- [26] S. Sillanpää, M.A. Anttila, K. Voutilainen, R. H. Tammi, M.I. Tammi, S.V. Saarikoski, and V. Kosma, CD44 expression indicates favorable prognosis in epithelial ovarian cancer, *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 5318-24.
- [27] Human CD44var (v6) Flowcytomix simplex kit BMS80210FF, Product information and manual, eBioscience.
- [28] M.P. Ween, M.K. Oehler, and C. Ricciardelli, Role of versican, hyaluronan and CD44 in ovarian cancer metastasis, *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 1009-29.
- [29] W. Dong, X. Sun, B. Yu, H. Luo, J. Yu, role of VEGF and CD44v6 in differentiating benign from malignant ascites, *World J. Gastroenterol.* 9 (2003) 2596-2600.
- [30] A.G. Zeimet, M. Widschwendter, M. Uhl-Steidl, E. Müller-Holzner, G. Daxenbichler, C. Marth, O. Dapunt, High serum levels of soluble CD44 variant isoform v5 are associated with favourable clinical outcome in ovarian cancer, Abstract
- [31] E. Stickeler, F.D. Vogl, T. Denking, V.J. Mobus, R. Kreienberg, I.B. Runnebaum, Soluble CD44 splice variants and pelvic lymph node metastasis in ovarian cancer patients, Abstract
- [32] A. Gadducci, M. Ferdeghini, A. Fanucchi, C. Annicchiarico, S. Cosio, C. Prontera, R. Bianchi, and A.R. Genazzini, Serum assay of soluble CD44 standard (sCD44-st), CD44 splice variant v5 (sCD44-v5), and CD44 splice variant v6 (sCD44-v6) in patients with epithelial ovarian cancer, *Anticancer Res.* 17 (1997) 4463-6.
- [33] Human Osteopontin Flowcytomix simplex kit BMS82066FF, Product information

and manual, eBioscience.

- [34] Å. Oldberg, A. Franzén, and D. Heinegård, Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 8819-23.
- [35] SR Rittling, and AF Chambers, Role of osteopontin in tumor progression, *British J. Cancer* 90 (2004) 1877-81.
- [36] R. Zhang, X. Pan, Z. Huang, G.F. Weber, G. Zhang, Osteopontin enhances the expression and activity of MMP-2 via the SDF-1/CXCR4 axis in hepatocellular carcinoma cell lines, *PLoS ONE* 6 (2011).
- [37] H. Kim, H. Lee, J. Jun, Y. Oh, S. Choi, H. Kim, C. Chung, I. Kim, I. Park, H. Chae, H. Kim, and Y. Jung, Intracellular cleavage of osteopontin by caspase-8 modulates hypoxia/reoxygenation cell death through p53, *PNAS* (2009).
- [38] G. Song, Q. Cai, Y. Mao, Y. Ming, S. Bao, and G. Ouyang, Osteopontin promotes ovarian cancer progression and cell survival and increases HIF-1 α expression through the PI3-K/Akt pathway, *Japanese Cancer Assoc. Cancer Sci* 99 (2008) 1901-7.
- [39] K.K. Wong, R.S. Cheng, S.C. Mok, Identification of differentially expressed genes from ovarian cancer cells by MICROMAX cDNA microarray system, *Biotechniques* 30 (2001) 670-5.
- [40] J.O. Schorge, R.D. Drake, H. Lee *et al.*, Osteopontin as an adjunct to CA125 in detecting recurrent ovarian cancer, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 3474-8.
- [41] I. Visintin, Z. Feng, G. Longton *et al.*, Diagnostic markers of early detection of ovarian cancer, *Clin. Cancer Res* 14 (2008) 1065-72.
- [42] J. Kim, S.J. Skates, T. Ueda, K. Wong, J.O. Schorge, C.M. Feltmate, R.S. Berkowitz, D.W. Cramer, S.C. Mok, Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer, *Amer. Med. Association* 287 (2002) 1671-9.
- [43] M. Nakae, I. Iwamoto, T. Fujino *et al.*, Preoperative plasma osteopontin level as a biomarker complementary to carbohydrate antigen 125 in predicting ovarian cancer, *Journal of Obstetrics and Gynecol. Res.* 32 (2006) 309–14.
- [44] K. A. Brakora, H. Lee, R. Yusuf *et al.*, Utility of osteopontin as a biomarker in recurrent epithelial ovarian cancer, *Gynecol. Oncol.* 93 (2004) 361–5.
- [45] B.J.D. Rein, S. Gupta, R. Dada, J. Safi, C. Michener, and A. Agarwal, Potential markers for detection and monitoring of ovarian cancer, *J. Oncol.* 2011 (2011).
- [46] N. Colombo, M. Peiretti, G. Parma, M. Lapresa, R. Mancari, S. Carinelli, C. Sessa, and M. Castiglione, Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, *An. Onco.* 21 (2010) v23-v30.
- [47] R. Kalachand, B. T. Hennessy, and M. Markman, Molecular targeted therapy in ovarian cancer, What is on the horizon? *Drugs* 71 (2011) 947-967.
- [48] R.C. Casey, K.A. Koch, T.R. Oegema Jr., K.M. Skubitz, S.E. Pambuccian, S.M. Grindle, A.P. Skubitz, Establishment of an *in vitro* assay to measure the invasion of ovarian carcinoma cells through mesothelial cell monolayers, *Clin. Exp. Metastasis* 20 (2003) 343-56.

- [49] T. Strobel, L. Swanson, S.A. Cannistra, *In vivo* inhibition of –cd44 limits intra-abdominal spread of a human ovarian cancer xenograft in nude mice: a novel role for CD44 in the process of peritoneal implantation, *Cancer Res.* 57 (1997) 1228-32.
- [50] V. Orian-Rousseau, CD44, a therapeutic target for metastasising tumors, *Eur. J. Cancer* 46 (2010) Abstract.
- [51] Ångstrom Pharmaceuticals, Inc. Ångstrom Pharmaceuticals drug development programs; www.angstrominc.com/drug_development.html
- [52] <http://news.healingwell.com/index.php?p=news1&id=524520>
- [53] Wikipedija: Pretočna citometrija;
http://sl.wikipedia.org/wiki/Preto%C4%8Dna_citometrija
- [54] <http://flowbook.denovosoftware.com>
- [55] www.abcam.com/technical
- [56] J. Trček, Mikrovezikli kot pokazatelji vnetnega in koagulantnega odziva človeških endotelijskih celic koronarnih arterij na serumski amiloid A, diplomsko delo (2011).
- [57] Quanta™ SC MPL Training Guide, Beckman Coulter, Revision 2, 2008.
- [58] Human Basic Kit FlowCytomix, Multiple Analyte Detection, eBioscience.
- [59] Immunoassay Product Guide, aBioscience.
- [60] B. Stordal, and J. O'Leary, Biomarkers in ovarian cancer: Early detection and chemoresistance, *N. I. Cell. Biol.*, Dublin city university, Ireland; published online 2011.
- [61] *Cancer Res.*, Clinical values of detecting soluble CD44v6 and VEGF in differentiate tuberculous ascites and ascites in ovarian cancer; Abstract.
(<http://www.rescancer.com/cancer-letters/50904.html>)
- [62] W.H. Gotlieb, B. Feldman, O. Feldman-Moran, N. Zmira, D. Kreizer, Y. Segal, E. Elran, G. Ben-Baruch, Intraperitoneal pressures and clinical parameters of total paracentesis for palliation of symptomatic ascites in ovarian cancer, *Gynecol. Oncol.* 71 (1998) 381-5.
- [63] M. Chechlinska, M. Kowalewska, R. Nowak, systemic inflammation as a confounding factor in cancer biomarker discovery and validation, *Nat. Rev. Cancer* 10 (2010) 2-3.