

## ΝΕΟΙ ΕΙΔΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΡΩΙΜΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

Δανηλίδης Άγγελος<sup>1</sup>, Καραγιάννης Βασίλειος<sup>2</sup>

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σήμερα τα επίπεδα στον ορό του αντιγόνου CA<sub>125</sub> θεωρούνται ως ο πιο αξιόπιστος καρκινικός δείκτης για τις ωοθήκες. Δυστυχώς, η χρησιμότητα του CA<sub>125</sub> σαν δείκτη για πρώιμη διάγνωση περιορίζεται από το ότι λιγότερο του 50% των ωοθηκικών καρκίνων συνοδεύονται από ανιχνεύσιμα επίπεδα του CA<sub>125</sub>. Υπάρχουν χιλιάδες πρωτεΐνες που παράγονται από όλα τα κύτταρα. Η μεγαλύτερη πρόκληση για τους ογκολόγους είναι να προσδιορίσουν ποιες πρωτεΐνες εκφράζονται μόνο από τα καρκινικά κύτταρα. Αυτές που υπερεκφράζονται από αυτά και απελευθερώνονται στην κυκλοφορία, αποτελούν τους ιδανικούς δείκτες για την πρώιμη διάγνωση του καρκίνου, εάν φυσικά μπορεί να μετρηθούν. Η μικροακτινική τεχνολογία επιτρέπει την ταχεία προκαταρκτική έρευνα των επιπέδων χιλιάδων εκφραζόμενων πρωτεϊνών. Τα τελευταία 5 χρόνια αρκετοί ερευνητές έχουν δημοσιεύσει ενδιαφέροντα αποτελέσματα από αναλύσεις δειγμάτων ωοθηκικών καρκίνων με μικροακτινικές μεθόδους. Ιδιαίτερου ενδιαφέροντος ήταν οι εκκριτικές πρωτεΐνες προστασίνη και οστεοποντίνη, γιατί αυτές είναι ανιχνεύσιμες στον ορό και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν δείκτες του όγκου. Πρωτεομική τεχνολογία είναι η μελέτη του πρωτεϊνικού περιβάλλοντος ή πρωτεόματος ενός πληθυσμού κυττάρων. Οι τεχνολογίες πρωτεόματος έχουν σαν στόχο να αναγνωρίσουν τις αλλαγές που συμβαίνουν σε πρωτεϊνικό επίπεδο κατά την εμφάνιση της βλάβης. Η διαδιάστατη ηλεκτροφόρηση σε πηκτή είναι πρόδρομος της πρωτεομικής τεχνολογίας, που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών από το 1975. Η τεχνική ιονισμού της κυτταρικής επιφάνειας με λέιζερ (SELDI) είναι μία τεχνική που έχει αναπτυχθεί πρόσφατα για τη μελέτη του καρκίνου των ωοθηκών. Με αυτή την τεχνική επιτυγχάνεται απομόνωση της πρωτεΐνης σε ειδικό τσιπ, με βάση το φορτίο, την υδροφιλία και άλλα χαρακτηριστικά. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες επεξεργάζονται με ιονισμό με λέιζερ. Οι πρόσφατες μικροακτινικές και πρωτεομικές τεχνικές υπόσχονται νέα δεδομένα για την εύρεση πιθανών δεικτών για πρώιμη διάγνωση ωοθηκικού καρκίνου. Σίγουρα απαιτείται περαιτέρω επίπονη και χρονοβόρα έρευνα.

*Όροι ευρετηρίου: αντιγόνο CA<sub>125</sub>, μικροακτινική τεχνολογία, προστασίνη, οστεοποντίνη, πρωτεομική τεχνολογία, τεχνική SELDI.*

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Λιγότερο από το 30% των καρκίνων των ωοθηκών ανακαλύπτονται όταν η πάθηση περιορίζεται στη μία μόνο ωοθήκη. Δυστυχώς, η πλειονότητα αυτών των ασθενών αναγνωρίζεται όταν η ασθένεια είναι προχωρημένη, με μικρές πιθανότητες θεραπείας. Ο στόχος της ανάπτυξης μιας αξιόπιστης μεθόδου προληπτικού ελέγχου για καρκίνο των ωοθηκών είναι η διάγνωση του καρκίνου πριν την επέκτασή του πέραν της ωοθήκης.

Σήμερα τα επίπεδα στον ορό του αντιγόνου CA<sub>125</sub> θεωρείται ως ο πιο αξιόπιστος καρκινικός δείκτης για τις ωοθήκες. Παρόλο που αυτή η πρωτεΐνη αναγνωρίστηκε 20 χρόνια πριν, η δομή και λειτουργία της δεν είναι ακόμη ξεκάθαρη<sup>1,2</sup>. Το αντιγόνο CA<sub>125</sub> δεν εκφράζεται από το φυσιολογικό ωοθηκικό επιθήλιο, αλλά παράγεται από την πλειονότητα των προχωρημένων επιθηλιακών ορσών ωοθηκικών όγκων και από μερικούς βλεννώδεις καρκίνους. Δυστυχώς, η χρησιμότητα του CA<sub>125</sub> σαν δείκτη για πρώιμη διάγνωση περιορίζεται από το ότι λιγότερο του 50% των ωοθηκικών καρκίνων συνοδεύονται από ανιχνεύσιμα επίπεδα του CA<sub>125</sub>.

Τα πρωτόκολλα πρώιμης διάγνωσης του καρκίνου των ωοθηκών συνήθως περιέχουν συνδυασμό υπερήχων και επιπέδων του CA<sub>125</sub> στον ορό. Ακόμη όμως και σε πληθυσμούς υψηλού κινδύνου, η ευαισθησία αυτών των πρωτοκόλλων υπήρξε μειωμένη<sup>3</sup>. Η μεγαλύτερη μέχρι σήμερα τυχαίοποιημένη μελέτη, όπου συμμετείχαν περισσότερες από 20.000 γυναίκες, έδειξε βελτίωση του ποσοστού επιβίωσης στις γυναίκες που ανέπτυξαν καρκίνο

των ωοθηκών. Εντούτοις, οι καρκίνοι δεν διαγνώστηκαν σε πρώιμο στάδιο και οι δείκτες θνησιμότητας δεν ήταν σημαντικά διαφορετικοί μεταξύ των γυναικών που συμμετείχαν στον προληπτικό έλεγχο και των γυναικών που δεν έγινε προληπτικός έλεγχος με υπέρηχο και CA<sub>125</sub>. Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναγνωρισθεί και μελετηθεί διάφοροι δείκτες στον ορό και έχουν χρησιμοποιηθεί σαν επικουρικοί στο CA<sub>125</sub> δείκτες για προληπτικό έλεγχο. Δυστυχώς, αυτοί οι δείκτες, συμπεριλαμβανομένων του CA 19-9 και του λυσοφωσφατιδικού οξέος, δεν φάνηκε να είναι κλινικά σημαντικοί σε μεγάλες μελέτες<sup>5,6</sup>. Εντούτοις, υπάρχουν χιλιάδες πρωτεΐνες που παράγονται από όλα τα κύτταρα και η μεγαλύτερη πρόκληση για τους ογκολόγους είναι να προσδιορίσουν ποιες από αυτές εκφράζονται μόνο από τα καρκινικά. Εκείνες που υπερεκφράζονται από τα καρκινικά κύτταρα και απελευθερώνονται στην κυκλοφορία, αποτελούν τους ιδανικούς δείκτες για την πρώιμη διάγνωση του καρκίνου, εάν φυσικά μπορεί να μετρηθούν.

Μερικές παραδοσιακές τεχνικές μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση πρωτεϊνικών δεικτών που εκφράζονται διαφορετικά. Για παράδειγμα, η ανοσοϊστοχημική εξέταση περιλαμβάνει την έκθεση του παθολογικού πλακιδίου σε ένα αντίσωμα έναντι συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται το μικροσκόπιο για την καταμέτρηση των κυττάρων που αλλάζουν χρώμα από το αντίσωμα. Η ανάλυση Western blot χρησιμοποιεί αντισώματα για τον ποσοτικό προσδιορισμό της πρωτεΐνης που είναι παρούσα στο δείγμα του ιστού. Τέλος, η real-time αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) μετράει την έκφραση της πρωτεΐνης με ποσοτικό προσδιορισμό του DNA ή του m-RNA που υπάρχει στο δείγμα.

Αυτές οι καλά διαμορφωμένες τεχνικές είναι χρήσιμα εργαλεία, αλλά επιτρέπουν τη μελέτη μόνο μιας πρωτεΐνης σε κάθε περίπτωση. Η παραδοσιακή μέθοδος για αναγνώριση καινούριων αντιγόνων-καρκινικών δεικτών, είναι η πρόκληση της παραγωγής των μονοκλωνικών αυτών αντισωμάτων σε ποντίκια, στα οποία έχει γίνει επώαση καρκινικών κυττάρων.

Ο στόχος αυτής της εργασίας είναι η περιγραφή των πιο σύγχρονων τεχνικών για μελέτη των πρωτεϊνών που παράγονται από καρκινικά κύτταρα. Οι μικροακτινικές και πρωτεομικές μελέτες χρησιμοποιούνται ήδη ευρέως στην εκτίμηση πολλών καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου των ωοθηκών. Υπάρχει η ελπίδα πως αυτές οι τεχνικές θα διευκολύνουν την ανακάλυψη των κατάλληλων δεικτών στον ορό, οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρώιμη διάγνωση του καρκίνου των ωοθηκών είτε από μόνοι τους, είτε σε συνδυασμό με πολλαπλούς δείκτες.

#### *Μικροακτινική τεχνολογία-Microarray Technology*

Η μικροακτινική τεχνολογία επιτρέπει την ταχεία προκαταρκτική έρευνα των επιπέδων των εκφραζόμενων χιλιάδων πρωτεϊνών. Η διαδικασία ξεκινάει με πλακίδιο μικροσκοπίου που περιέχει τα στοιχεία του συμπληρωματικού DNA ή ολιγονουκλεοτίδια. Χιλιάδες στοιχεία του DNA μπορούν να τοποθετηθούν σε ένα ειδικό πλακίδιο που ονομάζεται μικροτσίπ. Τα τμήματα του DNA επιλέγονται για να αντιπροσωπεύσουν τις πρωτεΐνες που μας ενδιαφέρουν στον υπό μελέτη ιστό. Η έκφραση των τμηματικών ακολουθιών (ESTs) είναι σειρές DNA που χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση μεταφρασμένων περιοχών των ακολουθιών του γεννητικού υλικού και τοποθετούνται επίσης στα μικροτσίπ. Ένα μικροτσίπ για καρκίνο των ωοθηκών, πρέπει να περιέχει στοιχεία DNA που ταιριάζουν με τις υπό ενδιαφέρον πρωτεΐνες του ορμονικού μεταβολισμού, όπως και με πρωτεΐνες της καρκινογένεσης. Το μικροτσίπ χρησιμοποιείται για έλεγχο-screening του καρκινικού δείγματος. Απαιτείται ένα καθαρό δείγμα 5-10.000 καρκινικών κυττάρων. Αυτό το δείγμα μπορεί να ληφθεί μετά από καλλιέργεια των καρκινικών κυττάρων, ή από ένα παθολογικό δείγμα, χρησιμοποιώντας μικροδιατομή με λέιζερ και κατακράτηση. Το RNA απελευθερώνεται από τα κύτταρα και πολλαπλασιάζεται εάν αυτό είναι απαραίτητο. Στη συνέχεια το RNA στιγματίζεται άμεσα ή έμμεσα με χρωστικές φλουροσκεΐνης. Ακολουθεί υβριδισμός του RNA στα στοιχεία του DNA στο μικροτσίπ. Οι περιοχές που υπερεκφράζονται αναγνωρίζονται με βάση τη φλουροσκεΐνη ενός «φυσιολογικού» δείγματος σε σύγκριση με το δείγμα του όγκου.

#### *Μικροακτινικές μέθοδοι ελέγχου-screening και καρκίνος των ωοθηκών*

Τα τελευταία 5 χρόνια αρκετοί ερευνητές έχουν δημοσιεύσει ενδιαφέροντα αποτελέσματα από αναλύσεις με μικροακτινικές μεθόδους δειγμάτων ωοθηκικών καρκίνων<sup>7</sup>. Για παράδειγμα το Δεκέμβριο του 2000, ο Ismail και συν<sup>8</sup> από το UCLA παρουσίασαν μελέτη 864 στοιχείων DNA που ελέγχθηκαν για 10 σειρές ωοθηκικών καρκινικών κυττάρων και πέντε φυσιολογικές επιθηλιακές κυτταρικές σειρές. Αναγνώρισαν 255 γονίδια με διαφορετική έκφραση το καθένα. Πολλά από αυτά τα γονίδια αποκωδικοποιούσαν αντιγόνα της κυτταρικής μεμβράνης ή εκκρινόμενες πρωτεΐνες που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν δείκτες-markers. Παρόμοια μελέτη δημοσιεύθηκε το 2002 από τους Matei και συν<sup>9</sup> από το UCLA. Στη μελέτη τους χρησιμοποίησαν ένα τσιπ 12.600 στοιχείων για τον έλεγχο καλλιέργειών από 21 ωοθηκικά καρκινώματα και 9 φυσιολογικές ωοθήκες. Ένα σύνολο 111 γονιδίων

υπερεκφράστηκαν στα καρκινικά κύτταρα. Και οι δύο μελέτες εκτίμησαν τα καλλιέργημένα καρκινικά κύτταρα, κάτι που μπορεί να μην συμβαδίζει με τους in-vivo καρκίνους, επειδή μπορεί να συμβούν αλλαγές έκφρασης δευτερογενών γονιδίων in-vitro, σαν συνέπεια των συνθηκών καλλιέργειας.

Για να αποφευχθούν τυχόν ψευδή αποτελέσματα artefacts στις in-vitro καλλιέργειες, κάποιιοι μελετητές επέλεξαν να μελετήσουν το RNA που προέρχεται απευθείας από τον αφαιρούμενο όγκο. Για παράδειγμα, σε μια έρευνα που δημοσιεύθηκε τον Αύγουστο του 2001 από τους Schridhar και συν<sup>10</sup> από τη MayoClinics, μελέτησαν 18.000 στοιχεία DNA χρησιμοποιώντας RNA από 21 πρώιμοι σταδίου και 17 προχωρημένου σταδίου καρκίνων των ωθηκών. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν διαφορές μεταξύ των καρκίνων των πρώιμων και προχωρημένων σταδίων. Το συμπέρασμα είναι πως η περαιτέρω μελέτη των πρωτεϊνών που φαίνεται να υπερεκφράζονται στα πρώιμα στάδια καρκίνου των ωθηκών, μπορούν να αποτελέσουν καλό σημείο για έρευνα για δείκτες ώστε να επιτευχθεί η πρώιμη διάγνωση.

Το Μάιο του 2002, οι Sawiris και συν<sup>11</sup> από το Εθνικό Ινστιτούτο Γήρανσης των ΗΠΑ παρουσίασαν μία ειδική μικροσυσκευή 516 στοιχείων το "Ovachip" για τον καρκίνο των ωθηκών. Βρήκαν πως "screening" με το "Ovachip" παρέχει διαφορετικές εκφράσεις πρωτεϊνών ανάμεσα σε δείγματα ωθηκικού καρκίνου και καρκίνου του παχέος εντέρου. Αυτό το γεγονός υποδεικνύει πως δείκτες-markers που διαχωρίζουν τον καρκίνο των ωθηκών από άλλους κοιλιακούς-πυελικούς όγκους, είναι δυνατό να αναγνωρισθούν χρησιμοποιώντας την μικροακτινική τεχνολογία.

Μία ακόμη αξιοσημείωτη μικροακτινική DNA μελέτη ερευνήσε την έκφραση και σχέση του χρωμοσώματος 3 και του καρκίνου των ωθηκών. Οι Manderson και συν<sup>12</sup> από το Πανεπιστήμιο McGill δημοσίευσαν τη μελέτη τους το 2002. Χρησιμοποίησαν ένα μικροσίπ που περιείχε 290 ESTs χαρτογραφώντας το χρωμόσωμα 3, ώστε να ερευνηθούν 4 ωθηκικές καρκινικές κυτταρικές σειρές και μία φυσιολογική ωθηκική επιθηλιακή κυτταρική σειρά. Όπως αναφέρεται παρακάτω, ένα EST εμπεριέχει τον κωδικό τμήματος μόνο ενός γονιδίου. Δεν είναι απαραίτητο να εκφρασθεί πλήρως το γονίδιο. Βρήκαν 25 διαφορετικά εκφραζόμενα ESTs, συμπεριλαμβανομένων και 6 ESTs μοναδικών για τις πιο επιθετικές κυτταρικές γραμμές. Οι συγγραφείς συμπέραναν πως η μελέτη αυτών των ESTs θα μπορούσε να διευκολύνει την αναγνώριση νέων γονιδίων του χρωμοσώματος 3 που σχετίζονται με την ωθηκική καρκινογένεση. Οι πρωτεΐνες αυτές θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν δείκτες-screening.

#### *Μικροακτινικό screening και αναγνώριση των διαγνωστικών δεικτών: προστασίνη και οστεοποντίνη*

Ο στόχος των μικροακτινικών μελετών είναι η αναγνώριση διαφορετικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών. Μία καλύτερη κατανόηση των διαφορών μεταξύ φυσιολογικών και κακοηθών ωθηκικών επιθηλίων θα μπορούσε να οδηγήσει στην αναγνώριση των διαγνωστικών και προγνωστικών δεικτών, ή να βοηθήσει τις θεραπευτικές στρατηγικές. Έχουν αναφερθεί μελέτες που επικεντρώθηκαν στη μετάφραση της έκφρασης των δεικτών που μπορεί να είναι χρήσιμοι για την πρώιμη διάγνωση του καρκίνου με μικροακτινικό screening<sup>13,14</sup>.

Συγκεκριμένα το μικροακτινικό σύστημα I Micromax ανθρώπινο cDNA, το οποίο περιέχει 2.400 γνωστά στοιχεία του ανθρώπινου DNA, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπινων γονιδίων και ESTs, χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο τριών σειρών ωθηκικών καρκινικών κυττάρων και τριών φυσιολογικών ωθηκικών επιθηλιακών κυττάρων. Τριάντα γονίδια με Cy3/Cy5 σήματα από 5 έως 444, αναγνωρίστηκαν δείχνοντας υπερέκφραση των καρκινικών κυττάρων. Ιδιαίτερου ενδιαφέροντος ήταν οι εκκριτικές πρωτεΐνες, γιατί αυτές πρέπει να είναι ανιχνεύσιμες στον ορό και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν δείκτες του όγκου. Γι' αυτό το λόγο, η προστασίνη με συχνότητα σημάτων 170 και η οστεοποντίνη με συχνότητα σημάτων 184, επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη. Η real-time αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε για να επιβεβαιώσει την αυξημένη έκφραση των γονιδίων της προστασίνης και οστεοποντίνης στις κυτταρικές σειρές του ωθηκικού καρκίνου σε σύγκριση με καλλιέργειες φυσιολογικών ωθηκικών επιθηλιακών κυττάρων. Η ανοσοϊστοχημεία χρησιμοποιήθηκε για να επιβεβαιώσει την υπερέκφραση των πρωτεϊνών στα δείγματα του ιστού. Τελικά, η παρουσία και των δύο πρωτεϊνών μετρήθηκε σε προεγχειρητικά δείγματα ορού ασθενών με καρκίνο των ωθηκών.

Τα επίπεδα της προστασίνης μετρήθηκαν σε 37 γυναίκες με μη βλεννώδη καρκινώματα, για τις οποίες τα επίπεδα του CA<sub>125</sub> ήταν ήδη γνωστά. Η προστασίνη είναι μία πρωτεΐνη σερίνης τύπου τρυψίνης, που αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στα επιθηλιακά κύτταρα του προστατικού αδένου και στον καρκίνο του προστάτη, αλλά δε φαίνεται να εκκρίνεται από φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα. Η προστασίνη φαίνεται να είναι μια πρωτεΐνη σερίνης εγκατεστημένη στη μεμβράνη του κυττάρου. Εντούτοις η δράση της στην εξέλιξη του καρκίνου είναι άγνωστη. Τα επίπεδα της προστασίνης στον ορό είχαν ευαισθησία 51,4%. Εντούτοις, ο συνδυασμός του CA<sub>125</sub> και της προστασίνης βελτίωσε την ευαισθησία του προεγχειρητικού ελέγχου σε σύγκριση με CA<sub>125</sub> μόνο του από 64,9% στο 92% με ειδικότητα 94%.

Τα δεδομένα όσον αφορά την οστεοποντίνη είναι επίσης ενθαρρυντικά<sup>15</sup>. Η οστεοποντίνη είναι μία οξική γλυκοφωσφοπρωτεΐνη που δεσμεύει το ασβέστιο, βρίσκεται σε όλα τα υγρά του σώματος και μπορεί να λειτουργεί σαν

πρωτεΐνη συνδετική των κυττάρων και σαν κυτοκίνη. Δρα επίσης και σαν μεσολαβητής στη διεργασία της φλεγμονής και της καρκινογένεσης. Μελετήθηκαν 99 ασθενείς με διηθητικό ή οριακό καρκίνο των ωοθηκών διαφόρων σταδίων. Οι ευαισθησίες για πρόβλεψη πρώιμου ή όψιμου σταδίου καρκίνου ήταν 80 και 85% αντίστοιχα.

Χρειάζονται προοπτικά δεδομένα για τον καθορισμό της μετεγχειρητικής ευαισθησίας και ειδικότητας των επιπέδων της οστεοποντίνης και προσταΐνης στον ορό. Η καταρχήν εκτίμηση της προσταΐνης και οστεοποντίνης παρέχει αποδείξεις για την αξία της έκφρασης των μικροακτινικής ανάλυσης στην αναγνώριση πρωτεϊνών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν tumor-markers για πρόωμη διάγνωση<sup>16</sup>.

#### *Πρωτεομική τεχνολογία (Proteomic)*

Πρωτεομική τεχνολογία είναι η μελέτη του πρωτεϊνικού περιβάλλοντος ή πρωτεόματος ενός πληθυσμού κυττάρων. Το πρωτέομα είναι ένα δυναμικό περιβάλλον που μεταβάλλεται ταχύτατα, λόγω διάφορων παραγόντων όπως μεταβολές του DNA, διαχωρισμού του m-RNA και παροδικές ή λειτουργικές μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση. Οι τεχνολογίες πρωτεόματος έχουν σαν στόχο να αναγνωρίζουν τις αλλαγές που συμβαίνουν σε πρωτεϊνικό επίπεδο κατά την εμφάνιση της βλάβης<sup>17</sup>. Ενώ, οι μελέτες έκφρασης εκτιμούν τη γενετική βάση της κυτταρικής συμπεριφοράς, οι πρωτεομικές είναι η μελέτη του «βιολογικού σημείου αρχής». Είναι φανερό πως η καλύτερη κατανόηση του πρωτεϊνικού περιβάλλοντος του πληθυσμού των καρκινικών κυττάρων θα μπορούσε να ενισχύσει τις προσπάθειες πρόωμης διάγνωσης όπως και τις έρευνες για την ανάπτυξη νέων θεραπειών. Συνεχώς αναπτύσσονται νέες τεχνολογίες για τη μελέτη των καρκινικών πρωτεομάτων.

#### *Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση πηκτής*

Η δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση σε πηκτή είναι πρόδρομος της πρωτεομικής τεχνολογίας, που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών από το 1975<sup>18</sup>. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει διαχωριστικές πρωτεΐνες που λειτουργούν αρχικά με βάση κάποια διαχωριστικά σημεία και κατά δεύτερο λόγο σε δεύτερη διάσταση με μοριακές μάζες. Επίχρωση με ασήμι, cyrogubyn coomassie blue, επιτυγχάνει την αναγνώριση χιλιάδων πρωτεϊνών που μπορούν να συγκριθούν στα δείγματα ιστού<sup>19,20</sup>.

Ένα παράδειγμα χρήσης δισδιάστατης ηλεκτροφόρησης πηκτής στους καρκίνους των ωοθηκών παρουσιάστηκε από τους Alaiya και συν<sup>21</sup>. Περιγράφουν μία ανάλυση έξι καλοηθών όγκων των ωοθηκικών καρκινωμάτων. Ανιχνεύθηκαν πάνω από 1.500 πρωτεΐνες. Οι οριακοί όγκοι φάνηκε να εμφανίζουν παρόμοια προφίλ πρωτεϊνών με τους κακοήθεις όγκους. Εντούτοις, η προσπάθεια των συγγραφέων να διαφοροδιαγνώσουν τους οριακούς και κακοήθεις όγκους είχε αρκετά ψευδή αποτελέσματα, γεγονός που δείχνει πως χρειάζονται περισσότερα δεδομένα για τα προφίλ των πρωτεϊνών αυτών των παθήσεων, καθώς κάποιες μπορεί να μεταβάλλονται ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου.

Μια πρωτοποριακή δισδιάστατη μελέτη, η «δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση πηκτής», χρησιμοποιήθηκε για την ανεύρεση της πρωτεΐνης καλβασουλίνης (S100A4), η οποία φαίνεται να σχετίζεται με ωοθηκικό καρκίνο και μεταστάσεις. Εντούτοις, χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για την αναγνώριση διαφορετικά εκφραζόμενων πρωτεϊνών και για την κατάδειξη της χρησιμότητάς τους σαν διαγνωστικοί ή προγνωστικοί δείκτες<sup>22</sup>.

#### *Ιονισμός της κυτταρικής επιφάνειας με λέιζερ (SELDI)*

Η τεχνική SELDI είναι μία τεχνική που έχει αναπτυχθεί πρόσφατα για τη μελέτη του καρκίνου των ωοθηκών. Με αυτή την τεχνική επιτυγχάνεται απομόνωση της πρωτεΐνης σε ειδική μικροσυσκευή, με βάση το φορτίο, την υδροφιλία και άλλα χαρακτηριστικά. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες επεξεργάζονται με ιονισμό και λέιζερ. Η υψηλής ευαισθησίας αυτή τεχνική επιτρέπει την αναγνώριση χιλιάδων πρωτεϊνών που είναι προσυνοδευμένες σε μία θέση, ακόμη και σε ελάχιστες ποσότητες.

Οι Petricoin και συν<sup>23</sup> δημοσίευσαν μελέτη χρησιμοποιώντας την τεχνική SELDI. Μελέτησαν πρωτεΐνες σε δείγματα ορού από 50 ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών και από 50 υγιείς γυναίκες. Αναγνωρίστηκε ένα πρωτεομικό σχήμα ειδικό για ωοθηκικό καρκίνο και εφαρμόστηκε σε 116 δείγματα ορού από 50 γυναίκες με καρκίνο των ωοθηκών και 66 υγιείς γυναίκες. Το πρωτεομικό σχήμα αναγνώρισε σωστά όλες τις ασθενείς συμπεριλαμβανομένων 18 περιπτώσεων σταδίου I. Μόνο σε τρεις από τις 66 περιπτώσεις υπήρξαν ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Τα αποτελέσματα είχαν 100% ευαισθησία και 95% ειδικότητα. Οι συγγραφείς συνεχίζουν να εκτιμούν τα αποτελέσματα με την ελπίδα ότι το «πρωτεϊνικό σχήμα» θα αποδειχθεί ένα ισχυρό εργαλείο για την πρόωμη διάγνωση του ωοθηκικού καρκίνου.

#### **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ**

Σήμερα το CA<sub>125</sub> αποτελεί τον πιο αποδεκτό δείκτη για όλους τους καρκίνους των ωοθηκών<sup>24</sup>. Οι πρόσφατες

μικροακτινικές και πρωτεομικές τεχνικές υπόσχονται νέα δεδομένα για την εύρεση πιθανών δεικτών για πρόωμη διάγνωση ωοθηκικού καρκίνου. Σίγουρα απαιτείται περαιτέρω επίπονη και μακροχρόνια έρευνα, αρκετά υψηλού οικονομικού κόστους, αλλά και στατιστική μελέτη, ώστε να εκτιμηθεί η διαγνωστική αξία αυτών των δεικτών.

#### SUMMARY

The serum CA<sub>125</sub> antigen level is the 'gold standard' for ovarian cancer tumor markers. Unfortunately, the usefulness of CA<sub>125</sub> as a marker for early detection is limited by the fact that less than 50% of ovarian cancers isolated to the ovary are associated with detectable serum elevations of the protein. There are thousands of proteins being produced by all cells. A major challenge facing oncologists is to determine which proteins are differentially expressed by cancer cells. Proteins that are over expressed by cancer cells and then released into the bloodstream where they can be measured are the ideal markers for the early detection of cancer. Microarray technology permits rapid preliminary screening of the expression levels of thousands of proteins. Within the past 5 years, several investigators have published intriguing results of microarray analyses of ovarian specimens. Of particular interest are the secretory proteins prostaticin and osteopontin, because they are detectable in serum, and could, therefore, serve as tumor markers. Proteomics is the study of the protein environment or proteome of a population of cells. Proteomic technologies seek to identify the changes that occur during a disease process at the protein level. Two-dimensional gel electrophoresis is the precursor to proteomic study that has been used for protein separation since 1975. Surface-enhanced laser desorption and ionization (SELDI) is a similar new technique that has recently been applied to the study of ovarian cancer. SELDI involves the capture of proteins on a resin 'chip' that fractionates and isolates proteins based on charge, hydrophobicity, and other characteristics. The proteins are then assayed using laser desorption ionization. The emerging microarray and proteomic technology promise to help us identify many potential markers for the early detection of ovarian cancer. Rigorous and continues effort is needed to achieve the aim.

*Key words: CA<sub>125</sub> antigen, microarray technology, prostaticin, osteopontin, proteomic technology, SELDI technique.*

#### BΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bast RC Jr, Klug TL, St John E, et al. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 1983; 309:883-887.
2. Verheijen RH, von Mensdorff-Pouilly S, van Kamp GJ, Kenemans P. CA<sub>125</sub>: fundamental and clinical aspects. *Semin Cancer Biol* 1999; 9:117-124.
3. Karlan BY, Baldwin RL, Lopez-Luevanos E, et al. Peritoneal serous papillary carcinoma, a phenotypic variant of familial ovarian cancer: implications for ovarian screening. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180:917-928.
4. Jacobs IJ, Skates SJ, MacDonald N, et al. Screening for ovarian cancer: a pilot randomized controlled trial. *Lancet* 1999; 353:1207-1210.
5. Woolas RP, Oram DH, Jeyarajah AR, et al. Ovarian cancer identified through screening with serum markers but not pelvic imaging. *Int J Gynecol Cancer* 1999; 9:497-501.
6. Xu Y, Shen Z, Wiper DW, et al. Lysiphosphatidic acid as a potential biomarker for ovarian and other gynecological cancers. *JAMA* 1998; 280:719-723.
7. Kozac KR, Su F, Whitelegge JP, Faull K, et al. Characterization of serum biomarkers for detection of early stage ovarian cancer. *Proteomics* 2005 Nov 5; 17:4589-4596.
8. Ismail RS, Baldwin RL, Fang J, et al. Differential gene expression between normal and tumor-derived ovarian epithelial cells. *Cancer Res* 2000; 60:6744-6749.
9. Matei D, Graeber TG, Baldwin RL, et al. Gene expression in epithelial ovarian carcinoma. *Oncogene* 2002; 21:6289-6298.
10. Shridhar V, Lee J, Pandita A, et al. Genetic analysis of early-versus late-stage ovarian tumors. *Cancer Res* 2001; 61:5895-5904.
11. Sawiris GP, Sherman-Baust CA, Becker KG, et al. Development of a highly specialized cDNA array for the study and diagnosis of epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 2002; 62:2923-2928.
12. Manderson EN, Mes-Masson AM, Novak J, et al. Expression profiles of 290 ESTs mapped to chromosome 3 in human epithelial ovarian cancer cell lines using DNA expression oligonucleotide microarrays. *Genome Res* 2002; 12:112-121.
13. Kim JH, Skates SJ, Uede T, et al. Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer. *JAMA* 2002; 287:1671-1679.
14. Mok SC, Chao J, Skates S, et al. Prostaticin, a potential serum marker for the ovarian cancer: identification through microarray technology. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:1458-1464.
15. Briese J, Schutte HM, Bamberger CM, Loning T, Bamberger AM. Expression pattern of osteopontin in endometrial carcinoma: correlation with expression of the adhesion molecule CEACAM1. *Int J Gynecol Pathol* 2006 Apr 25; 2:161-169.
16. Disis ML, Rivkin SE, Baron A, Markman M, et al. Progress in ovarian cancer research: proceedings of the 5th Biennial Cancer Research Symposium. *Int J Gynecol Cancer* 2006 Mar-Apr 16; 2:463-469.
17. Ahmed N, Oliva KT, Barker G, et al. Proteomic tracking of serum protein isoforms as screening biomarkers of ovarian cancer. *Proteomics* 2005 Nov 5; 17:4625-4636.
18. O' Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975; 250:4007-4021.
19. Kong F, NicoleWhite C, Xiao X, Feng Y, et al. Using proteomic approaches to identify new biomarkers for detection and monitoring of

- ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2006 Feb; 100(2):247-253.
20. Li L, Tang H, Wu Z, Gong J, et al. Data mining techniques for cancer detection using proteomic profiling. *Artif Intell Med* 2004 Oct; 32(2):71-83.
21. Alaiya AA, Franzen B, Hagman A, et al. Molecular classification of borderline ovarian tumors using hierarchical cluster analysis of protein expression profiles. *Int J Cancer* 2002; 98:895-899.
22. Lin YW, Lin CY, Lai HC, Chiou JC, et al. Plasma proteomic pattern as biomarkers for ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2006 Jan-Feb 16; 1:139-146.
23. Petricoin EF, Ardekani AM, Hrtt BA, et al. Use of proteomic patters in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002; 359:572-577.
24. Bast RC Jr, Badqwell D, Lu Z, et al. New tumor markers: CA125 and beyond. *Int J Gynecol Cancer* 2005 Nov-Dec 15; 3:274-281.

---

<sup>1</sup>Δανηλίδης Άγγελος, Μαιευτήρας-Γυναικολόγος Επιστημονικός Συνεργάτης Γ' Μ/Γ

<sup>2</sup>Καραγιάννης Βασίλειος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Διευθυντής Γ' Μ/Γ

Γ' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική ΑΠΘ, Ιπποκράτειο Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης