

**OCENA STĘŻEŃ SDF1 I EKSPRESJI JEGO
RECEPTORA CXCR4 U CHORYCH NA RAKA
JAJNIKA**

lek. med. Karolina Jaszczyńska-Nowinka

ROZPRAWA DOKTORSKA

PROMOTOR: dr hab. n. med. Anna Markowska

**KATEDRA ONKOLOGII KLINIKA ONKOLOGII
UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO
W POZNANIU**

POZNAŃ 2011

SPIS TREŚCI

Wykaz stosowanych skrótów.....	6
1. Wstęp.....	8
1.1. Epidemiologia i etiologia raka jajnika.....	8
1.1.1. Epidemiologia raka jajnika.....	8
1.1.2. Etiologia raka jajnika.....	8
1.2. Czynniki prognostyczne raka jajnika.....	9
1.2.1. Wiek.....	10
1.2.2. Stopień zaawansowania klinicznego.....	10
1.2.3. Klasyfikacja histologiczna.....	12
1.2.4. Stopień zróżnicowania histopatologicznego.....	12
1.2.5. Pierwotna cytoredukcja.....	13
1.2.6. Wodobrzusze.....	13
1.3. Markery nowotworowe w raku jajnika.....	14
1.3.1. Antygen CA 125.....	15
1.3.2. Antygen CA 19.9.....	16
1.3.3. Antygen CA 15.3.....	16
1.3.4. COX-2.....	17
1.3.5. GENOMIKA.....	17
1.3.6. HE4.....	18
1.3.7. Mezotelina.....	19
1.3.8. Białko Bcl-2.....	20
1.3.9. Kalikreiny tkankowe.....	21
1.4. Geny przerzutowania w raku jajnika.....	21
1.4.1. Gen <i>SDF1</i>	23
1.4.2. Gen <i>BRMS1</i>	23
1.4.3. Gen <i>MET</i>	24
1.4.4. Gen <i>IAP-1</i>	24

1.4.5. Gen <i>KISS-1</i>	25
1.4.6. Gen <i>KAI-1</i>	26
1.4.7. Gen <i>NM-23-H1</i>	26
1.5. Cytokiny w raku jajnika.....	27
1.5.1. Klasyfikacja chemokin.....	27
1.5.2. Funkcje chemokin.....	28
1.5.3. Receptor CXCR4.....	29
1.5.4. SDF1 jako ligand CXCR4.....	29
1.5.5. Kompleks SDF1/CXCR4 i jego funkcja w organizmie.....	29
1.6. Objawy raka jajnika.....	32
1.7. Leczenie raka jajnika.....	33
1.7.1. Leczenie chirurgiczne.....	33
1.7.2. Chemioterapia.....	34
2. Cel pracy.....	36
3. Materiał i metodyka.....	37
3.1. Charakterystyka I grupy.....	37
3.1.1. I grupa badana.....	37
3.1.2. I grupa kontrolna.....	38
3.2. Izolacja RNA.....	39
3.3. Odwrotna transkrypcja.....	39
3.4. QPCR.....	40
3.5. Przygotowanie krzywej standardowej.....	41
3.6. Charakterystyka II grupy	44
3.6.1. II grupa badana.....	44
3.6.2. II grupa kontrolna.....	46
3.7. Analiza immunoenzymatyczna stężenia SDF1 w surowicy krwi.....	46
3.8. Analiza statystyczna.....	47

4. Wyniki.....	48
4.1. Analiza elektroforetyczna.....	48
4.2. Ekspresja <i>SDF1</i>	49
4.2.1. Ekspresja <i>SDF1v1</i>	49
4.2.2. Ekspresja <i>SDF1v2</i>	49
4.2.3. Ekspresja <i>SDF1v3</i>	52
4.2.4. Ekspresja <i>SDF1v4</i>	52
4.3. Ekspresja <i>CXCR4</i>	55
4.3.1. Ekspresja <i>CXCR4v1</i>	55
4.3.2. Ekspresja <i>CXCR4v2</i>	55
4.4. Stężenie <i>SDF1</i>	57
4.4.1. Stężenie <i>SDF1</i> przed operacją.....	57
4.4.2. Stężenie <i>SDF1</i> po operacji.....	57
4.4.3. Stężenie <i>SDF1</i> po chemioterapii I-go rzutu.....	57
4.4.4. Stężenie <i>SDF1</i> a typ histologiczny raka jajnika.....	62
4.4.5. Stężenie <i>SDF1</i> a zróżnicowanie histopatologiczne raka jajnika.....	66
4.4.6. Stężenie <i>SDF1</i> a stopień zaawansowania klinicznego wg FIGO.....	66
4.4.7. Stężenie <i>SDF1</i> a wodobrzusze.....	66
4.5. Stężenie <i>SDF1</i> i CA 125 a stopień zaawansowania klinicznego wg FIGO.....	76
4.6. Stężenie <i>SDF1</i> i CA 125 a wodobrzusze.....	76
5. Omówienie wyników i dyskusja.....	79
5.1. Ocena ekspresji <i>SDF1v1-4</i> i <i>CXCR4v1-2</i> u kobiet z rakiem jajnika w porównaniu z ekspresją w jajnikach kobiet grupy kontrolnej.....	79
5.2. Ocena stężeń <i>SDF1</i> w surowicy kobiet chorych na raka jajnika przed operacją, po operacji (6 doba) i po chemioterapii I-go rzutu (w 6 cyklach co 3 tygodnie).....	84
5.3. Ocena stężeń <i>SDF1</i> w surowicy kobiet z rakiem jajnika w zależności od typu i zróżnicowania histopatologicznego, zaawansowania klinicznego nowotworu oraz obecności wodobrzusza.....	86
5.4. Porównanie stężeń <i>SDF1</i> i CA125 w analizowanych grupach chorych.....	87
6. Wnioski.....	89

7.	Streszczenie.....	90
8.	Summary.....	91
9.	Piśmiennictwo.....	92
10.	Spis tabel.....	105
11.	Spis wykresów.....	107
12.	Spis rycin.....	109

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

<i>BRCA1</i>	- gen raka piersi 1 (<i>gen breast cancer 1</i>)
<i>BRCA2</i>	- gen raka piersi 2 (<i>gen breast cancer 2</i>)
<i>BRMS</i>	- gen hamowania przerzutów w raku jajnika (<i>breast cancer metastasis suppressor</i>)
CA125	- antygen nowotworowy 125 (<i>cancer antigen 125</i>)
CA15.3	- antygen nowotworowy 15.3 (<i>cancer antigen 15.3</i>)
CA19.9	- antygen nowotworowy 19.9 (<i>cancer antigen 19.9</i>)
c AMP	- cykliczny monofosforan adenozyliny
CSF-1	- czynnik stymulujący kolonie makrofagów
CXCR4	- receptor dla chemokiny SDF1
CXCR7	- receptor dla chemokiny SDF1
EGF- R	- receptor czynnika wzrostu naskórka
FIGO	- Międzynarodowa Federacja Ginekologów i Położników (<i>International Federation of Gynecology and Obstetrics</i>)
GLOBOCAN	- Światowy Rejestr Nowotworów
GOG	- Grupa ds. Onkologii Ginekologicznej (<i>Gynecologic Oncology Group</i>)
HBOC	- zespół rodzinnego raka piersi i jajnika (<i>hereditary breast-ovarian cancer syndrom</i>)
HE4	- ludzkie białko występujące w najądrzach (<i>human epididymis protein 4</i>)
HNPCC	- dziedziczny rak jelita grubego niezwiązany z polipowatością (<i>hereditary non-polyposis colorectal cancer</i>)
HOC	- zespół rodzinnego raka jajnika (<i>hereditary ovarian cancer syndrom</i>)
<i>IAP-4</i>	- inhibitor aktywatora plazminogenu 1 (<i>inhibitor of apoptosis protein1</i>)
<i>KAI1</i>	- gen supresji przerzutów (<i>metastasis suppressor protein</i>)
<i>KISS1</i>	- kisspeptyna 1 (metastatyna)
<i>MET</i>	-produkt protoonkogenu cMET (<i>mesenchymal-epithelial transition factor</i>)
MMP	- metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej

<i>MSH</i>	- gen naprawczy DNA
<i>MLH</i>	- gen naprawczy DNA
<i>NM-23-H1</i>	- gen supresji przerzutów (<i>non metastatic clone no 23-H1</i>)
PDGF	- płytkopodobny czynnik wzrostu
PI3K	- kinaza fosfatydylinozytolu-3
SDF1	- czynnik komórek zrębu 1 (<i>stroma cell derived factor 1</i>)
TP53	- białko p53 (<i>tumor protein 53</i>)
u PA	- rozpuszczalna postać receptora aktywatora plazminogenu typu moczowego
WHO	- Światowa Organizacja Zdrowia (<i>World Health Organization</i>)
VEGF	- naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (<i>vascular endothelial growth factor</i>)

1. WSTĘP

1.1. EPIDEMIOLOGIA I ETIOLOGIA RAKA JAJNIKA

1.1.1. EPIDEMIOLOGIA

Nowotwory jajnika stanowią jeden z największych problemów w ginekologii onkologicznej.

Światowe raporty epidemiologiczne wskazują na stały wzrost zachorowalności na raka jajnika.

Według GLOBOCAN roczną liczbę zachorowań na raka jajnika na świecie szacuje się na 225 484 [1].

Polska należy do krajów o średniej zachorowalności na raka jajnika. W 2008 roku w Polsce zachorowało 3280 kobiet (standaryzowany współczynnik zachorowalności 10,5). W strukturze zachorowalności na nowotwory złośliwe u kobiet rak jajnika zajmuje piątą pozycję po raku piersi, jelita grubego, płuca i trzonu macicy.

W tym samym roku Polsce zarejestrowano 2507 zgonów (współczynnik standaryzowany śmiertelności wynosił 7,05). Rak jajnika zajmuje czwartą pozycję w strukturze zgonów po raku płuca, piersi i jelita grubego [2].

1.1.2. ETIOLOGIA

Rak jajnika wywodzi się z komórek nabłonka powierzchni jajnika, którego prawidłowe funkcjonowanie, jak również czynniki wpływające na proces karcynogenezy są dotychczas słabo poznane. Nabłonek powierzchni jajnika wywodzi się z nabłonka pokrywającego pierwotną jamę ciała w procesie embriogenezy. Komórki te zachowują zdolność do różnicowania się, co w efekcie powoduje znaczną różnorodność histologiczną raka jajnika. W ramach procesu karcynogenezy w obrębie nabłonka powierzchni jajnika dochodzi do szeregu zmian, w tym obejmujących zaburzenia w regulacji mechanizmu cyklu komórkowego, nadmierną ekspresję genów onkogennych oraz dezaktywację genów supresorowych, co

prowadzi do powstania nowotworu złośliwego. Jednak szczegółowy mechanizm tego procesu nie został dotychczas precyzyjnie określony. Przypadki o nieustalonej etiologii (90-95%) zostały sklasyfikowane jako „sporadyczne” raki jajnika [3].

Przypadki rodzinnego występowania raka jajnika obejmują 5-10% wszystkich raków jajnika. Badania genetyczne ustaliły, że ryzyko rozwoju raka jajnika związane jest z trzema zespołami:

- Zespół dziedzicznego występowania raka sutka i raka jajnika (*HBOC- Hereditary Breast Ovarian Cancer*). Zespół HBOC dotyczy około 75-90% przypadków rodzinnego występowania raka jajnika. Zdecydowana większość przypadków w tej grupie związana jest z mutacjami w obrębie genu *BRCA 1*.

- Swoisty miejscowo zespół dziedzicznego występowania raka jajnika (*HOC- Hereditary Ovarian Cancer* lub *Site Specific Ovarian Cancer Syndrom*). Dotyczy jedynie 5% przypadków rodzinnego raka jajnika. W tym zespole nie występują rodzinne przypadki raka piersi. Występujące zaburzenia genetyczne dotyczą mutacji w obrębie genów *BRCA 1* i *2*.

- Zespół Lyncha (*Lynch Syndrom, HNPCC- Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*). Obejmuje szacunkowo jedynie około 2 % przypadków rodzinnego raka jajnika. W tej grupie występuje zwiększone ryzyko zachorowania na raka jelita grubego, bez polipowatości oraz raka gruczołowego o innych lokalizacjach (endometrium, jajnik, żołądek, drogi moczowe, jelito cienkie, drogi żółciowe). Mutacje powodujące HNPCC dotyczą genów naprawczych (*MSH2, MSH6, MLH1, PMS1, PMS2*) [4].

1.2. CZYNNIKI PROGNOSTYCZNE RAKA JAJNIKA

Czynniki prognostyczne definiowane są jako cechy, które korelują głównie z przeżyciem.

Do podstawowych czynników prognostycznych w raku jajnika należą:

- stopień zaawansowania klinicznego według FIGO (staging),
- stopień zróżnicowania histopatologicznego (grading) oraz typ histologiczny nowotworu,
- stan pacjentki: wiek chorej w chwili rozpoznania nowotworu, stan ogólny,

- leczenie: doświadczenie zespołu leczącego, masa pozostawionych tkanek nowotworowych (resztek) po pierwotnej operacji cytoredukcyjnej [5].

Inne czynniki prognostyczne to: obecność oraz wielkość wodobrzusza, ploidia DNA, wartość stężenia markera CA 125, obecność mutacji w obrębie genu *BRCA 1* i *BRCA 2*, zwiększona ekspresja takich czynników molekularnych jak: białko p53, interleukina 6 (IL6), protoonkogen *c-erbB2*, receptor czynnika wzrostu naskórka (EGF- R), płytkopodobny czynnik wzrostu (PDGF), rozpuszczalna postać urokinazowego receptora aktywatora plazminogenu (u PA), naczyniowo śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF), czynnik stymulujący kolonie makrofagów (CSF-1) [6].

1.2.1. WIEK

Do ważnych czynników prognostycznych zalicza się wiek chorej w czasie rozpoznania. Rokowanie u młodszych kobiet jest lepsze niż u starszych. Dzieje się tak dlatego, iż u pacjentek przed 40 rokiem życia częściej rozpoznaje się nowotwory o granicznej złośliwości oraz raki wysoko zróżnicowane. Poza tym w tej grupie kobiet w 50% rozpoznaje się nowotwory o niskim stopniu zaawansowania [7].

Gorsze rokowanie u starszych pacjentek wiąże się z różnicami w samej biologii nowotworu oraz w odporności organizmu. Rzadziej u starszych kobiet stosuje się „agresywne” leczenie [8].

1.2.2. STOPIEŃ ZAAWANSOWANIA KLINICZNEGO

Stopień zaawansowania klinicznego raka jajnika wg FIGO uważany jest za najważniejszy czynnik rokowniczy [5]. Odsetek pięcioletnich przeżyć w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego w latach 1999-2001 wynosił na świecie: Ia-89,9%, Ib-84,7%, Ic- 80,0%, IIa- 69,9%, IIb- 63,7%, IIc- 66,5%, IIIa- 58,5%, IIIb- 39,3%, IIIc- 28,7%, IV- 25% [9].

Obecna klasyfikacja raka jajnika oparta jest na podziale zaproponowanym przez Międzynarodową Federację Ginekologów i Położników (International Federation of Gynecology and Obstetrics – FIGO) w 1988 roku [10].

Tabela 1. Stopnie zaawansowania nowotworów jajnika wg FIGO (1988)

Stopień	Opis
I	<p>Guz ograniczony do jajników (jednego lub obu)</p> <p>I a - guz ograniczony do jednego jajnika; torebka niezmienniona, nie stwierdza się guza na powierzchni jajnika</p> <p>I b - guz ograniczony do obu jajników; torebki niezmiennione, nie stwierdza się guza na powierzchni jajnika; brak komórek nowotworowych w płynie otrzewnowym lub popłuczynach z jamy otrzewnej</p> <p>I c - guz ograniczony do jednego lub obu jajników oraz jedna z następujących cech: pęknięcie torebki, obecność guza na powierzchni jajnika, obecność komórek nowotworowych w płynie otrzewnowym lub popłuczynach z jamy otrzewnej</p>
II	<p>Guz zajmujący jeden lub obydwa jajniki z naciekaniem tkanek miednicy</p> <p>II a - guz szerzący się na macicę i/lub przerzuty do macicy i/lub jednego lub obu jajowodów, brak komórek nowotworowych w płynie otrzewnowym lub w popłuczynach z jamy otrzewnej</p> <p>II b - guz naciekający inne narządy miednicy; brak komórek nowotworowych w płynie otrzewnowym i popłuczynach z jamy otrzewnej</p> <p>II c - naciekanie narządów miednicy (II a lub II b) z obecnością komórek nowotworowych w płynie otrzewnowym lub popłuczynach z jamy otrzewnej</p>
III	<p>Guz zajmujący jeden lub obydwa jajniki mikroskopowo potwierdzonymi przerzutami do otrzewnej, poza miednicą mniejszą, i/lub przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych</p> <p>III a - mikroskopowe przerzuty do otrzewnej poza miednicą mniejszą</p> <p>III b - makroskopowe przerzuty do otrzewnej poza miednicą mniejszą o wielkości <2 cm w większym wymiarze</p> <p>III c - przerzuty do otrzewnej poza miednicą mniejszą o wielkości > 2 cm w największym wymiarze i/lub przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych</p>
IV	Przerzuty odległe (z wyjątkiem przerzutów do otrzewnej)

1.2.3. KLASYFIKACJA HISTOLOGICZNA

Klasyfikacja histologiczna została ustalona przez WHO w 1973 roku [9].

Nowotwory wywodzące się z nabłonka pokrywającego jajnik i z podścieliska są najliczniejszą grupą pierwotnych nowotworów jajnika. Stanowią one około 60% wszystkich nowotworów jajnika i około 80-90% nowotworów złośliwych jajnika [6].

Raki jajnika (nowotwory nabłonkowe) dzieli się na następujące typy:

- surowicze,
- śluzowe,
- endometrioidalne,
- jasnokomórkowe,
- z komórek nabłonka przejściowego,
- płaskonabłonkowe,
- mieszane,
- niezróżnicowane,
- niesklasyfikowane.

Ze względu na częstość występowania największe znaczenie praktyczne mają nowotwory nabłonkowe surowicze (60-80%), śluzowe (5-15%) i endometrioidalne (10-25%) [6].

Nowotwory nabłonkowe mogą mieć charakter łagodny, złośliwy lub nowotwory o tzw. złośliwości granicznej.

1.2.4. STOPIEŃ ZRÓŻNICOWANIA HISTOPATOLOGICZEGO

Uzupełnieniem weryfikacji histopatologicznej guza jest ocena stopnia dojrzałości – ocena stopnia zróżnicowania histopatologicznego (*grading*).

Wyróżnia się trzy stopnie zróżnicowania histopatologicznego. Oznaczono je literą G.

- GX – stopień zróżnicowania niemożliwy do określenia,
- G1 – nowotwory o wysokim stopniu zróżnicowania (komórki niezróżnicowane nie przekraczają 5% wszystkich komórek), są to guzy dobrze rokujące
- G2 – nowotwory zawierające do 50% komórek niezróżnicowanych,

- G3 - nowotwory, w których utkanie niezróżnicowane przekracza 50%.

W wysoko zróżnicowanych typach nowotworu wykazano dłuższe przeżycia chorych z rakiem jajnika. Odsetek pięcioletnich przeżyć wynosi: dla G1- 77%, G2- 30%, G3- 17% [9].

1.2.5. PIERWOTNA CYTOREDUKCJA

Doszczętna pierwotna cytoredukcja jest jednym z elementów leczenia.

Obecnie za optymalną operację uważa się taką, po której wielkość pozostawionych resztek nie przekracza 1 cm [11].

GOG (Gynecologic Oncology Group) przeprowadziła badanie, które wykazało, że u pacjentek z chorobą resztkową nie większą niż 1 cm, u których po leczeniu operacyjnym zastosowano chemioterapię z paklitakselem i cisplatyną, średni czas do wznowy wyniósł 22 miesiące, a średnie całkowite przeżycie 52 miesiące. Natomiast u pacjentek, u których podczas pierwotnego zabiegu cytoredukcyjnego pozostawiono resztki > 1 cm średni czas do wznowy wyniósł 14 miesięcy, a średnie całkowite przeżycie wyniosło 26 miesięcy [11,12].

Również ważnym czynnikiem rokowniczym podczas pierwotnej cytoredukcji jest stan torebki guza. Vergote i wsp. [13] wykazali, że pęknięcie torebki guza jajnika podczas pierwotnej operacji jest czynnikiem prognostycznym w przewidywaniu długości czasu do wystąpienia wznowy. Porównano pięcioletnie przeżycia. Odsetek pacjentek z pięcioletnim przeżyciem, u których nie doszło do pęknięcia torebki guza był większy (83,3%) niż pacjentek, u których doszło do przerwania ciągłości torebki guza (70,2%).

1.2.6. WODOBRZUSZE

Niezależnym czynnikiem prognostycznym jest obecność wysięku otrzewnowego podczas rozpoznania. U pacjentek z wodobrzuszem w III i IV stopniu zaawansowania klinicznego wg FIGO, odsetek pięcioletnich przeżyć wynosił 5%, a u pacjentek bez wodobrzusza w tych samych stopniach zaawansowania klinicznego odsetek wyniósł

45% [14]. Obecność wodobrzusza wiąże się także z wystąpieniem oporności na chemioterapię, krótszym czasem do wystąpienia progresji i krótszym całkowitym przeżyciem.

1.3. MARKERY NOWOTWOROWE W RAKU JAJNIKA

Antygeny towarzyszące nowotworom to substancje wielkocząsteczkowe- pod względem budowy najczęściej białka, glikoproteiny, glikolipidy, lipoproteiny - wytwarzane przez komórki nowotworowe, pochodzące z błon cytoplazmatycznych, ale także wytwarzane przez komórki i tkanki prawidłowe w odpowiedzi na rozwijający się nowotwór. Antygeny te mogą być uwalniane do krążenia drogami konwencjonalnymi lub w następstwie martwicy komórek. Nasilenie tego ostatniego procesu podobnie jak i intensyfikacja wytwarzania ma istotne znaczenie w zwiększeniu stężenia antygeny w osoczu chorych.

Nie wszystkie z poznanych dotychczas antygenów towarzyszących nowotworom mogły znaleźć zastosowanie jako krążące markery nowotworowe [6].

Wyniki badań markerów nowotworowych mogą znajdować zastosowanie na każdym z etapów procesu diagnostycznego u chorych na nowotwory złośliwe.

Wśród zastosowań badań markerów wymienia się ich przydatność do:

- wykrywania nowotworu,
- ustalenia rozpoznania,
- oceny zaawansowania,
- oceny rokowania,
- monitorowania przebiegu choroby, oceny efektywności stosowanego leczenia, kontroli chorych po leczeniu w celu wczesnego wykrycia ewentualnej wznowy i/lub odległych przerzutów, monitorowania leczenia uzupełniającego [6].

Opracowanie dokładnej i nieinwazyjnej metody wczesnego wykrywania raka jajnika jest bardzo ważne.

1.3.1. ANTYGEN CA 125

Do chwili obecnej najczęściej wykorzystywanym i najdokładniej przebadanym markerem jest produkt genu *MUC16* znany jako CA 125. Przeciwciała dla CA 125 zostały wykryte przez zespół badaczy R. Bast i R. Knapp w 1981r. [15].

Antygen CA 125 jest glikoproteiną błonową obecną na powierzchni wielu rodzajów komórek nabłonkowych i uwalnianą do krwiobiegu u pacjentek z rakiem jajnika oraz rzadziej w przypadku raków przewodu pokarmowego, piersi oraz endometrium.

Antygen CA 125 jest jednym z najważniejszych markerów nowotworowych służących do rozpoznania i monitorowania leczenia raka jajnika.

Górna granica normy stężenia CA 125 w surowicy krwi wynosi 35 U/ml.

CA 125 wykryto w tkankach płodowych przewodów Müllera. Ślady antygeny są obecne także w prawidłowych tkankach: opłucnej, osierdziu, otrzewnej, w nabłonku wyścielającym jajowody oraz w błonie śluzowej kanału szyjki i trzonu macicy [16,17].

Marker CA 125 jest syntetyzowany w obrębie komórki.

W procesie złośliwym architektura tkanek zostaje zniszczona i dochodzi do uwolnienia antygeny CA 125 do krążenia. To samo zjawisko może wystąpić w procesie łagodnym, jeżeli dojdzie do zmian w architekturze tkanek.

Podwyższone stężenia markera stwierdza się w surowicy krwi w warunkach fizjologicznych (w czasie miesiączki, pierwszym trymestrze ciąży, po porodzie), a także w warunkach patologicznych (krwawieniach do jamy brzusznej, zakażeniach, chorobach zapalnych miednicy mniejszej, mięśniakach macicy, endometriozie, ciąży ektopowej, zespole Meigsa). Podwyższone stężenia tego markera opisywano w przebiegu chorób niezwiązanych z żeńskimi narządami płciowymi (rak trzustki, rak płuc, żołądka, jelit, chłoniaki). Wynika stąd, że marker CA 125 nie jest swoisty dla raka jajnika [16- 20].

Ekspresja CA 125 jest głównie związana ze złośliwymi nowotworami pochodzenia nabłonkowego- rakami. Ze względu na dużą czułość (78-85,5%) i swoistość (78,3 – 93%) CA 125 jest uważany za najlepszy marker dla nieśluzowych raków jajnika [6].

Istnieje korelacja między stężeniem CA 125 w surowicy krwi a masą guza.

Zmniejszenie masy guza u wszystkich chorych powoduje obniżenie się stężenia markera CA 125 w surowicy krwi [21]. Tydzień po radykalnej operacji stężenie

markera obniża się średnio o 51% wartości przed operacją, a po 6-30 tygodniach do

wartości ok. 9%.W zaawansowanych rakach jajnika stężenie markera jest wysokie zarówno po pierwszym jak i po następnych 6-8 tygodniach. Może to wskazywać na uwalnianie antygenu z ognisk przerzutowych [22].

Ważnym problemem w monitorowaniu przebiegu raka jajnika jest wczesne rozpoznanie wznowy. Oznaczanie stężenia Ca 125 jest przydatne w większości przypadków. W 70% przypadków podwyższenie stężenia markera jest pierwszym objawem wznowy [23].

Wznowę kliniczną wyprzedza wzrost stężenia CA 125 na 0,5 do 24 miesięcy [24].

1.3.2. ANTYGEN CA 19.9

CA 19.9 - węglowodanowy antygen surowiczy, oligosacharyd. Graniczna wartość u osób zdrowych wynosi 37U/ml. Jest markerem dla raka trzustki i przewodu pokarmowego. U 17-18% chorych na raka jajnika stężenie CA 19.9 jest również podwyższone. Jest to użyteczny marker w monitorowaniu śluzowego raka jajnika [6].

1.3.3. ANTYGEN CA 15.3

Stężenie tego markera jest podwyższone u około 70% chorych na raka jajnika, szczególnie w przypadkach bardziej zaawansowanej choroby.

Wzrost jego stężenia zaobserwowano w raku piersi, zapaleniach wątroby, łagodnych zmianach piersi i jajnika, a nawet raku macicy, jajnika czy płuc. Jako marker znajduje on jednak zastosowanie głównie w raku piersi.

Warto podkreślić, że cechuje go niewielka czułość diagnostyczna w pierwszych stadiach choroby. Waha się ona bowiem między 20 a 30%, wzrastając w kolejnych do 70% . Jest ona ściśle uzależniona od stężenia markera w surowicy. W stadiach zaawansowanych raka, tj. w III i IV stopniu TNM, jego poziom wyraźnie wzrasta ze względu na obecność przerzutów raka piersi.

Liczne badania dowodzą wysokiej korelacji poziomu CA 15.3 z wielkością guza oraz

odpowiedzi na leczenie. Wzrost stężenia bywa także wykorzystywany we wczesnym wykrywaniu nawrotu choroby [24].

1.3.4. COX-2

Cyklooksygenaza jest enzymem, który katalizuje reakcje biosyntezy prostanoidów z kwasu arachidonowego. COX-2 pojawia się w komórkach w odpowiedzi na bodźce zapalne lub stres fizjologiczny. W warunkach fizjologicznych COX-2 jest obecny w niewielkich ilościach w mózgu, jądrach, jajnikach, nerkach oraz w tchawicy. COX-2 odgrywa ważną rolę w biologii nowotworów. Jego ekspresja następuje pod wpływem działania EGF, VEGF, FGF oraz cytokin [25]. Uważa się, że nadekspresja COX-2 koreluje z dobrym zróżnicowaniem guza, ale także jest obecna w przerzutach nowotworów. Nadekspresja tego białka w raku jajnika zależy od typu histologicznego raka (w rakach śluzowych tylko 5,6%) [26] i okazała się niekorzystnym czynnikiem prognostycznym u chorych leczonych cytostatykami. Ekspresja COX-2 korelowała ponadto z ekspresją p53 i VEGF. Możliwe jest też, że COX-2 generuje powstawanie oporności wielolekowej, również na cisplatynę i taksany [27,28].

Duże ilości COX-2 produkują monocyty w odpowiedzi na działanie taksanów. Powoduje o powstanie objawów niepożądanych takiej terapii oraz może zmniejszać siłę działania leków. Wydaje się, iż stosowanie inhibitorów COX-2, czyli niesterydowych leków przeciwzapalnych razem z taksanami jest obiecujące klinicznie właśnie poprzez zmniejszenie toksyczności oraz możliwe nasilenie terapeutycznego działania leku [26]. Nie są dotychczas znane wyniki randomizowanych badań, w których stosowano inhibitory COX-2 razem z taksanami i pochodnymi platyny.

1.3.5. GENOMIKA

Genomika jest to dziedzina biologii molekularnej i biologii teoretycznej (pokrewna genetyce i ściśle związana z bioinformatyką) zajmująca się analizą genomu organizmów. Głównym celem genomiki jest poznanie sekwencji materiału genetycznego oraz mapowanie genomu, ale również określenie wszelkich zależności

i interakcji wewnątrz genomu. Najnowsze badania sugerują, iż za pomocą genomiki możliwe jest wykrycie u człowieka podatności na poszczególne choroby. Przy pomocy tej metody diagnozowania może się znacznie poprawić wyleczalność chorób, a nawet zapobieganie ich rozwojowi [29].

W 2001 roku opublikowano całą sekwencję genomu człowieka. Genom człowieka zawiera około 35-40 tysięcy genów.

Badania genomiczne z użyciem mikromacierzy DNA znalazły zastosowanie w onkologii, gdzie wykorzystuje się je do opisywania molekularnego fenotypu, czyli profilu ekspresji genów charakterystycznych dla danego nowotworu. Dokonuje się identyfikacji genów, które ulegają zwiększonej lub obniżonej ekspresji w poszczególnych rodzajach i fazach rozwoju procesu nowotworowego. Na tej podstawie można określić genotyp nowotworu, a także wyodrębnić produkty białkowe.

Zaletą testów proteomicznych jest to, że wystarczy kropla krwi, wydzieliny lub płynu, a test trwa krócej niż minutę [30].

W przypadkach, kiedy oznaczenie pojedynczego biomarkera w surowicy krwi nie wystarcza do wykrycia choroby we wczesnym, bezobjawowym klinicznie stadium zaawansowania można jednocześnie analizować wiele biomarkerów [31,32].

Dotychczas oceniono przydatność oznaczania ponad 30 markerów samych lub w połączeniu z CA 125.

Najbardziej obiecujące wydają się: HE4 (human epididymis protein4), mezotelina, M-CSF, osteopontyna, kalikreiny oraz rozpuszczalny receptor EGF.

1.3.6. HE4

Najlepszym biomarkerem surowiczym - poza CA 125 –na podstawie ostatnich doniesień jest HE4. Białko to należy do grupy małych termostabilnych cząsteczek związanych przede wszystkim z hamowaniem aktywności proteaz. Gen *WFDC2* kodujący białko HE4 został zidentyfikowany w ludzkim najądrzu. Początkowo wiązano jego funkcję z dojrzewaniem nasienia. Do tej pory rola biologiczna HE4 pozostaje niejasna [33].

Zaobserwowano jednak znamienne nadekspresję genu i zwiększone stężenie białka w surowicy chorych na raka jajnika [34].

Havrilesky i wsp. [35] przeprowadzili niezwykle interesujące badanie, w którym analizie poddano cały panel markerów z trzech głównych rodzajów białek odgrywających rolę w fizjologii i patologii jajnika. Pierwszą grupę stanowiły białka odpowiedzialne za kontrolę proliferacji (glikodelina i inhibina). Druga grupa składała się z CA 125 oraz Muc-1 (cell surface associated, Mucin-1) - białek zaangażowanych w tworzenie macierzy pozakomórkowej oraz interakcje między komórkami nabłonkowymi. Do trzeciej grupy zakwalifikowano czynniki regulujące proteolizę, takie jak: białko HE4 (human epididymis protein 4) oraz MMP7 (matrix metalloproteinase-7), PAI-1 (plazminogen activator inhibitor -1), uPAR (urokinase plazminogen activator receptor) i SLPI (secretory leukocyte peptidase inhibitor). Łączna analiza stężeń CA125, HE4, glikodeliny, uPAR, Muc-1 oraz PAI-1 okazała się najlepszą kombinacją biomarkerów do badań przesiewowych, osiągając czułość 80,5% i swoistość 96,5% dla raka jajnika w stopniu I/II, niezależnie od wieku kobiety. Spośród pojedynczych biomarkerów to właśnie białko HE4 najlepiej wykrywało wczesne postacie choroby, zdecydowanie przewyższając CA125 pod względem czułości (82,7 vs 46%) [35].

Ponad dwadzieścia lat temu Jacobs i wsp. [36] opracowali RMI (Risk of Malignancy Index), który uwzględniał wartość CA 125, obraz USG guzów oraz stan menopauzalny kobiet.

Moore i wsp. [37,38] donieśli, że algorytm ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm) biorący pod uwagę stężenia biomarkerów CA125 i HE4 oraz status menopauzalny kobiety charakteryzuje się wyższą czułością (94,3%) niż opisany wcześniej RMI, który charakteryzuje się niższą czułością-84,6%. ROMA charakteryzuje się wyższą czułością w wykrywaniu raków jajnika w I i II stopniu zaawansowania klinicznego wg FIGO.

1.3.7. MEZOTELINA

Równolegle do HE4 badacze zainteresowali się mezoteliną. Mezotelina to funkcjonalnie zbliżona do CA125 glikoproteina błonowa, która odgrywa rolę w

przyleganiu komórek. Jej rozpuszczalna forma powstaje w wyniku usunięcia motywu kotwiczącego poprzez proteolizę lub alternatywny splicing mRNA [39].

Zastosowanie mezoteliny może mieć większe implikacje praktyczne, jeżeli weźmie się pod uwagę fakt, że jako białko o małej masie cząsteczkowej ulega ona przesączaniu w kłębuszkach nerkowych. Badgwell i wsp. [40] porównywali czułość oznaczenia mezoteliny w moczu oraz w surowicy. Po normalizacji wyników względem stopnia przesączania kłębuszkowego (GFR) stężenie mezoteliny w moczu okazało się znacznie lepszym wskaźnikiem raka jajnika, w tym wczesnych jego postaci, niż stężenie markera w surowicy. Czułość dla I/II stopnia zaawansowania raka wynosiła 42% w porównaniu z 12% dla stężenia w surowicy przy założonej 95-procentowej swoistości.

Wykazano, że wysoka ekspresja mezoteliny w komórkach raka jajnika korelowała istotnie z dłuższym przeżyciem u tych chorych, które miały odbarczającą cytoredukcję i chemioterapię adjuwantową [41].

Oprócz mezoteliny również inne markery oznaczane w moczu poddano wnikliwej ocenie.

1.3.8. BIAŁKO Bcl-2

Bcl-2 – antyapoptotyczne białko. Jego nadekspresja w komórkach nowotworowych powoduje stabilizację błony mitochondrialnej i zapobiega uwalnianiu wapnia z siateczki śródplazmatycznej pod wpływem leczenia onkologicznego.

Kruk i wsp. [42] zaobserwowali u 97% kobiet chorych na raka jajnika występowanie w moczu białka Bcl-2. Przy równie wysokiej swoistości Bcl-2 doniesienia naukowców z Uniwersytetu Południowej Florydy należy potraktować jako bardzo optymistyczne. Możliwość wykonania badań przesiewowych równie łatwo, jak domowy test ciążowy jest niezwykle interesująca. Ale wymaga to dalszych badań klinicznych na większej populacji.

1.3.9. KALIKREINY TKANKOWE

Kalikreiny to rodzina proteaz serynowych o aktywności zbliżonej do trypsyny lub chymotrypsyny. Geny kalikrein (15 poznanych do tej pory) zlokalizowane są bezpośrednio obok siebie na chromosomie 19. Najbardziej znaną cząsteczką jest hK3- znana jako PSA (antygen specyficzny dla prostaty). Jest to jeden z najlepszych markerów nowotworowych służących do wczesnego wykrywania raka prostaty. Badania ekspresji genów w tkance nowotworowej jajnika potwierdziły znaczną nadekspresję pozostałych kalikrein oraz jej lokalizację na obrzeżach guza [43]. Potwierdza to rolę kalikrein w procesie naciekania i rozsiewu nowotworowego. Wśród sugerowanych mechanizmów działania znalazły się proteolityczna aktywacja czynników wzrostowych, uwalnianie czynników angiogennych oraz degradacja białek strukturalnych macierzy pozakomórkowej.

Różnice w ekspresji poszczególnych kalikrein w tkance nowotworowej istotnie wpływały na rokowanie pacjentek. Kalikreiny 5, 6, 7 oraz 10 były związane z wyższym stopniem zaawansowania klinicznego, niższą dojrzałością guza oraz zmniejszeniem przeżywalności [44]. Odwrotnie: kalikreiny 8, 11 i 13 wskazywały na lepsze rokowanie, możliwość przeprowadzenia optymalnej cytoredukcji oraz lepszą odpowiedź na chemioterapię [45,46].

1.4. GENY PRZERZUTOWANIA W RAKU JAJNIKA

Cechą charakterystyczną nowotworów złośliwych i główną przyczyną zgonów z powodu raka jest przerzutowanie. W wielostopniowym procesie nowotworzenia dochodzi do gromadzenia się mutacji i zmian w ekspresji genów, co wiąże się z nabywaniem w miarę upływu czasu nie tylko cech fenotypu wzrostowego, ale także fenotypu inwazyjnego, charakterystycznego dla nowotworu złośliwego, posiadającego zdolność do pokonywania barier błon podstawnych naczyń, tkanek i narządów oraz do inicjowania wzrostu wtórnego w odległych od zmiany pierwotnej miejscach [47].

Przemiana komórki prawidłowej w nowotworową (transformacja nowotworowa) wymaga dziedzicznych lub nabytych w następstwie procesów wewnętrznych, zmian w jej genomie. W ewolucji przemiany komórki prawidłowej w nowotworową istotną rolę odgrywają zmiany w genach odpowiedzialnych za homeostazę.

Proces transformacji nowotworowej, którego następstwem jest nabycie fenotypu wzrostowego, prowadzi do powstania klonu komórek dziedziczących mutację odpowiedzialną za utrzymującą się nieograniczoną zdolność do proliferacji. Prowadzi to do powstania zmiany nowotworowej, w której komórki, dopóki wielkość zmiany-guza nowotworowego nie osiągnie krytycznych rozmiarów 2-3 mm³, zaopatrywane są w czynniki utrzymujące ich egzystencje drogą dyfuzji.

Z nabyciem fenotypu inwazyjnego komórki nowotworowe stają się zdolne do ruchu i przemieszczania się, ich wzrost jest niezależny od sygnałów przekazywanych przez czynniki wzrostowe, nie odpowiadają na czynniki inhibitorów proliferacji i są niepodatne na apoptozę. Komórki o fenotypie inwazyjnym są zdolne do przeżywania w krążącej krwi, do przechodzenia i opuszczania światła naczyń krwionośnych, indukowania powstawania nowych naczyń krwionośnych i realizowania wtórnego wzrostu nowotworowego w odległym od zmiany pierwotnej miejscu, czyli do tworzenia przerzutów [48].

Przełomowe znaczenie w badaniach mechanizmu przerzutowania miało porównanie uzyskanych różnymi metodami klonów i subklonów linii nowotworowych, różniących się zdolnością do przerzutowania. Badania te wkroczyły w ostatnim dwudziestoleciu w nową fazę, dzięki wprowadzeniu i wykorzystaniu dynamicznie rozwijających się metod biologii komórkowej i molekularnej. Klony komórek nowotworowych o wysokim potencjale przerzutowania różnią się od ich odpowiedników, nisko przerzutujących, pod względem cech geno- i fenotypowych [47].

Nie wszystkie raki wykazują tą samą inwazyjność, czy też potencjał przerzutowania. Droga przerzutowania jest różna. Często raki mają „utarte szlaki” np. rak gruczołu krokowego do kości, rak żołądka do jajników itd.

Nie każde oddzielenie komórki raka od masy guza i penetracja do układu limfatycznego, czy też krwionośnego skutkuje rozwojem przerzutu. Muszą nastąpić zmiany w środowisku raka- w integrinach, kadherynach, proteazach itd., aby komórka mogła się zakotwiczyć i następnie namnożyć się. Mechanizmy przerzutowania są przedmiotem wielu badań [47].

Znane są już terapie celowane przeciwko czynnikom mającym związek z przerzutowaniem np. integrynom i kadherynom (VOLOCIXIMAB- chimeryczne przeciwciało przeciwko integrynie $\alpha 5\beta 1$ –II faza badań klinicznych- w połączeniu z liposomalną doksorubicyną dla pacjentów z platynoopornym zaawansowanym rakiem jajnika i pierwotnym rakiem otrzewnej).

Dobrze poznano do tej pory kilka genów związanych z przerzutowaniem.

Poznanie biologii wzrostu inwazyjnego i mechanizmu procesu przerzutowania wskazuje nowe cele dla terapii przeciwnowotworowej, w której leczenie przeciwprzerutowe winno stanowić strategię uzupełniającą leczenie eliminujące, czy niszczące komórki nowotworowe. Powinno to poprawić dotychczasowe efekty leczenia przeciwnowotworowego, niezadawalająco efektywnego w zaawansowanej chorobie nowotworowej z diagnostycznie dostępnymi przerzutami.

1.4.1. Gen *SDF1*

Gen *SDF1* (stromal cell- derived factor-1) zlokalizowany jest na chromosomie 10q11.1. Posiada dwie izoformy uzyskiwane w wyniku alternatywnego składania (splicing) *SDF1 α* i *SDF1 β* . Bardziej poznana forma jest *SDF1 α* .

Działa poprzez receptory CXCR4 i CXCR7. Kompleks *SDF1/CXCR4* regulowany jest przez mechanizmy związane z zapaleniem i zniszczeniem tkanki oraz odgrywa rolę w przerzutowaniu komórek nowotworowych CXCR4 dodatnich do narządów posiadających ekspresję *SDF1* poprzez naprowadzanie przerzutów [49,50].

Szczegółowo gen ten omówiono w dalszej części rozprawy.

1.4.2. Gen *BRMS1*

Innym genem związanym z przerzutowaniem jest *BRMS1* (breast cancer metastasis suppressor). Gen ten zlokalizowany jest na chromosomie 11q13.1-q13.2. Odkrycia tego genu dokonali Seraj i wsp. [51].

BRMS1 angażuje w swoje działanie supresorową ścieżkę sygnałowania jądrowego (NF- κ B) oraz sygnałowanie fosfoinozitolowe.

Obniżona ekspresja *BRMS1* powoduje obniżenie adhezji komórek, reguluje białko fascynę (skupiające aktyne w pęczki, związane z ruchliwością komórek), modyfikuje fenotypy związane z przerzutami (utrata heterozygotyczności chromosomu 11q). *BRMS1* ulega ekspresji w raku piersi, czerniaku, ale również w zdrowej tkance jajnika, prostaty, jądra, okrężnicy, co może sugerować, że gen ten może odgrywać rolę hamowania przerzutów w rakach pochodzących z tych tkanek. Wykazano, że delecje chromosomu 11q są częstsze w przerzutach i w inwazyjnym guzie, i że utrata heterozygotyczności chromosomu 11q jest częstsza w większości raków jajnika. Fakty te wskazują, że gen supresji guza może odgrywać ważną rolę w progresji i przerzutowaniu raka jajnika. Może być również tarczą w terapii celowanej raka jajnika [51].

1.4.3. Gen *MET*

Gen *MET* (mesenchymal-epithelial transition factor) zlokalizowany jest na chromosomie 7q31. Jest protoonkogenem kodującym białko MET, znane jako c-MET. Jedynym jego ligandem jest HGF (hepatocyte growth factor). W procesie nowotworzenia stymulacja c-MET przez HGF pobudza naciekanie i jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym (rak płuca, rak brodawkowaty nerki typ I). Nadekspresja związana jest z przerzutowaniem zwłaszcza do węzłów paraaortalnych poprzez aktywizację metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9. Inhibitory kinaz Met mogą być terapią celowaną [52].

1.4.4. Gen *IAP-4*

Gen *IAP-4* (inhibitor of apoptosis protein)- gen przeżywania zlokalizowany jest na chromosomie 17q25. Produktem jego jest białko należące do inhibitorów apoptozy-surwiwina. Charakterystyczna dla IAP jest domena BIR (baculovirus IAP repeat), przez które IAP wiążą się z kaspazami- enzymami proteolitycznymi, uczestniczącymi w programowanej śmierci komórki.

Surwiwina ulega ekspresji na komórkach nowotworowych i tkankach różnicujących się. Obecna jest w wielu typach nowotworów i określa się ją jako uniwersalny antygen nowotworowy (raka jelita, żołądka, trzustki, piersi, chłoniaków, glejaka mózgu). Surwiwina nie występuje w prawidłowych komórkach i dlatego można selektywnie eliminować lub hamować proliferację komórek nowotworowych w terapii celowanej przez blokowanie ekspresji genu (strategia tripleksu lub nonsensu) - bez wpływu dla zdrowych tkanek [53].

Ekspresja mRNA surwiwiny koreluje z przerzutami raka jajnika do węzłów chłonnych i kojarzona jest z progresją tego raka [54].

1.4.5. Gen *KISS-1*

Gen *KISS-1* (kisspeptyna, metastatyna) zlokalizowany jest na chromosomie 1q32.

Gen koduje receptor GPR54- ligandem jest kisspeptyna (neurohormon).

Kisspeptyna bierze udział w regulacji rozrodu (owulacja, implantacja, utrzymanie ciąży, prawidłowy rozwój płodu). Kisspeptyna jest hormonem zapoczątkującym proces dojrzewania. Kisspeptyna działa na wiele nowotworów poprzez np. hamowanie przerzutów w raku piersi, hamowanie migracji komórek raka trzustki, hamowanie migracji komórek melanoma *in vitro* [55,56]. Obniżone stężenie kisspeptyny odpowiedzialne jest za inwazję i złą prognozę raka żołądka. Stężenie kisspeptyny koreluje z patologicznym rozrostem trofoblastu i stężeniem hCG. W raku jajnika działanie kisspeptyny odbywa się na drodze hamowania migracji komórek nowotworowych, kierowania komórek na szlak apoptozy, upośledzenia zdolności komórek raka do tworzenia kolonii. Według dobrze udokumentowanych wielośrodkowych badań immunoreaktywność kisspeptyny i jej receptora GPR54 kojarzona jest z dobrą prognozą i dłuższym przeżyciem w jasnokomórkowym raku jajnika i uważana jest za niezależny biomarker prognostyczny w tym typie raka jajnika [57]. Wzmocnienie aktywności kisspeptyny rozważane jest w terapii celowanej [58].

1.4.6. Gen *KAI1*

Gen *KAI1* (*metastasis suppressor protein*) zlokalizowany jest na chromosomie 11p11.2. Jest on genem supresji przerzutów. Obniżona ekspresja białka supresji przerzutów związana jest z niekorzystną prognozą (krótsze przeżycia, bardziej agresywny przebieg kliniczny choroby, zwiększoną ilością przerzutów) w raku jajnika (również w wielu innych guzach: prostaty, szyjki macicy, piersi, płuca, trzustki, jelita grubego) [59-64]. Ekspresja *KAI1* jest zmienna w pęcherzykach w jajniku w fazie folikularnej i lutealnej, co sugeruje jej fizjologiczną rolę w cyklu miesięczkowym.

1.4.7. Gen *NM-23-H1*

Gen *NM-23-H1* (*non metastatic clone no 23-H1*) zlokalizowany jest na chromosomie 17q21. Należy on do genów kodujących rodzinę strukturalnie i czynnościowo konserwatywnych białek, wykazujących aktywność enzymatyczną kinaz NDP (nukleazy dwufosfohydrolazowe), które uczestniczą w procesach naprawy DNA i utrzymują równowagę między nukleotydami wewnątrzkomórkowymi. Z ich aktywnością enzymatyczną związane jest również funkcjonowanie mikrotubul oraz białek filamentowych, wpływających na kształt wrzeciona podziałowego. U człowieka zidentyfikowano dotychczas 8 genów *NM23* (*NM23-H1*, *NM23-H2*, *DR-NM23*, *NM23-H4*, *NM23-H5*, *NM23-H6*, *NM23-H7*, *NM23-H8*). Sklonowane po raz pierwszy przez Rosengarda i wsp. [65] oraz Stahla i wsp. [66] geny *NM23-H1* i *NM23-H2*, oprócz swojej aktywności enzymatycznej biorą udział w procesie wzrostu i różnicowania komórek. Mają również związek z progresją nowotworów i tworzeniem przerzutów.

W wielu ludzkich nowotworach wykazano istnienie odwrotnej korelacji między poziomem ekspresji białka nm23-H1 a potencjałem przerzutowym nowotworu [67]. Opisywane zależności badane były zarówno na poziomie ekspresji białka nm23-H1 jak również jakościowych i ilościowych aberracji genu *NM23-H1*. Utrata heterozygotyczności (LOH) lub/i mutacje punktowe prowadzące do obniżenia ekspresji tego białka okazały się być związane z progresją i tendencją do

przerzutowania w raku jelita grubego, nerki, płuca, jajnika, oraz w nerwiaku płodowym [68-71]. W przypadkach raka jelita grubego, żołądka i jajnika komórki pochodzące z przerzutów nowotworowych cechowała niższa niż w komórkach guza pierwotnego ekspresja białka nm23-H1 [71]. Obserwacje te doprowadziły do określenia genu *NM23-H1* mianem kandydata na gen supresorowy dla przerzutowania. Spadek ekspresji związany jest z przerzutami do węzłów chłonnych w raku jajnika [72].

1.5 CYTOKINY W RAKU JAJNIKA

Cytokiny są białkami regulującymi i kontrolującymi podstawowe funkcje komórek, w tym rozplam, różnicowanie się i migrację poprzez oddziaływanie auto- i parakryne. Wśród wielu podziałów cytokin wyróżnia się cytokiny prozapalne, proangiogenne, hematopoetyczne i inhibitorowe, chociaż wiele cytokin pełni szereg równoległych funkcji.

Chemokiny to rodzina prozapalnych cytokin chemotaktycznych. Ich nazwa pochodzi od zdolności ukierunkowania chemotaksji w pobliże wrażliwych komórek.

Są CHEMO- taksyjnymi cyto- KINAMI. Historyczne nazwy tych białek to : rodzina cytokin SIS, rodzina cytokin SIG, rodzina cytokin SCY.

SDF-1 to mała cytokina należąca do rodziny chemokin, oficjalnie mianowana jako CHEMOKINE (C- X -C motif) ligand12 (CXCL12).

1.5.1. KLASYFIKACJA CHEMOKIN

Klasyfikacja białek należących do rodziny chemokin oparta jest na ich charakterystycznych cechach strukturalnych, a nie na umiejętnościach przyciągania komórek. Wszystkie chemokiny są małe, z masą molekularną między 8 a 15 kDa. Wydzielane są przez leukocyty i linie komórek zrębu, takie jak: komórki śródbłonna, makrofagi/ monocyty, fibroblasty mezenchymalne i komórki nabłonkowe w odpowiedzi na zapalenie [73].

Są one w około 20-50 % identyczne , różniąc się sekwencją genową oraz aminokwasową. Aminokwasy są ważne do kreowania struktury trzeciorzędowej, która w przypadku chemokin nabiera kształtu „klucza greckiego”. Chemokiny zbudowane są z czterech cystein połączonych wiązaniami dwusiarczkowymi (pierwsza z trzecią , druga z czwartą). Pierwsze dwie cysteiny w chemokinie są usytuowane razem w pobliżu N- końca, trzecia w środku, a czwarta na końcu zwanym C-końcem. W zależności od rozmieszczenia pierwszych dwóch cystein chemokiny podzielono na cztery grupy:

- **chemokiny CC** (β chemokiny), które zawierają cztery lub w niektórych nielicznych przypadkach sześć cystein. Chemokiny CC odpowiedzialne są za migrację monocytów , komórek NK oraz komórek dendrytycznych.
- **chemokiny CXC** (α chemokiny), w których N - końcowe cysteiny przedzielone są „X” aminokwasem. Odkryto około 17 różnych CXC chemokin. Są między innymi opisywane w gruczole piersiowym.
- **chemokiny C** (γ chemokina). W przeciwieństwie do innych grup ta grupa posiada tylko jedną cysteinę. W tej grupie zostały opisane dwie chemokiny: XCL1 i XCL2 , które przyciągają prekursorzy komórki T do grasicy.
- **chemokiny CX3C** , które posiadają trzy aminokwasy pomiędzy dwiema cysteinami. Jedyna odkryta chemokina tej grupy nazywa się fraktalkiną (CX3CL1) [74,75].

1.5.2. FUNKCJA CHEMOKIN

Chemokiny odgrywają istotną rolę w wielu procesach fizjologicznych i chorobowych, takich jak: migracja komórek, promowanie angiogenezy, zakażenia bakteryjne i wirusowe, choroby autoimmunologiczne, a także w patogenezie wielu nowotworów np. raka jajnika, raka piersi [75-78].

1.5.3. RECEPTOR CXCR4

Chemokiny zazwyczaj łączą się z wieloma receptorami, a te same receptory mogą łączyć się z więcej niż jedną chemokina. SDF1 łączy się z dwoma receptorami CXCR4 i CXCR7 [75,79]. Do niedawna uważano, że CXCR4 jest jedynym receptorem oddziaływającym z SDF-1. Tymczasem badania prowadzone nad czynnikiem pochodzenia stromalnego wykazały, że obie jego postaci: SDF-1 α i SDF-1 β , łączą się z dwoma typami receptorów wiążących chemokiny: CXCR4 i CXCR7. Oba receptory wykazują duże powinowactwo do SDF-1, receptor CXCR7 dodatkowo wiąże się z interferonem (I-TAC lub CXCL11), który jest α -chemoatraktantem komórek T. Receptor CXCR7 ulega ekspresji na powierzchni wielu komórek nowotworowych, prawdopodobnie bierze udział w procesach nowotworzenia, wzrostu i adhezji.

Obecne badania wskazują, iż receptor CXCR7 nie bierze udziału w procesie hematopoezy, w których główną rolę odgrywa CXCR4 i SDF-1 [80].

1.5.4. SDF-1 JAKO LIGAND RECEPTORA CXCR4

Jedynym ligandem receptora CXCR4 jest SDF1 z podrodziny α chemokin [81-83]. SDF1 jest kodowany przez gen *SDF1* znajdujący się na chromosomie 10q11.1 [50,84].

1.5.5. KOMPLEKS SDF-1/CXCR4 I JEGO FUNKCJA W ORGANIZMIE

SDF-1 działa przez swoje receptory CXCR4 i CXCR7. Interakcja SDF-1 z CXCR4 może prowadzić do oporności na apoptozę przez pobudzenie AKT-PKB (protein kinase B) lub do pobudzenia apoptozy (drogą szlaku MAPK- miogen-activated protein kinase). Los komórki zależy od równowagi sygnałów pro- i antyapoptycznych, przewodzonych różnymi szlakami sygnalizacyjnymi, co jest niezwykle istotne w

prawidłowym i zaburzonym cyklu komórkowym związanym z rozwojem raka [75,85]. Funkcja kompleksu SDF-1-CXCR4 jest regulowana przez różne biologiczne mechanizmy.

Chemokiny działają poprzez receptory. Receptory chemokinowe, to receptory „serpentyńowe” o siedmiu domenach przez błonowych, transdukcja ich sygnałów odbywa się za pośrednictwem białek cytoplazmatycznych G w komórkach docelowych. Dotychczas scharakteryzowano 19 różnych receptorów. Receptory chemokinowe zawierają około 350 aminokwasów.

Receptory chemokinowe możemy podzielić na cztery grupy w zależności od rodzaju chemokin, z którymi się łączą. I tak: CXCR z CXC chemokiną, CCR z CC chemokiną, CX3CR1 z CX3C oraz XCR1, który blokuje dwie inne chemokiny (XCL1 i XCL2).

Wiązanie chemokin do receptorów sprzężonych z białkiem G na komórkach docelowych prowadzi do serii zdarzeń przenoszenia sygnału, obejmujących wytwarzanie 1,4,5- trójfosforanu inozytolu, kinazy białkowej zależnej od cyklicznego monofosforanu adenozyliny (c AMP), aktywację kinazy fosfatydyloinozytolu-3 (PI3K), fosforylację kinazy białkowej B (AKT), fosforylację kinazy regulowanej sygnałem pozakomórkowym (ERK), składowych kompleksów adhezji ogniskowej i aktywację kinazy białkowej C. Aktywacja receptora chemokinowego może powodować wzrost komórki, przyleganie i kierunkową migrację [86].

Receptor CXCR4 kodowany jest przez wysoce konserwatywny gen o dwóch egzonach rozdzielonych sekwencją intronu [87]. CXCR4 ulega bogatej ekspresji na limfocytach, neutrofilach, neuronach, komórkach gleju, komórkach endotelium, obwodowych mięśniach szkieletowych, *myokardium*, a także na komórkach nowotworów przerzutujących, włącznie z rakiem sutka, jajnika, prostaty, pęcherza moczowego, rakiem trzustki i szpiczakiem mnogim [50,76,81,84,85,88].

Funkcjonowanie receptora CXCR4 fizjologicznej i komórki nowotworowej modulowane jest przez różne czynniki: poziom ekspresji receptora na powierzchni komórki oraz poziom sulfatacji N - końcowej części. Inne czynniki to: ekspresja i biologiczna dostępność SDF1 na tkankach, a także modulacja dodatnia wiązania CXCR4 w części lipidowej błony przez komórki związane z zapaleniem i remodelujące tkanki oraz ujemna przez antybiotyki polienowe. Także rozłam N - końcowej części na komórki i SDF1 w przestrzeni międzykomórkowej poprzez proteazę serynową i metaloproteinazy MMPs. Wszystkie te czynniki mogą

modulować odpowiedź CXCR4 normalnych i nowotworowych komórek na stężenie SDF1 i wpływać na ich transformację lub przerzuty [89].

W wyniku splicingu tego samego pre-mRNA SDF1 posiada dwie izoformy: SDF-1 α i SDF-1 β , które różnią się zawartością aminokwasów oraz funkcją (89 i 93). Obecnie szerzej poznana jest izoforma SDF-1 α [81,82,85]

Zidentyfikowano kilka czynników, które zwiększają odpowiedź komórek CXCR4+ na stężenie SDF-1. Do tych czynników należą: anafilatoksyna C3a, des-Arg C3a (produkt degradacji C3a przez karboksypeptydazę), kwas hialuronowy i sfingozyna fosforowa [90,91]. Podobnie znaleziono kilka innych molekuł takich jak: fibronektyna, fibrynogen, trombina, rozpuszczalne uPAR (receptor aktywatora plazminogenu typu urokinazy), VCAM-1 (pierwsza cząstka adhezyjna śródbłonna naczyniowego), uwrażliwiających odpowiedź na niskie stężenia SDF-1 [92]. Te obserwacje podkreślają koncepcję, że kompleks SDF-1-CXCR4 może być modulowany przez różne wymienione molekuły powiązane z zapaleniem lub zniszczeniem tkanki (anafilatoksyna C3a, Arg C3a, fibronektyna, kwas hialuronowy), koagulacją (fibrynogen, uPAR, trombina), czy aktywacją komórek (s-VCAM-1, s-ICAM-1) [92,93]. Badania na poziomie molekularnym wykazały, że stężenie SDF-1 jest zależne od zawartości cholesterolu w błonie komórkowej. W związku z tym leki (np. antybiotyki polienowe: amfoterycyna B, nystatyna), które zaburzają część lipidową błony poprzez wykorzystanie cholesterolu z komórek mogłyby negatywnie wpływać na statynową wrażliwość komórek nowotworowych. Antynowotworowe właściwości związków statynowych zostały udowodnione. Zatrzymują one syntezę wewnątrzkomórkowego cholesterolu, co może być wyjaśnione przez zmniejszenie ilości błonowego cholesterolu i w ten sposób zmniejszenie budowy części lipidowej błony komórkowej, ale wymaga to dalszych badań.

Interakcja SDF-1-CXCR4 na komórkach docelowych powoduje wzmożenie przechodzenia noszących ten receptor komórek limfopoetycznych do narządów limfopoetycznych i akumulację tych komórek w tkankach objętych zapaleniem.

Opisana interakcja wywołuje również migrację komórek progenitorowych w ciągu organogenezy i regeneracji tkanek, czy narządów. Kompleks SDF-1-CXCR4 wpływa na wady w rozwoju serca, mózgu, dużych naczyń [85,94].

SDF-1-CXCR4 odpowiedzialny jest za różne mechanizmy sygnałowania mające wpływ na promocję wzrostu i hamowanie apoptozy, indukcję angiogenezy, aktywację inwazji komórkowej. Powoduje przerzutowanie komórek CXCR4+ do narządów, które

wykazują ekspresję SDF-1 (kości, węzły chłonne, płuca, wątroba), działając przez wpływ SDF-1 na migrację komórek nowotworów złośliwych, chemotaksję i adhezję [49]. Wykazano, że mechanizm ten odgrywa istotną rolę w naprowadzaniu komórek raka piersi do płuc i tworzeniu przerzutów [76].

Połączenie SDF-1 z receptorem CXCR4 prowadzi do zwiększania integryn na komórkach nowotworowych i wzmożonej adhezji tych komórek do komórek zrębu i cząsteczek macierzy pozakomórkowej, co prowadzi do wzmożonej oporności komórek nowotworowych na chemioterapię [49,95,96].

W ostatnich latach wykazano, że kompleks SDF-1-CXCR4 odgrywa kluczową rolę w przerzutowaniu przynajmniej 23 typów nowotworów, w tym raka piersi, raka jajnika, raka drobnokomórkowego płuca, raka gruczołu krokowego, a także raka gruczołowego szyjki macicy [50,95-99].

Wykazano również, że poziomy SDF-1 koreluje z zajęciem węzłów chłonnych i przeżyciem pacjentek chorych na raka piersi.

Kompleks SDF-1-CXCR4 stymuluje proliferację linii komórkowych raka piersi i raka jajnika szlakiem parakrynnym, w taki sam skuteczny sposób, jak estradiol [97].

Wykazano, że swoiste przeciwciała monoklonalne przeciwko CXCR4 hamują przerzutowanie raka piersi do płuc i do węzłów chłonnych, upośledzają przepuszczalność naczyń krwionośnych, angiogenezę i migrację komórek.

Na przykład przeciwciała anty-HER-2 (trastuzumab - Herceptin) w raku piersi wywołują efekt „down regulation” CXCR4 [100].

1.6. OBJAWY RAKA JAJNIKA

Objawy kliniczne w raku jajnika, szczególnie w I i II stopniu zaawansowania klinicznego wg FIGO, nie są typowe. Dlatego rak jajnika stanowi największy problem w ginekologii onkologicznej. Większość chorych (60-70%) zgłasza się do ginekologa w III i IV stopniu zaawansowania klinicznego według FIGO. A jak wiadomo identyfikacja wczesnych objawów choroby ma ważne kliniczne znaczenie, ponieważ pięcioletnie przeżycie we wczesnych stadiach choroby wynosi 70-90% w porównaniu z 20-30% w zaawansowanych stadiach [9].

Guzy jajnika nie dają charakterystycznych objawów klinicznych. W początkowym okresie chore nie zgłaszają żadnych dolegliwości.

Subiektywne objawy pojawiają się, gdy masa guza jest duża i proces nowotworowy jest rozsiany. Swoiste objawy zależą od wielkości, miejsca i typu guza nowotworowego. Dolegliwościami są zazwyczaj ból o małym nasileniu w miednicy mniejszej, uczucie pełności w jamie brzusznej oraz powiększenie obwodu brzucha. Do objawów, które występują znamienne częściej w zaawansowanych postaciach raka jajnika należą: zaburzenia przewodu pokarmowego, uczucie zmęczenia, powiększenie obwodu brzucha, bóle brzucha oraz zmiana masy ciała. Zaburzenia przewodu pokarmowego: nawracające wzdęcia, zaparcia, nudności i uczucie dyskomfortu w jamie brzusznej występują często, ale nie są swoiste [10].

W ostatnim okresie choroby następuje wyniszczenie chorych, zaostrenie rysów twarzy określane jako „facies ovarica”, znaczne powiększenie się obwodu brzucha na skutek obecności dużej ilości płynu. Niestety dopiero wtedy można samym oglądaniem ustalić z dużym prawdopodobieństwem rozpoznanie.

1.7. LECZENIE RAKA JAJNIKA

Leczenie raka jajnika jest leczeniem skojarzonym: zabieg operacyjny z następującą chemioterapią.

1.7.1. LECZENIE CHIRURGICZNE

Leczenie operacyjne odgrywa podstawową rolę. Wynikiem operacji powinna być skuteczna cytoredukcja, określenie rodzaju guza oraz zaawansowania procesu nowotworowego według FIGO.

Radykalny zabieg operacyjny wiąże się z wycięciem macicy z przydatkami, siecią większą, w razie możliwości z usunięciem węzłów chłonnych miednicy mniejszej oraz wyrostka robaczkowego w typie śluzowym raka jajnika. Ważne też jest podczas operacji pobranie wymazów i popłuczyn z jamy brzusznej, pobranie wycinków ze wszystkich podejrzanych miejsc. U chorych w stopniu zaawansowania IA i IB i

zróżnicowaniu histopatologicznym G1 i G2 leczenie można ograniczyć tylko do leczenia chirurgicznego, pod warunkiem wykonania prawidłowego stagingu [102-104]. U pacjentek, które chcą zachować płodność, w stopniu IA i zróżnicowaniu G1 można wykonać operację oszczędzającą (jednostronne usunięcie przydatków oraz pobranie wycinków z drugiego, niezmiennego jajnika) [103-105].

W zaawansowanym raku jajnika leczenie powinno być przeprowadzone w wyspecjalizowanych ośrodkach. Najlepsze wyniki leczenia uzyskiwane są wówczas, gdy pacjentce pierwotny zabieg cytoredukcyjny przeprowadza ginekolog onkolog [106-108].

1.7.2. CHEMIOTERAPIA

Podczas następowej chemioterapii w leczeniu raka jajnika należy za standard przyjąć zgodnie z zaleceniami NCI oraz NCCN: paklitaksel wraz z karboplatiną (w schemacie co 3 tygodnie 6 cykli). Włączenie paklitakselu do leczenia pierwszego rzutu obniżyło ryzyko zgonu o 30% [109].

Za opcję alternatywną można uznać docetaksel z karboplatiną i paklitaksel z cisplatiną. Badania porównujące zastosowanie karboplatyny i cisplatiny w połączeniu paklitakselem wykazały lepszą tolerancję przy zastosowaniu karboplatyny [110]. W 2006 roku NCI (National Cancer Institute) po opublikowaniu wyników badania GOG-172 wydał zalecenia dotyczące stosowania chemioterapii dootrzewnowej u chorych na raka jajnika. W badaniu GOG-172 w grupie chorych, u których zastosowano chemioterapię dootrzewnową średnie całkowite przeżycie wyniosło 66,9 miesięcy, natomiast w grupie leczonej chemioterapią dożylną 49,5 miesięcy [111].

W Klinice Ginekologii Onkologicznej Poznańskiego Uniwersytetu Medycznego stosujemy chemioterapię dootrzewnową z dużym powodzeniem.

Pacjentki, u których stwierdza się nawrót choroby w okresie krótszym niż 6 miesięcy od zakończenia chemioterapii pierwszego rzutu zalicza się do grupy odpornej na pochodne platyny, a jeśli progresję lub stabilizację choroby stwierdza się w trakcie chemioterapii pierwszego rzutu, pacjentki zaliczamy do grupy pierwotnie odpornej.

W tej grupie leczeniem kolejnej linii mogą być: topotekan, liposomalna doksorubicyna, gemcytabina.

Chore, u których do nawrotu choroby dochodzi w okresie dłuższym niż 6 miesięcy, zalicza się do grupy platynowrażliwej. U tych pacjentek zalecany jest ponowny schemat paklitaksel i pochodne platyny (ICON-4) [112].

2. CEL PRACY

- 1.** Ocena ekspresji *SDF1 v1-4* i *CXCR4 v1-2* u kobiet z rakiem jajnika w porównaniu z ekspresją w jajnikach kobiet grupy kontrolnej.
- 2.** Ocena stężeń SDF1 w surowicy kobiet chorych na raka jajnika przed operacją, po operacji (6 doba) i po chemioterapii I-go rzutu (w 6 cyklach co 3 tygodnie)
- 3.** Ocena stężeń SDF1 w surowicy kobiet z rakiem jajnika w zależności od typu i zróżnicowania histopatologicznego, zaawansowania klinicznego nowotworu oraz obecności wodobrzusza.
- 4.** Porównanie stężeń SDF1 i CA125 w analizowanych grupach chorych.

3. MATERIAŁ I METODY

Badaniami zostało objętych 113. kobiet operowanych w Katedrze Onkologii Klinice Onkologii UM w Poznaniu:

- I grupa badana – 27 pacjentek,
- I grupa kontrolna – 13 pacjentek,
- II grupa badana – 43 pacjentki,
- II grupa kontrolna – 30 pacjentek.

Badania histopatologiczne wykonano w Zakładzie Patologii Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Onkologii w Poznaniu pod kierownictwem prof. dr hab. n. med. Jana Bręborowicza.

Oznaczenia wykonano w Katedrze Histologii i Embriologii UM w Poznaniu pod kierownictwem prof. dr hab. n. med. Ludwika K. Malendowicza.

Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej UM w Poznaniu.

Nr uchwały 164/11 z dn. 17.02.2011.

3.1. CHARAKTERYSTYKA I GRUPY

3.1.1. I GRUPA BADANA

Pierwszą grupą badaną stanowiło 27 pacjentek operowanych w Katedrze Onkologii Klinice Onkologii UM w Poznaniu z powodu raka jajnika.

Średnia wieku w tej grupie wynosiła 62 lata (od 47 do 85 roku życia).

W badanej grupie najwięcej było pacjentek z rakiem jajnika surowiczym w stopniu zaawansowania klinicznego III, o niskim stopniu zróżnicowania. Dokładną charakterystykę grupy przedstawia tabela nr 2.

3.1.1. I GRUPA KONTROLNA

Pierwszą grupę kontrolną stanowiło 13 kobiet operowanych w Klinice Onkologii UM w Poznaniu z powodu mięśniaków macicy lub wypadania narządu rodnego po menopauzie. Średnia wieku tych pacjentek to 63 lata (od 51 do 77 roku życia). Podczas operacji pobierano pacjentkom z grupy badanej fragment guza jajnika (ok. 0,5 cm³), a pacjentkom z grupy kontrolnej fragment jajnika (ok. 0,5 cm³). Następnie fragmenty te umieszczano w pojemnikach z płynem RNA later i zamrażano je w temperaturze -70°C.

Tabela 2. Charakterystyka I grupy badanej

CHARAKTERYSTYKA	PACJENTKI (n=27)
Wiek	
-zakres	47-85 lat
-średnia	62 lata
Dojrzałość guza	
G1	3
G2	11
G3	23
FIGO	
I	2
II	4
III	18
IV	3
Histopatologia	
- <i>Adenocarcinoma serosum</i>	18
- <i>Adenocarcinoma mucinosum</i>	3
- <i>Adenocarcinoma endometrioides</i>	4
- <i>Adenocarcinoma clarocellulare</i>	2

3.2. IZOLACJA RNA

Zebrane tkanki rozmrażano i usuwano płyn RNA later. Przeprowadzono homogenizację materiału stosując 0,5 ml odczynnika lizującego TriReagent, następnie próbki przenoszono do probówek o objętości 1,5 ml. Dodawano 100 μ l chloroformu, energicznie wytrząsano przez 20 s, wirowano przy 12.000x g przez 15 min. w temp. 4° C. Górną frakcję zawierającą RNA przenoszono do nowych probówek oraz wytrącano z fazy wodnej przez dodawanie 0,5 ml izopropanolu. Całość inkubowano przez godzinę w temp. -20° C, po czym wirowano przy 12000x g przez 20 min. w temp. 4° C, usuwano supernatant, po czym dodawano 1 ml 70% etanolu. Mieszaninę energicznie wytrząsano przez 20 s i następnie wirowano przy 12000x g przez 15 min w temp. 4° C. Przemycanie etanolem powtarzano, następnie osad RNA suszono, po czym rozpuszczano go w 20 μ l wody. Pozostałości DNA usuwano za pomocą trawienia DNAzą. RNA oczyszczano z mieszaniny reakcyjnej poprzez wirowanie na kolumnkach. Związane z membraną kolumniek RNA wypłukiwano 20. μ l wody. Za pomocą spektrofotometru określano stężenie wyizolowanego RNA, a następnie sprawdzano jego jakość poprzez rozdział elektroforetyczny na 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny.

3.3. ODWROTNA TRANSKRYPCJA

Do mieszaniny reakcyjnej dodawano 1 μ g wcześniej wyizolowanego RNA, 1 μ l startera (dT)₁₈ i wodę dejonizowaną, do końcowej objętości 10 μ l, inkubowano przez 5 min w temp. 70° C, a następnie schładzano na lodzie. W zależności od liczby badanych prób przygotowywano mieszaninę reakcyjną w odpowiedniej proporcji. Dla pojedynczej próby jej skład zawierał: 4 μ l buforu reakcyjnego, 1 μ l 20 U/ μ l inhibitora RNaz i 2 μ l 10 mM dNTP oraz 2 μ l 200 U/ μ l odwrotnej transkryptazy AMV. Dla reakcji kontrolnych (-RT) przeprowadzano dokładnie tę samą procedurę z zastąpieniem odwrotnej transkryptazy taką samą objętością wody. Reakcję przeprowadzano z

użyciem termocyklera UNO II (Biometra) w temperaturze 42° C w czasie 60 min. Uzyskane cDNA wykorzystywano do tradycyjnej reakcji PCR jak i PCR w czasie rzeczywistym (QPCR) z systemem detekcji poprzez fluorescencję barwnika SYBR green.

3.4. QPCR

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym (QPCR lub Real-Time PCR) przeprowadzano na urządzeniu Lightcycler 2.0 firmy ROCHE. Teoretycznie założenie tej metody opiera się na analizie kinetyki reakcji PCR, gdzie ilość produktu (N_n) zależy od ilości cykli (n), początkowej ilości matrycy (N_0) oraz od wydajności reakcji amplifikacji oszacowanej na podstawie krzywej standardowej (E). Teoretycznie maksymalna wydajności reakcji (E) równa się 2, tzn. każda cząsteczka matrycy daje w wyniku jednego cyklu amplifikacji dwie cząsteczki potomne, jednakże w rzeczywistych warunkach reakcji różne czynniki mogą obniżać (np. inhibitory) lub podwyższać (np. reakcje niespecyficzne) wydajność reakcji. Rzeczywistą wydajność reakcji określa się na podstawie krzywej standardowej wykreślanej po amplifikacji serii kolejnych rozcieńczeń cDNA lub wcześniej uzyskanych produktów PCR. Do detekcji przyrostu produktu PCR użyto barwnika SYBR Green, który interkalując z dwuniciowym DNA emituje fluorescencję. Ponieważ barwnik ten może wiązać się również z niespecyficznymi produktami PCR, dokonano analizy krzywej topnienia otrzymanych produktów oraz dokonano analizy elektroforetycznej wybranych prób. Uzyskane wyniki normalizowano względem genu referencyjnego (gen o stałej ekspresji we wszystkich analizowanych próbach, bez względu na warunki doświadczalne).

QPCR z zastosowaniem SYBR Green.

Każde 10 μ l mieszaniny reakcyjnej przypadającej na pojedynczą reakcję zawierało skład podanej w tabeli nr 3.

Składnik	Stężenie wyjściowe	Objętość [μl]
DNA Master SYBR Green I	10x	1
Mieszanina starterów L+P	5 μM każdy	1
Matryca cDNA	-	1
MgCl ₂	25 mM	0,6
Woda dejonizowana	-	6,4
Objętość końcowa	-	10

Tabela 3. Skład mieszaniny reakcyjnej dla QPCR z zastosowaniem SYBR Green.

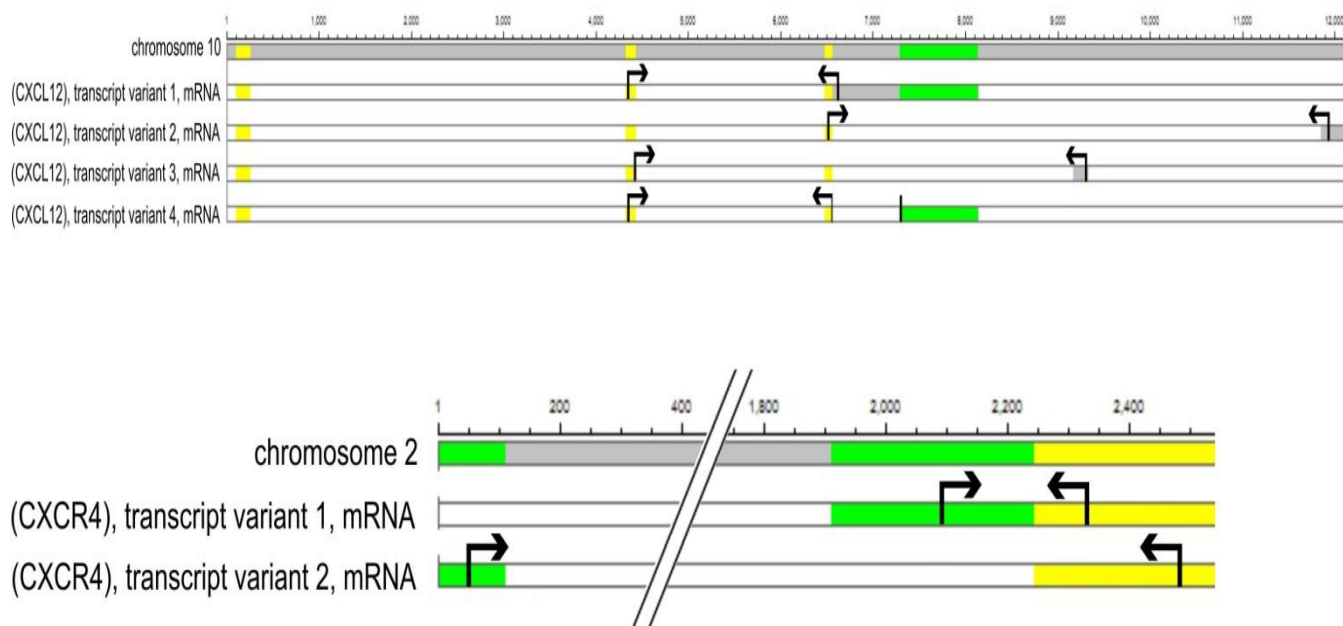
Startery zaprojektowano z wykorzystaniem programu Primer 3. Pierwszym etapem reakcji PCR w czasie rzeczywistym była 10-minutowa denaturacja mająca na celu aktywację polimerazy Taq DNA. Bezpośrednio po niej przeprowadzano właściwą reakcję PCR składającą się z 45. cykli, w skład których wchodziły: denaturacja w temperaturze 95° C przez 10 s, przyłączanie startera w temperaturze 60° C przez 5 s oraz wydłużanie w temperaturze 72° C przez 7 s. W celu określenia specyficzności reakcji przeprowadzano analizę krzywej topnienia dla każdego z produktu reakcji, z dokładnością 0,1° C/s.

3.5. PRZYGOTOWANIE KRZYWEJ STANDARTOWEJ

W celu określenia efektywności reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla każdego z badanych genów przygotowano krzywą standardową. W tym celu wykorzystano produkty klasycznej reakcji PCR rozdzielone na 2% żelu agarozowym, które wyizolowano z żelu przy użyciu DNA gel extraction kit (MILLIPORE). Ilość uzyskanego w ten sposób DNA szacowano spektrofotometrycznie. Krzywe standardowe tworzono poprzez amplifikację seryjnych dziesięciokrotnych rozcieńczeń uzyskanego wcześniej cDNA dokładnie w tych samych warunkach reakcji jak badane próby.

Tabela 4. Charakterystyka starterów użytych w reakcji QPCR (sekwencje starterów sensownych (S), antysensownych (A) oraz sond typu tagman)

Startery					
cDNA	Numer dostępu Genbank	Starter	Sekwencja startera (5'-3')	Pozycja	Długość produktu PCR (pz)
(CXCL12), transcript variant 1	NM_199168	S A	TACAGATGCCCATGCCGATT GCCCTTTCATCTCTCACAAGG T	174-193 414-435	262
(CXCL12), transcript variant 2	NM_000609	S A	TGTGCATTGACCCGAAGCTA CAGGCCCTTCCCTAACACT	301-320 426-444	144
(CXCL12), transcript variant 3	NM_0010338 86	S A	ACTGTGCCCTTCAGATTGTAG CC AGCAAATTTACAAAGCGCCG AGA	253-275 490-512	260
(CXCL12), transcript variant 4	NM_0011781 34	S A	TACAGATGCCCATGCCGATT CGCTGATCAGGTTGTTTAAAG	174-193 349-369	196
(CXCR4), transcript variant 1	NM_0010085 40	S A	CTACATTAATTCTCTTGTGCC ATTTTCTTCACGGAAACAGG	175-195 396-415	241
(CXCR4), transcript variant 2	NM_003467	S A	CTGAGTGCTCCAGTAGCC TGCAGCCTGTACTTGTCC	61-68 314-331	281
MRLP19 (reference gene)	NM_014763	S A	TCCTCGGGTCCAGGAGATT CAAGCTATCATCCAGCCGTT T	529-547 566-586	58



Rycina 1. Lokalizacja zaprojektowanych starterów w obrębie analizowanych genów.

Pozycję startera zaznaczono strzałką. Pary starterów zostały zaprojektowane tak, aby w miarę możliwości obejmowały przynajmniej jeden intron oraz aby specyficznie amplifikowały jedną izoformę. Schemat przedstawia analizę porównania sekwencji poszczególnych izoform badanych genów do sekwencji chromosomowej (multiple alignment). Kolor żółty oznacza 100% homologię, kolor zielony – homologia z zakresu 99-50%, kolor szary – homologia poniżej 50%.

Uzyskane wyniki skłoniły mnie do dalszych badań, których celem były oznaczenia SDF1 w surowicy krwi u chorych na raka jajnika przed operacją, w szóstej dobie po operacji i po sześciu kursach chemioterapii pierwszorzutowej w porównaniu ze stężeniem SDF1 w surowicy kobiet z grupy kontrolnej.

3.6. CHARAKTERYSTYKA II GRUPY

3.6.1. II GRUPA BADANA

II grupę badaną stanowiły 43 pacjentki operowane w Klinice Onkologii UM w Poznaniu z powodu raka jajnika.

Najliczniejszą grupą były chore z surowiczym, nisko zróżnicowanym rakiem jajnika w stopniu zaawansowania klinicznego III wg FIGO.

Tabela 5. Charakterystyka II grupy badanej

CHARAKTERYSTYKA	PACJENTKI (n=43)
Wiek zakres średnia	41-84 57
Dojrzałość guza G1 G2 G3	3 13 27
FIGO I II III IV	6 3 32 2
HISTOPATOLOGIA - <i>Adenocarcinoma serosum</i> - <i>Adenocarcinoma mucinosum</i> , - <i>Adenocarcinoma endometrioides</i> , - <i>Adenocarcinoma clarocellulare</i> - <i>Adenocarcinoma solidum</i> , - inne	29 5 3 1 2 3

Tabela 6. Rodzaj wykonanej operacji u pacjentek z II grupy badanej

RODZAJ OPERACJI	PACJENTKI
Wycięcie macicy z przydatkami, siecią większą, węzłami chłonnymi miednicy mniejszej	2
Wycięcie macicy z przydatkami, siecią większą, wyrostkiem robaczkowym + założenie portu do chemioterapii dootrzewnowej	1 1
Wycięcie macicy z przydatkami, siecią większą + założenie poru do chemioterapii dootrzewnowej	8 9
Wycięcie obustronne przydatków, sieci większej + założenie portu do chemioterapii dootrzewnowej	10 3
Wycięcie obustronne przydatków, sieci większej i wyrostka robaczkowego	3
Laparotomia zwiadowcza z częściowym wycięciem jajników, biopsją sieci większej	4
Wycięcie sieci większej (stan po wycięciu macicy z przydatkami z powodu mięśniaków macicy)	1
Wycięcie obustronne przydatków, sieci większej (stan po wycięciu macicy z powodu mięśniaków macicy)	1

3.6.2. II GRUPA KONTROLNA

II grupą kontrolną było 30 kobiet operowanych w Klinice Onkologii UM w Poznaniu z innych powodów ginekologicznych, niż rak jajnika.

Średnia wieku 45 lat (od 38 do 72 roku życia) i pacjentki bez obciążeń chorobami nowotworowymi w wywiadzie.

U kobiet z II grupy badanej pobierano krew żylną z dołu łokciowego trzykrotnie:

- dzień przed operacją,
- na 6 dobę po operacji,
- po 6 cyklach chemioterapii.

Kobietom z grupy kontrolnej II pobierano krew jednorazowo. Krew odwirowywano, a uzyskaną surowicę zamrażano w temp. -70°C . Po skolekcjonowaniu surowic rozmrożono je i wykonano analizę immunoenzymatyczną stężenia SDF-1 w surowicy krwi.

3.7. ANALIZA IMMUNOENZYMATYCZNA STĘŻENIA SDF1 W SUROWICY KRWI

Stężenie SDF-1 oznaczono w surowicy krwi z użyciem komercyjnego zestawu (Human CXCL12/SDF-1 Immunoassay, R&D Systems, nr katalogowy DSA00). Oznaczenia dokonano według procedury opisanej przez producenta. Po uprzednim przygotowaniu płytek w kolejnych celkach umieszczono znane stężenia SDF-1 w dwóch powtórzeniach, rozpuszczalnik peptydu oraz próbki surowic pobranych od pacjentek i inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po trzykrotnym przepłukaniu płytek do każdej celki dodano przeciwciało przeciw SDF-1 sprzężone z enzymem. Po kolejnym cyklu płukania (Labsystem, Wellwash 4) do celek płytki dodano bezbarwny substrat. Uzyskano barwny produkt reakcji i po 30 minutach reakcja została zahamowana roztworem HCl. Absorbancję odczytano przy długości fali 540 nm w ciągu 10 min od zakończenia reakcji. Stężenie SDF-1 w badanych próbkach obliczono na podstawie uzyskanych wartości absorbancji w odniesieniu do wyznaczonej krzywej standardowej.

3.8. ANALIZA STATYSTYCZNA

Uzyskane wyniki stężeń SDF1 w surowicy 43 pacjentek chorych na raka jajnika porównano z grupą kontrolną (n=30) za pomocą testu U Manna - Whitneya, $\alpha=0,05$. Różnicę uznano za istotną statystycznie na poziomie $p<0,00001$.

Porównano również stężenia SDF1 w surowicy chorych na raka jajnika przed leczeniem, po operacji i po chemioterapii pierwszego rzutu za pomocą testu Wilcoxon, $\alpha=0,05$.

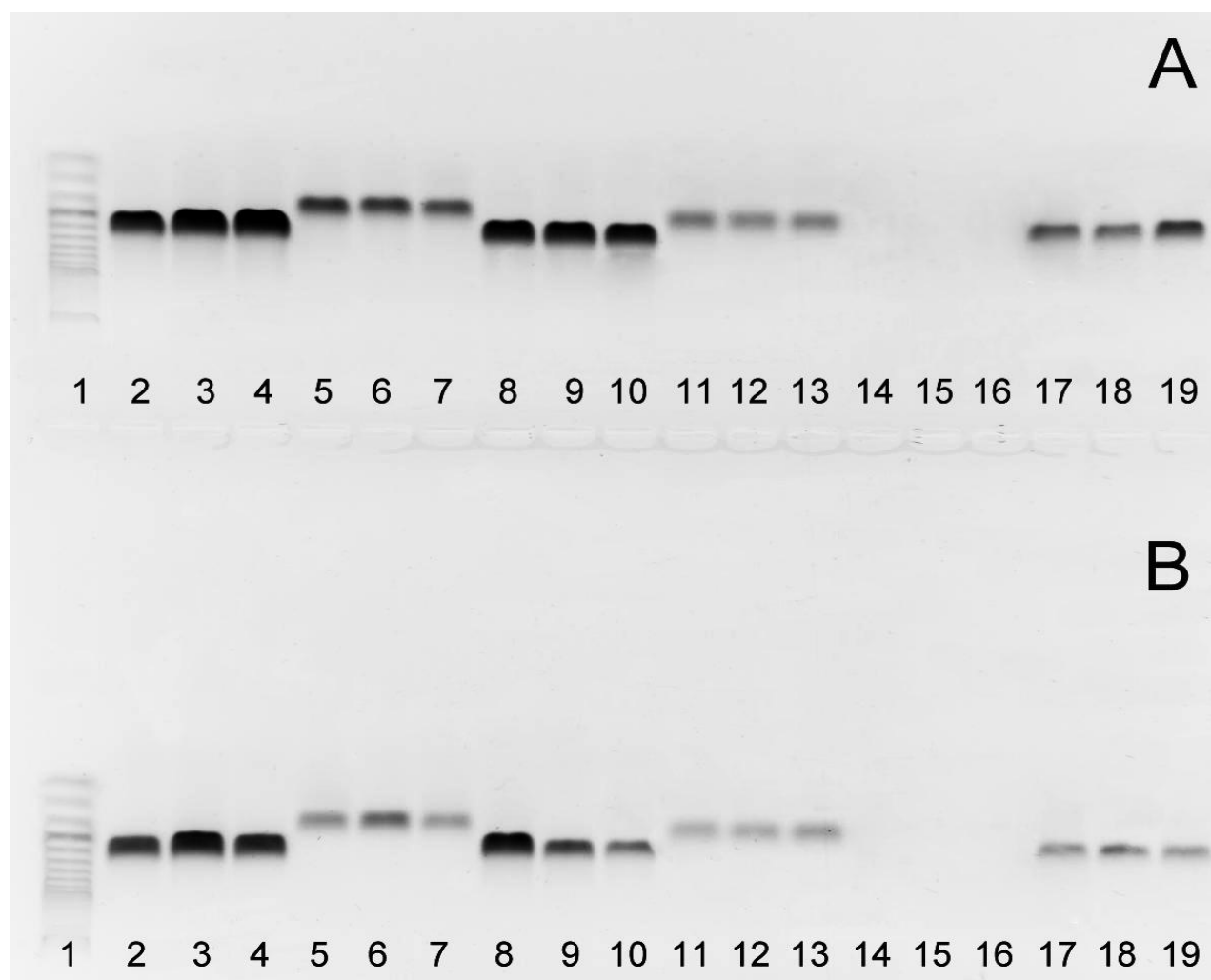
Przy użyciu testu U Manna – Whitneya, $\alpha=0,05$ szukano również różnic w stężeniach SDF1 dla kilku grup przed operacją, po operacji i po chemioterapii pierwszego rzutu.

Do obliczeń statystycznych używano programu Statistica 7.0.

4. WYNIKI

4.1. ANALIZA ELEKTROFORETYCZNA

Na rycinie 2 przedstawiono wyniki analizy elektroforetycznej trzech wybranych produktów reakcji PCR. Stwierdziłam ekspresję obu wariantów *SDF1* oraz receptora *CXCR* ν 1-3 w grupie kontrolnej oraz w grupie z rakiem jajnika. Ekspresja receptora *CXCR4* ν 4 nie wystąpiła w żadnej z badanych grup.



Rycina 2. Wynik analizy elektroforetycznej trzech wybranych produktów reakcji PCR. Panel A – nowotwory jajnika, panel B – grupa kontrolna.
1- marker mas; 2,3,4- *SDF1*, transcript variant 1; 5,6,7- *SDF1*, transcript variant 2; 8,9,10- *SDF1*, transcript variant 3; 11,12,13- *SDF1*, transcript variant 4; 14,15,16- *CXCR4*, transcript variant 1; 17,18,19 - *CXCR4*, transcript variant 2.

4.2. EKSPRESJA *SDF1*

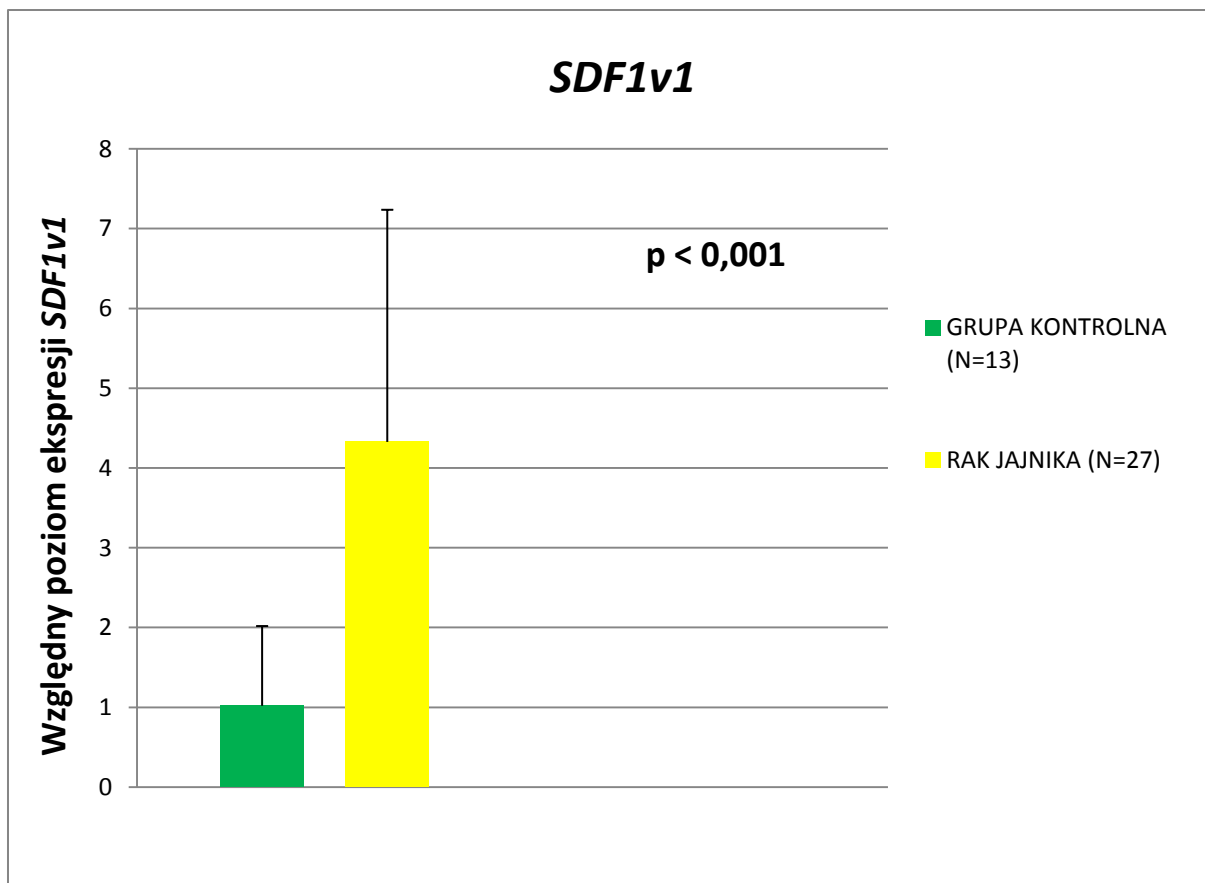
Za pomocą QPCR określono względny poziom ekspresji *SDF1* w badanych grupach. W GENBANK-u dostępne są cztery warianty *SDF1*. Dlatego w pracy określono ekspresję wszystkich wariantów *SDF1v1-4*.

4.2.1. EKSPRESJA *SDF1v1*

Ekspresja *SDF1v1* obecna była w tkankach grupy kontrolnej i w raku jajnika. Przedstawiono te zależności na wykresie 1. Względny poziom ekspresji *SDF1v1* był istotnie statystycznie wyższy u pacjentek z rakiem jajnika w porównaniu z grupą kontrolną. Różnica statystyczna wyniosła $p < 0,001$.

4.2.2. EKSPRESJA *SDF1v2*

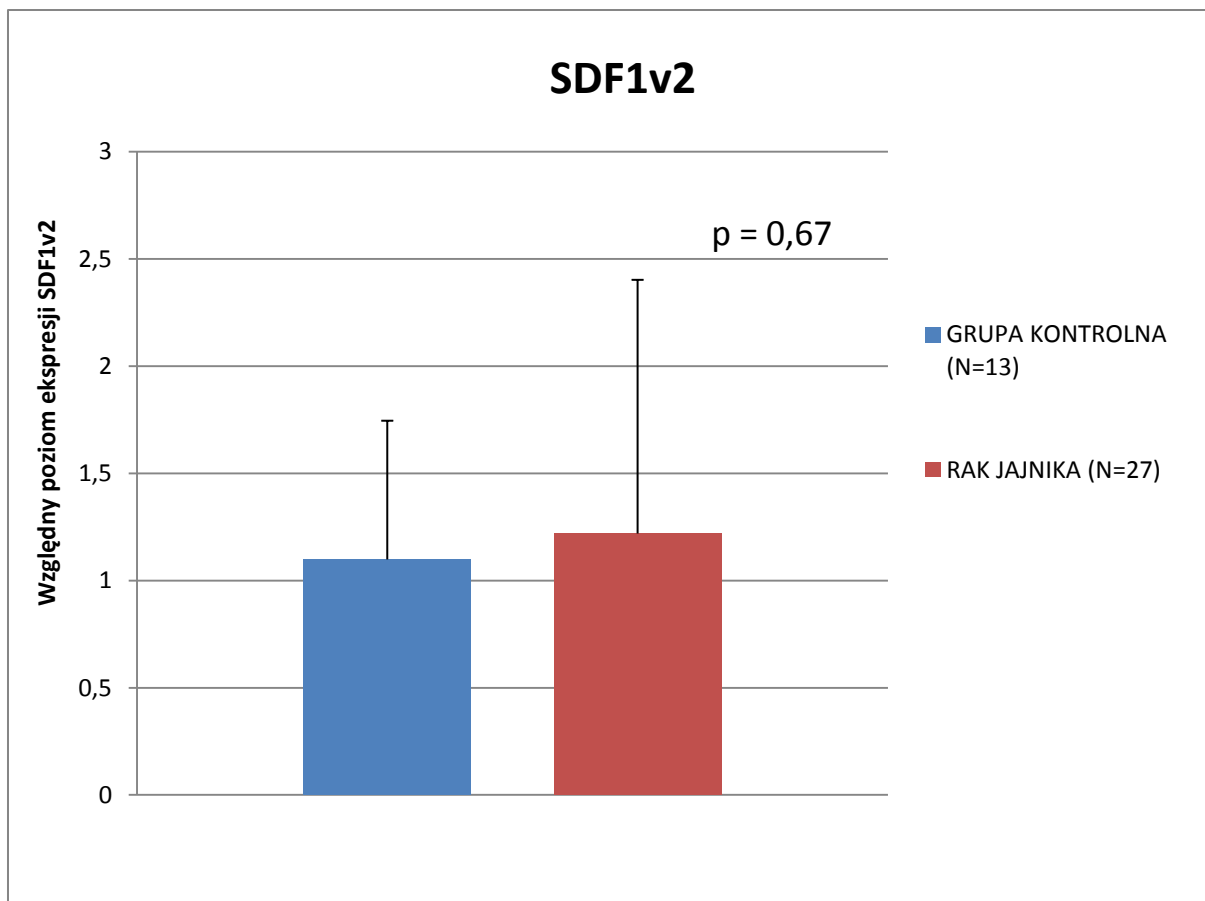
Ekspresja *SDF1v2* obecna była w obu grupach badanych. Natomiast względny poziom ekspresji *SDF1v2* był porównywalny w grupie kontrolnej oraz w grupie z rakiem jajnika i nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie.



Wykres 1. Względny poziom ekspresji *SDF1v1* w grupie kontrolnej i w raku jajnika. Słupki oznaczają średnią, zaznaczono także SD.

GRUPA (N)	BRAK EKSPRESJI	ŚREDNIA WARTOŚĆ W GRUPIE	ODCHYLENIE STANDARDOWE	SEM średni błąd pomiaru	P
Rak jajnika (N=27)	0	4,328	2,910	0,560	p < 0.001
Grupa kontrolna (N=13)	0	1,020	1,223	0,339	

Tabela 7. Ekspresja *SDF1 v1* w raku jajnika i w grupie kontrolnej.



Wykres 2. Względny poziom ekspresji *SDF1 v2* w grupie kontrolnej i w raku jajnika. Słupki przedstawiają średnią. Zaznaczono także SD.

GRUPA (N)	BRAK EKSPRESJI	ŚREDNIA WARTOŚĆ W GRUPIE	ODCHYLENIE STANDARDOWE	SEM średni błąd pomiaru	P
Rak jajnika (N=27)	0	1,220	1,183	0,328	p = 0,677
Grupa kontrolna (N=13)	0	1,099	0,647	0,124	

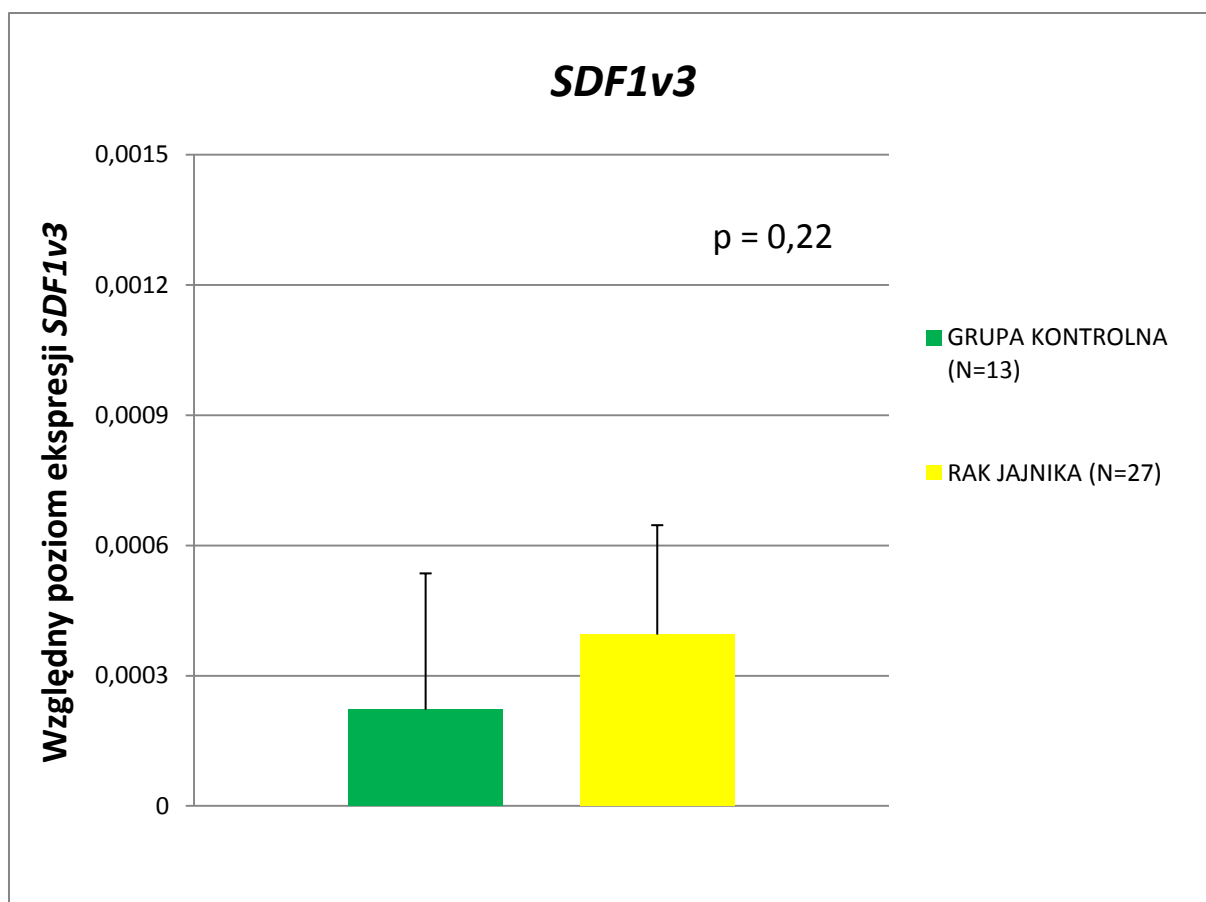
Tabela 8. Ekspresja *SDF1 v2* w raku jajnika i w grupie kontrolnej.

4.2.3. EKSPRESJA *SDF1v3*

Ekspresja *SDF1v3* obecna była w obu grupach badanych. Natomiast względny poziom ekspresji *SDF1v3* był porównywalny w grupie kontrolnej oraz w grupie z rakiem jajnika i nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie. Wyniki zostały przedstawiono w tabeli 9 oraz na wykresie 3.

4.2.4. EKSPRESJA *SDF1v4*

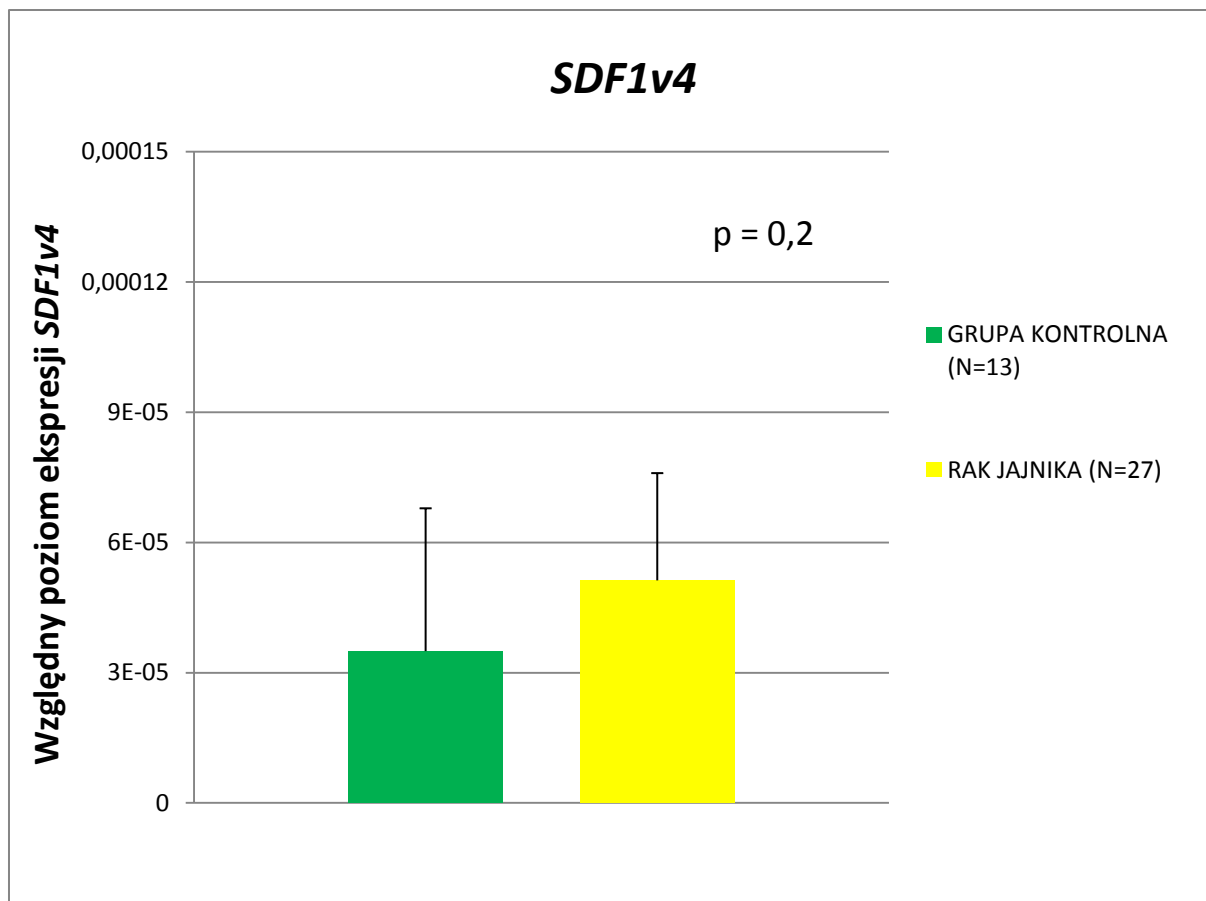
Podobnie, jak w przypadku ekspresji *SDF1v2* i 3 ekspresja *SDF1v4* obecna była w grupie kontrolnej i w grupie z rakiem jajnika. Natomiast względny poziom ekspresji *SDF1v4* był porównywalny w grupie kontrolnej oraz w grupie z rakiem jajnika i nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie. Wyniki zostały przedstawiono w tabeli 10 oraz na wykresie 4.



Wykres 3. Względny poziom ekspresji *SDF1 v3* w grupie kontrolnej i w raku jajnika. Słupki przedstawiają średnią. Zaznaczono także SD.

GRUPA (N)	BRAK EKSPRESJI	ŚREDNIA WARTOŚĆ W GRUPIE	ODCHYLENIE STANDARDOWE	SEM średni błąd pomiaru	P
Rak jajnika (N=27)	17	0,000395	0,000314	0,000119	p = 0,228
Grupa kontrolna (N=13)	4	0,000222	0,000252	0,0000796	

Tabela 9. Ekspresja *SDF1v3* w raku jajnika i w grupie kontrolnej .



Wykres 4. Względny poziom ekspresji *SDF1 v4* w grupie kontrolnej i w raku jajnika. Słupki przedstawiają średnią. Zaznaczono także SD.

GRUPA (N)	BRAK EKSPRESJI	ŚREDNIA WARTOŚĆ W GRUPIE	ODCHYLENIE STANDARDOWE	SEM Średni błąd pomiaru	P
Rak jajnika (N=27)	10	0,0000513	0,0000329	0,00000822	p=0,208
Grupa kontrolna (N=13)	4	0,0000350	0,0000247	0,00000823	

Tabela 10. Ekspresja *SDF1v4* w raku jajnika i w grupie kontrolnej.

4.3. EKSPRESJA CXCR4

Za pomocą QPCR określiłam względny poziom ekspresji *CXCR4* w badanych grupach.

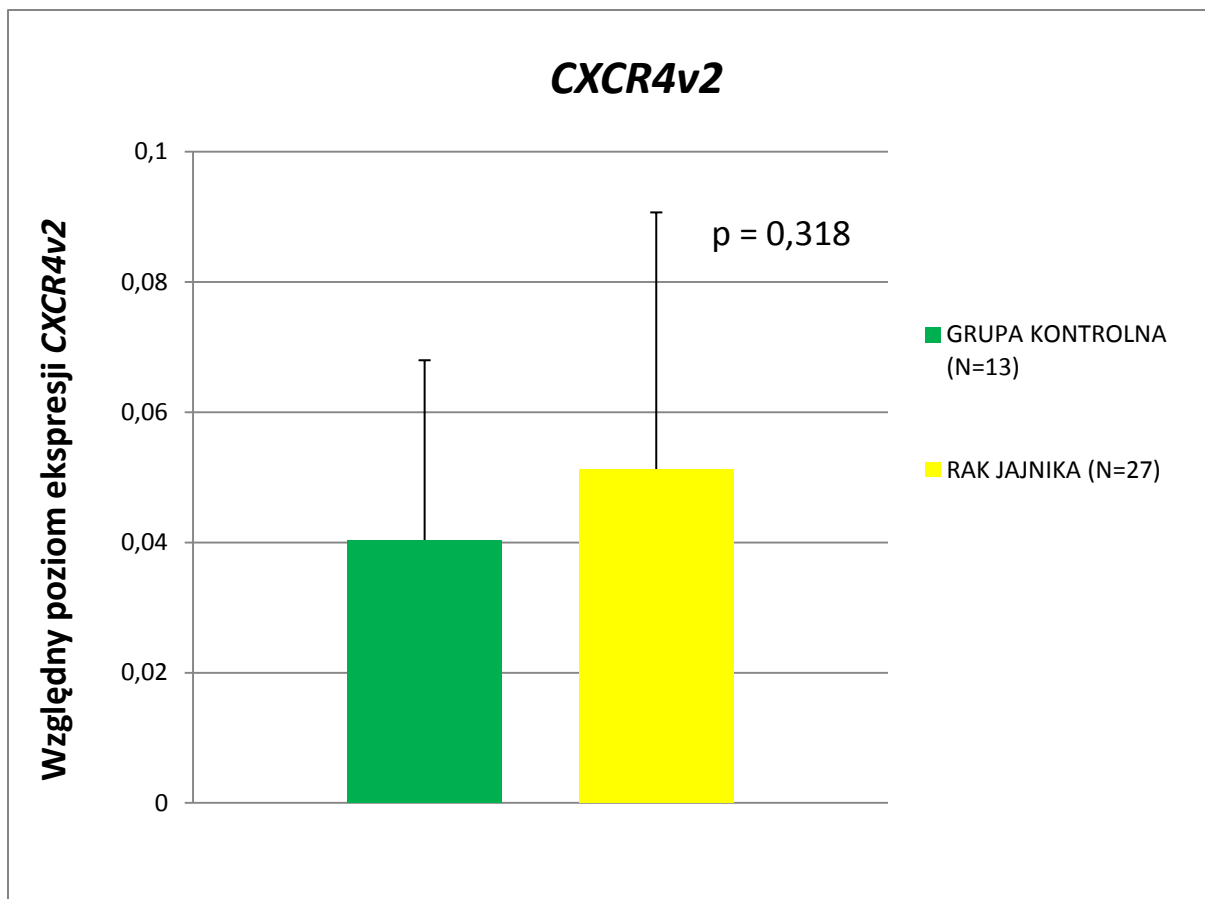
W GENBANK-u dostępne są dwa warianty *CXCR4*. Dlatego w pracy określono ekspresję wszystkich wariantów *CXCR4v1-2*.

4.3.1. EKSPRESJA CXCR4v1

W analizie elektroforetycznej nie stwierdzono ekspresji receptora *CXCR4v1*.

4.3.2. EKSPRESJA CXCR4v2

Ekspresja *CXCR4v2* była obecna w obu grupach badanych. Natomiast względny poziom ekspresji *CXCR4v2* był porównywalny w grupie kontrolnej oraz w grupie z rakiem jajnika i nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie. Wyniki zostały przedstawiono w tabeli 11 oraz na wykresie 5.



Wykres 5. Względny poziom ekspresji *CXCR4 v2* w grupie kontrolnej i w raku jajnika. Słupki przedstawiają średnią, zaznaczono także SD.

GRUPA (N)	BRAK EKSPRESJI	ŚREDNIA WARTOŚĆ W GRUPIE	ODCHYLENIE STANDARDOWE	SEM Średni błąd pomiaru	P
Rak jajnika (N=27)	0	0,0513	0,0394	0,0109	p = 0,318
Grupa kontrolna (N=13)	0	0,0404	0,0276	0,00530	

Tabela 11. Ekspresja *CXCR4v2* w raku jajnika i w grupie kontrolnej.

4.4. STĘŻENIE SDF1

4.4.1. STĘŻENIE SDF1 PRZED OPERACJĄ

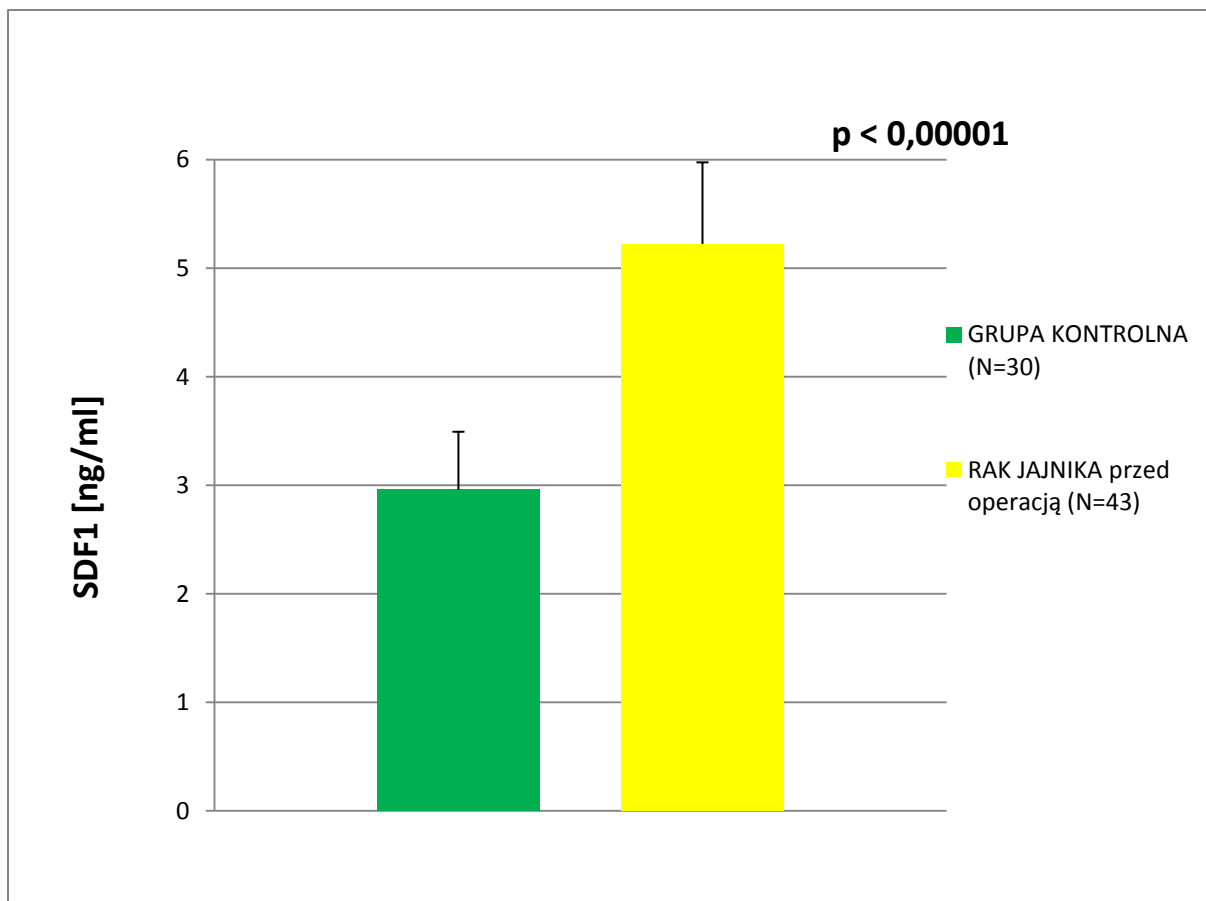
Stężenie SDF1 w surowicy krwi u pacjentek z rakiem jajnika przed operacją było wyższe niż w grupie kontrolnej i różniło się istotnie statystycznie ($p < 0,00001$). Wyniki przedstawiono w tabeli 12 i na wykresie 6.

4.4.2. STĘŻENIE SDF1 PO OPERACJI

W grupie z rakiem jajnika po operacji stężenie SDF1 było istotnie statystycznie wyższe ($p < 0,000024$) w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki umieszczono w tabeli 13 i na wykresie 7.

4.4.3. STĘŻENIE SDF1 PO CHEMIOTERAPII I RZUTU

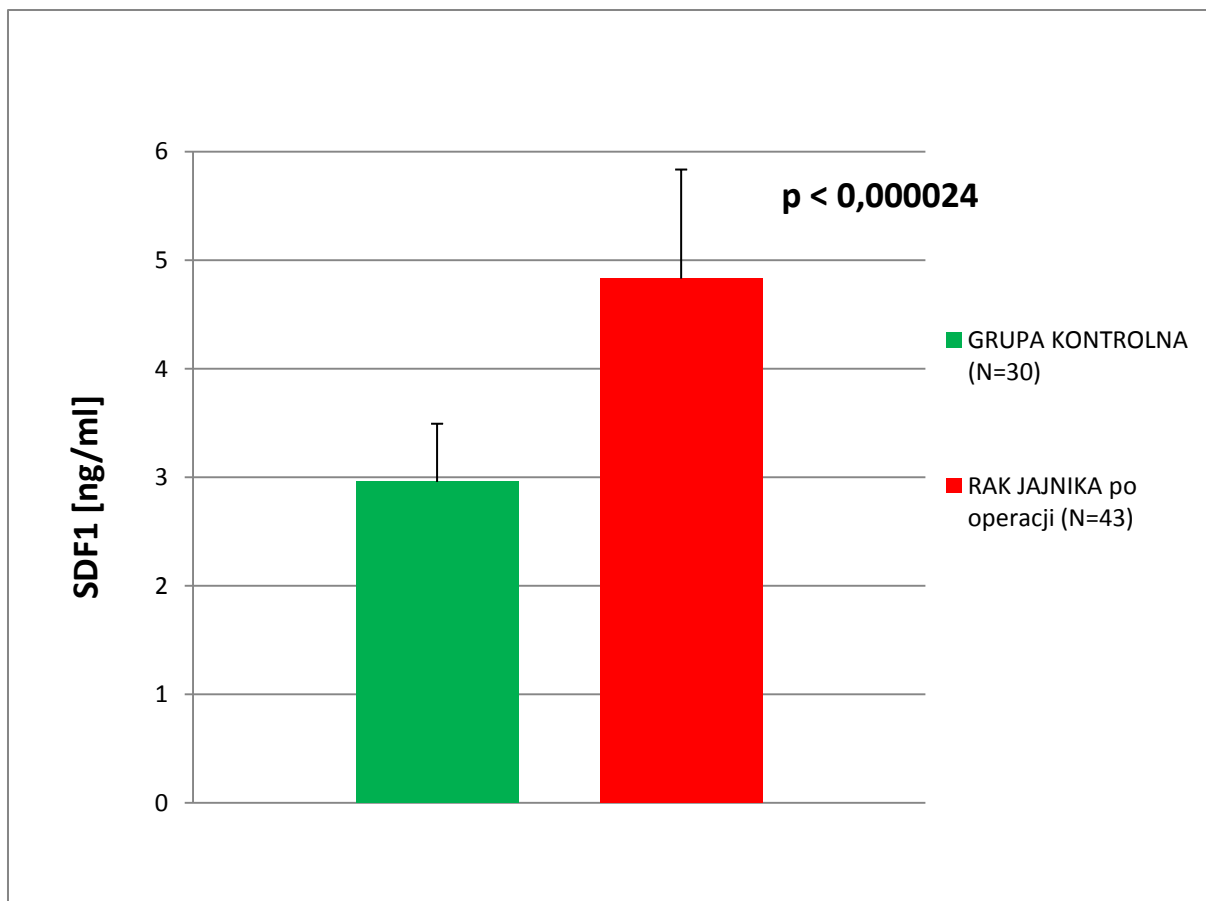
Stężenie SDF1 w surowicy krwi u pacjentek z rakiem jajnika po chemioterapii pierwszego rzutu było wyższe niż w grupie kontrolnej i różniło się istotnie statystycznie ($p < 0,000001$). Wyniki przedstawiono w tabeli 14 i na wykresie 8.



Wykres 6. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet z grupy kontrolnej i chorych na raka jajnika przed operacją. Słupki przedstawiają średnią, zaznaczono także SD.

GRUPA (N)	ŚREDNIE STĘŻENIE SDF1[ng/ml]	ODCHYLENIE STANDARDOWE	p
Rak jajnika (N=43) przed operacją	5,226	0,751	p< 0,00001
Grupa kontrolna (N=30)	2,959	0,536	

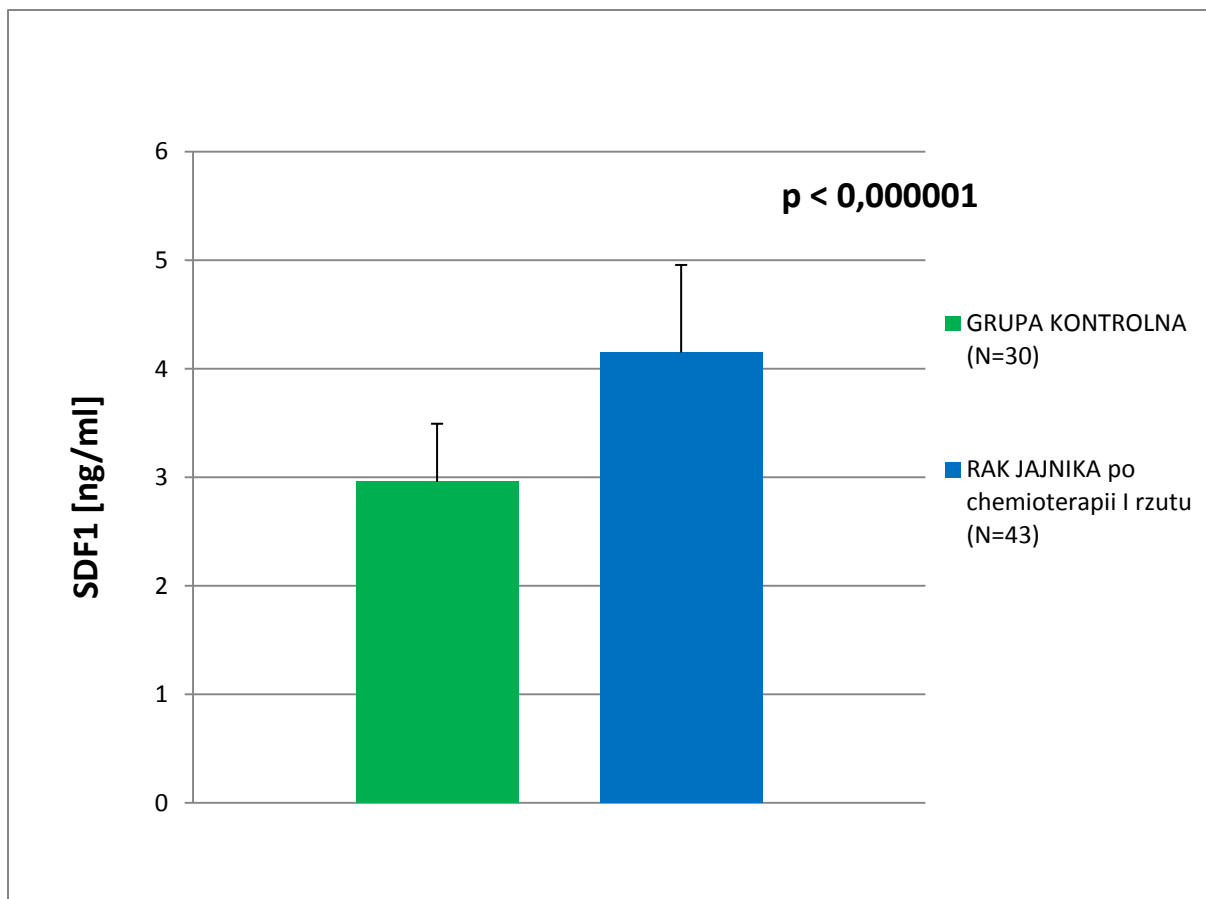
Tabela 12. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy krwi kobiet z grupy kontrolnej i chorych na raka jajnika przed operacją .



Wykres 7. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet z grupy kontrolnej i chorych na raka jajnika po operacji. Słupki przedstawiają średnią, zaznaczono także SD.

GRUPA (N)	ŚREDNIE STĘŻENIE SDF1[ng/ml]	ODCHYLENIE STANDARDOWE	p
Rak jajnika (N=43) po operacji	4,832	1,005	p < 0,000024
Grupa kontrolna (N=30)	2,959	0,536	

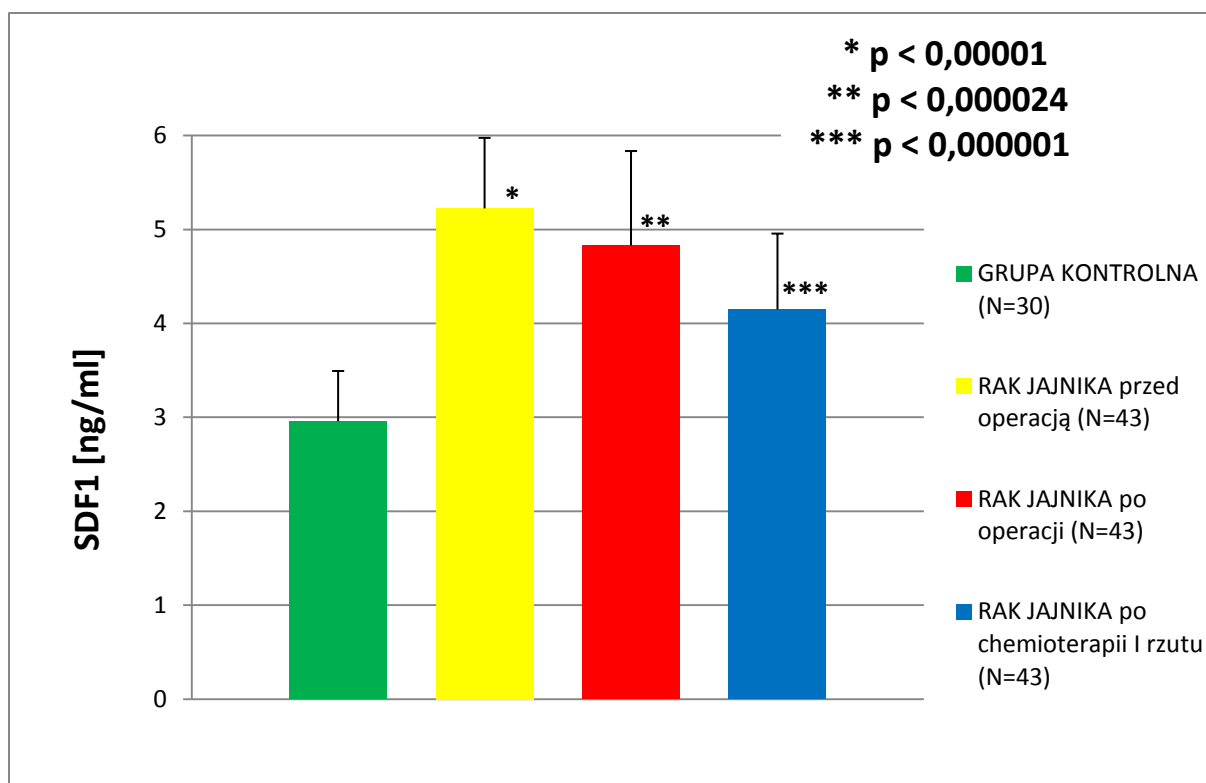
Tabela 13. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet z grupy kontrolnej i chorych na raka jajnika po operacji.



Wykres 8. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet grupy kontrolnej i chorych na raka jajnika po chemioterapii I rzutu. Słupki przedstawiają średnią, zaznaczono także SD.

GRUPA (N)	ŚREDNIE STĄŻENIE SDF1[ng/ml]	ODCHYLENIE STANDARDOWE	p
Rak jajnika (N=43) po chemioterapii	4,151	0,807	p < 0,000001
Grupa kontrolna (N=30)	2,959	0,536	

Tabela 14. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet grupy kontrolnej i chorych na raka jajnika po chemioterapii I rzutu



Wykres 9. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet grupy kontrolnej i chorych na raka jajnika przed operacją, po operacji, po chemioterapii I rzutu. Słupki przedstawiają średnią, zaznaczono także SD.

GRUPA (N)	ŚREDNIE STĘŻENIE SDF1[ng/ml]	ODCHYLENIE STANDARDOWE	GRUPA KONTROLNA + ODCHYLENIE STANDARDOWE	P
Rak jajnika (N=43) przed operacją	5,226	0,751	2,959+/-0,536	p< 0,00001
Rak jajnika (N=43) po operacji	4,832	1,005	2,959+/-0,536	p< 0,000024
Rak jajnika (N=43) po chemioterapii	4,151	0,807	2,959+/-0,536	p< 0,000001

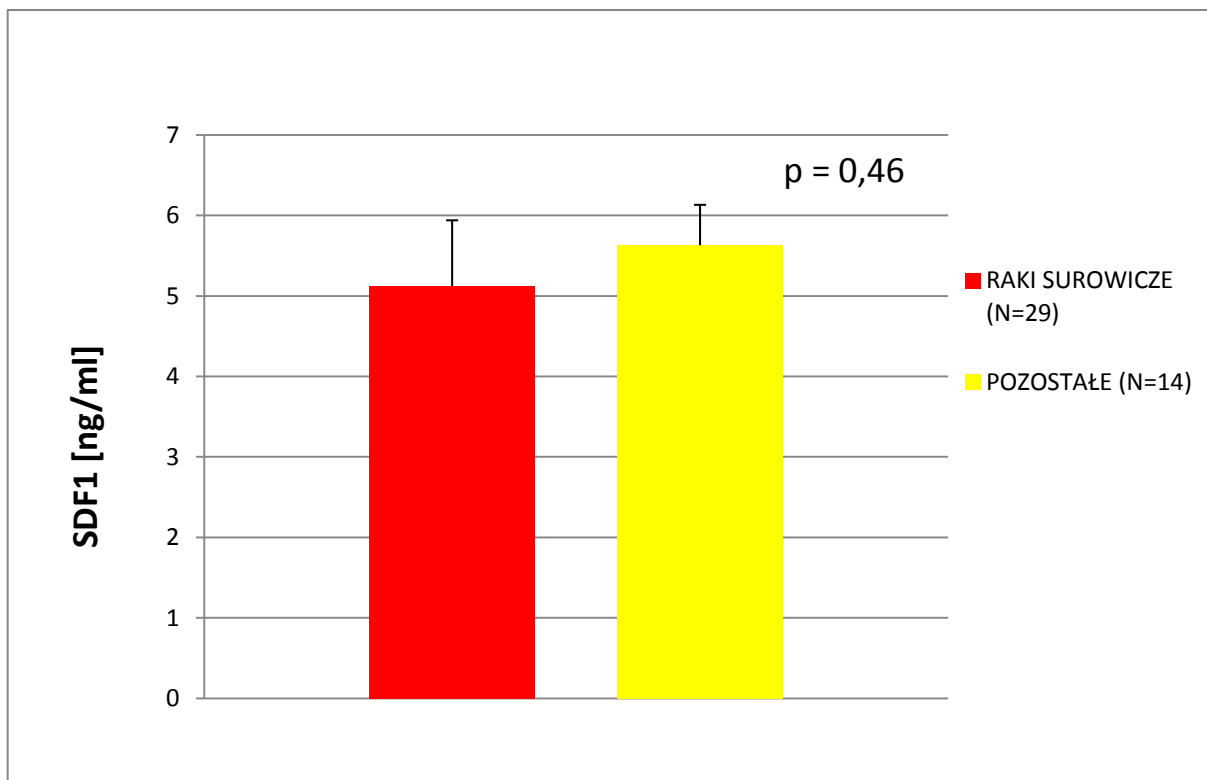
Tabela 15. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet grupy kontrolnej i chorych na raka jajnika przed operacją, po operacji, po chemioterapii I rzutu

Zatem stężenie SDF1 u chorych z rakiem jajnika było wyższe w porównaniu z grupą kontrolną zarówno przed operacją, po operacji, jak i po chemioterapii pierwszego rzutu. Była to różnica istotna statystycznie. Zbiorcze wyniki przedstawiono na wykresie 9 oraz w tabeli 15.

4.4.4. STĘŻENIE SDF1 A TYP HISTOLOGICZNY RAKA JAJNIKA

Szukano również różnic w stężeniu SDF1 (test U Manna-Whitneya, $\alpha=0,05$) w grupach podzielonych na raki surowicze i pozostałe przed operacją, po operacji i po chemioterapii.

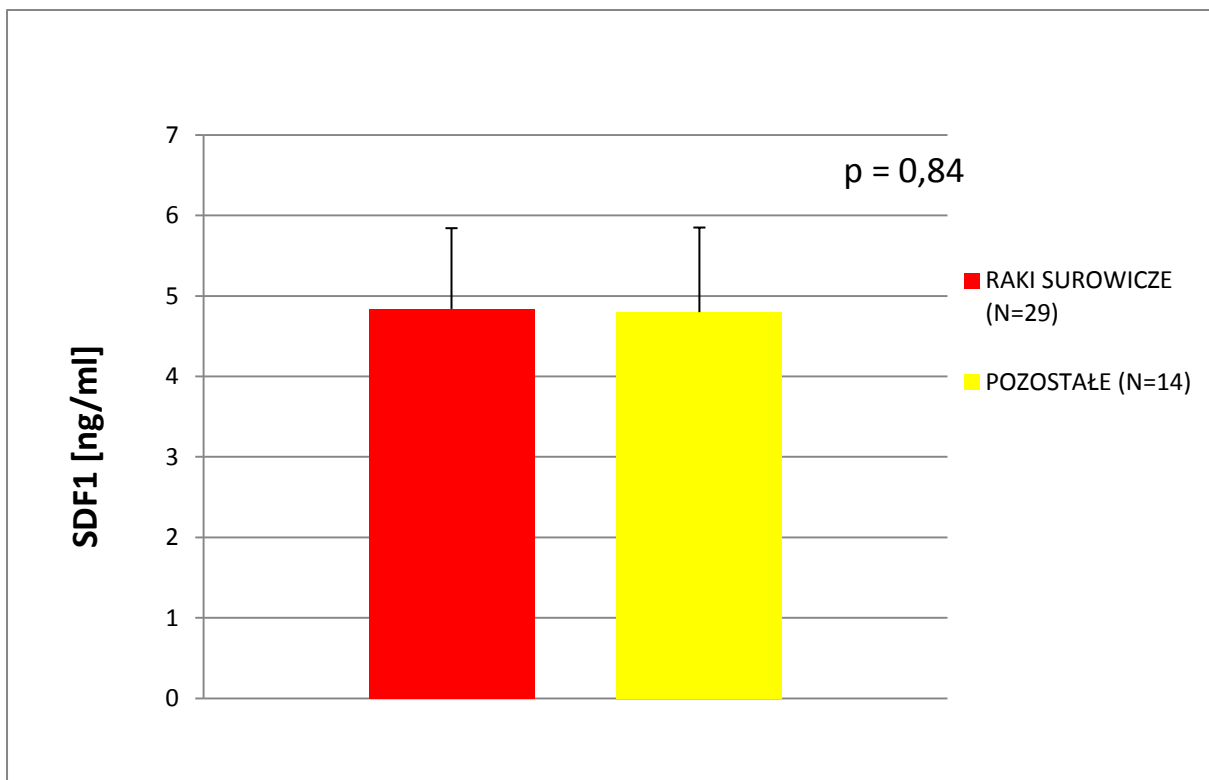
Grupa z rakiem surowiczym stanowiła 29 osób, podczas gdy pozostałe typy histopatologiczne stanowiły grupę 14 osób. W obu badanych grupach nie wykazano różnic istotnych statystycznie w stężeniu SDF1 przed operacją, po operacji i po chemioterapii pierwszego rzutu.



Wykres 10. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na surowiczego raka jajnika i na pozostałe typy histologiczne raka jajnika przed operacją. Słupki przedstawiają średnią, zaznaczono także SD.

GRUPA (N)	ŚREDNIE STĘŻENIE SDF1 [pg/ml] PRZED OPERACJĄ	ODCHYLENIE STANDARDOWE
Raki surowicze (N=29)	5,125	0,816
Raki pozostałe (N=14)	5,630	0,503
p	0,46	

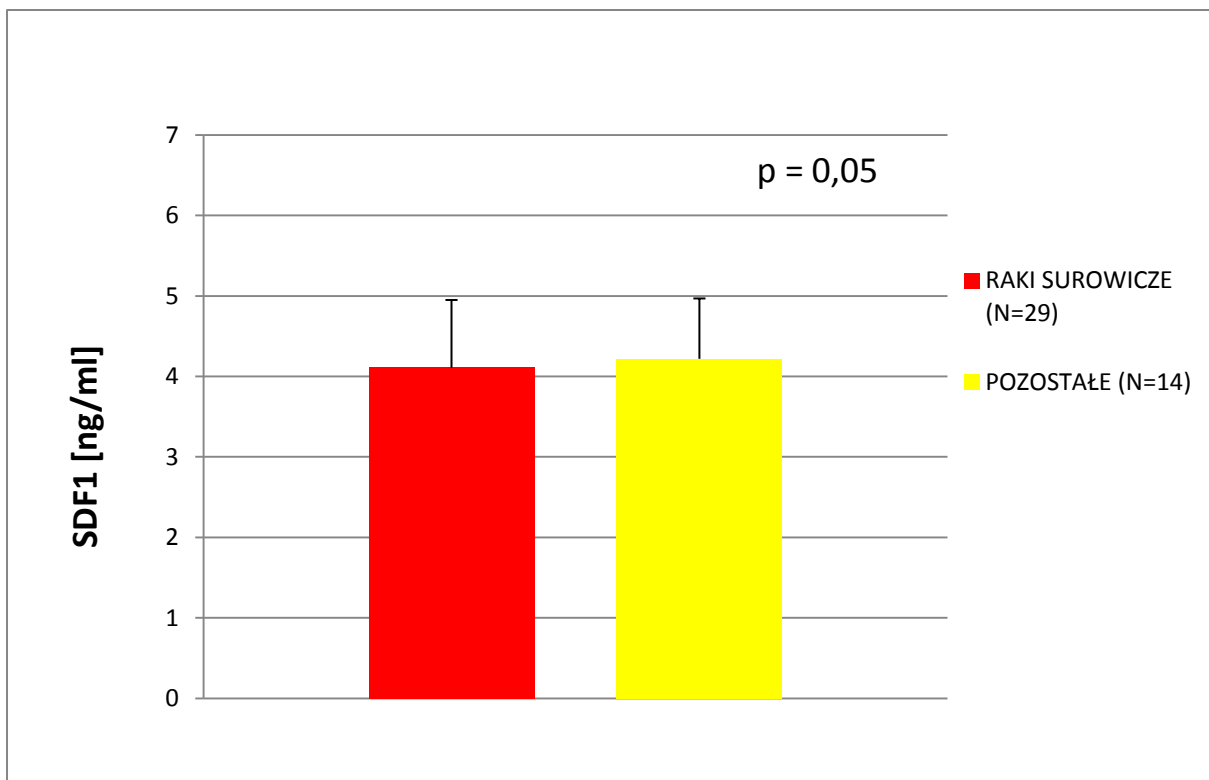
Tabela 16. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na surowiczego raka jajnika i na pozostałe typy histologiczne raka jajnika przed operacją.



Wykres 11. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na surowiczego raka jajnika i na pozostałe typy histologiczne raka jajnika po operacji. Słupki przedstawiają średnią, zaznaczono także SD.

GRUPA (N)	ŚREDNIE STĘŻENIE SDF1[ng/ml] PO OPERACJI	ODCHYLENIE STANDARDOWE
RAKI SUROWICZE (N=29)	4,84	1,003
RAKI POZOSTAŁE (N=14)	4,80	1,051
P	0,84	

Tabela 17. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na surowiczego raka jajnika i na pozostałe typy histologiczne raka jajnika po operacji.



Wykres 12. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na surowiczego raka jajnika i na pozostałe typy histologiczne raka jajnika po chemioterapii I rzutu. Słupki przedstawiają średnia, zaznaczono także SD.

GRUPA (N)	ŚREDNIE STĘŻENIE SDF1[ng/ml] PO CHEMIOTERAPII	ODCHYLENIE STANDARDOWE
RAKI SUROWICZE (N=29)	4,11	0,841
RAKI POZOSTAŁE (N=14)	4,22	0,750
p	0,05	

Tabela 18. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na surowiczego raka jajnika i na pozostałe typy histologiczne raka jajnika po chemioterapii I rzutu.

4.4.5. STĘŻENIE SDF1 A ZRÓŻNICOWANIE HISTOPATOLOGICZNE RAKA JAJNIKA

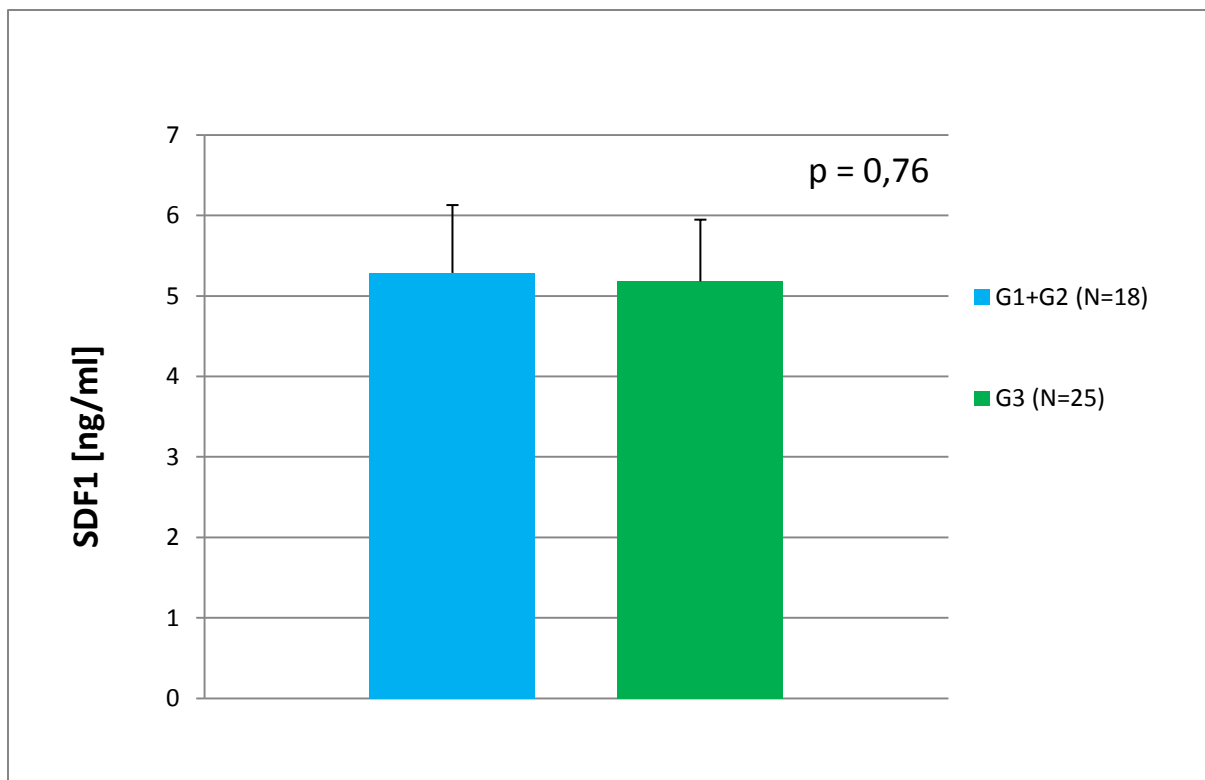
Grupa o wysokim stopniu zróżnicowania histopatologicznego (G1+G2) liczyła 18 pacjentek, natomiast grupa z rakiem o niskim stopniu zróżnicowania histopatologicznego stanowiła 25 pacjentek. Przed operacją, po operacji i po chemioterapii pierwszego rzutu w obu grupach badanych nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie.

4.4.6. STĘŻENIE SDF1 A STOPIEŃ ZAAWANSOWANIA KLINICZNEGO wg FIGO

Nie stwierdzono również różnic istotnych statystycznie w stężeniu SDF1 w surowicy krwi chorych na raka jajnika w niskim stopniu zaawansowania klinicznego wg FIGO (I i II) oraz w zaawansowanym raku jajnika (III i IV wg FIGO) zarówno przed operacją, po operacji i po chemioterapii pierwszego rzutu.

4.4.7. STĘŻENIE SDF1 A WODOBRZUSZE

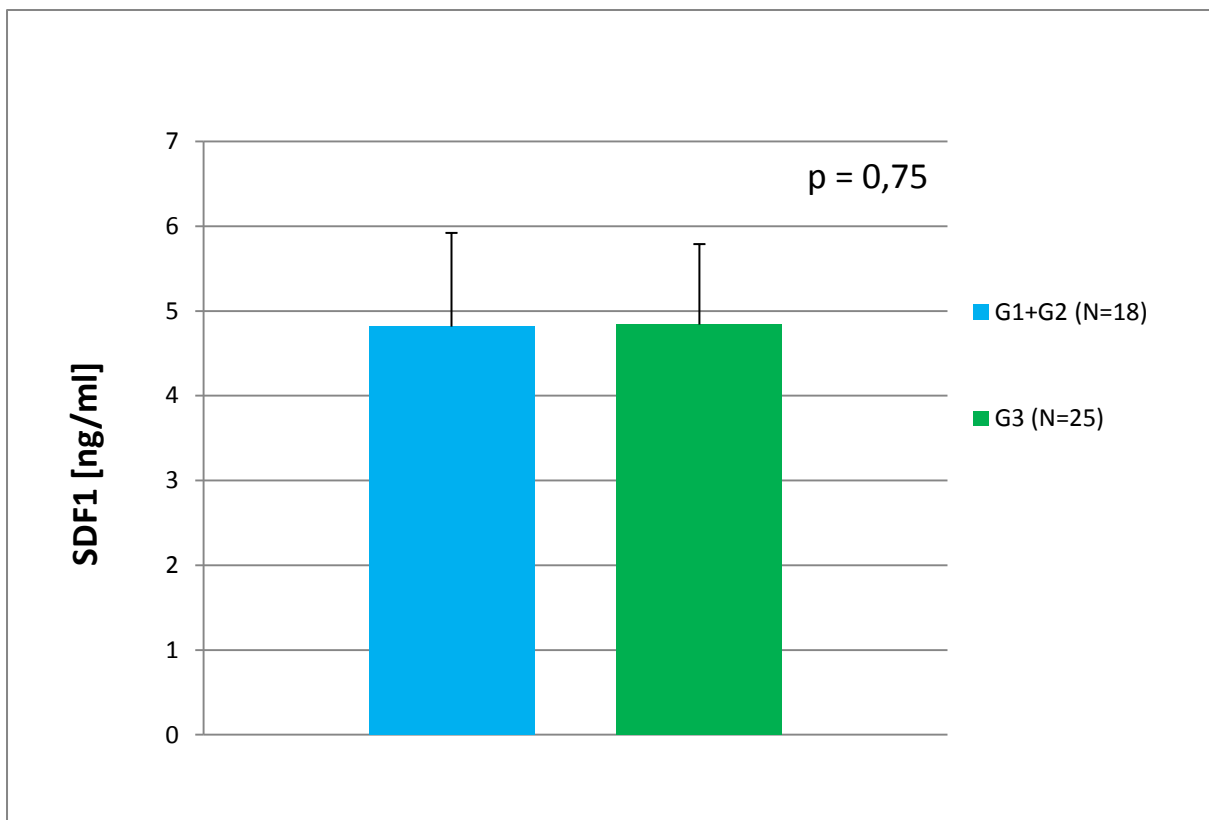
Zarówno w grupie pacjentek chorych na raka jajnika z wodobrzuszem, jak i bez wodobrzusza przed operacją, po operacji i po chemioterapii pierwszej linii nie stwierdza się różnic istotnych statystycznie w stężeniu SDF1.



Wykres 13. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika o zróżnicowaniu histopatologicznym (G1 +G2) i G3 przed operacją. Słupki przedstawiają średnią, zaznaczono także SD.

GRUPA (N)	ŚREDNIE STĘŻENIE SDF1[ng/ml] PRZED OPERACJĄ	ODCHYLENIE STANDARDOWE
G1+G2 (N=18)	5,287	0,843
G3 (N=25)	5,183	0,766
p	0,76	

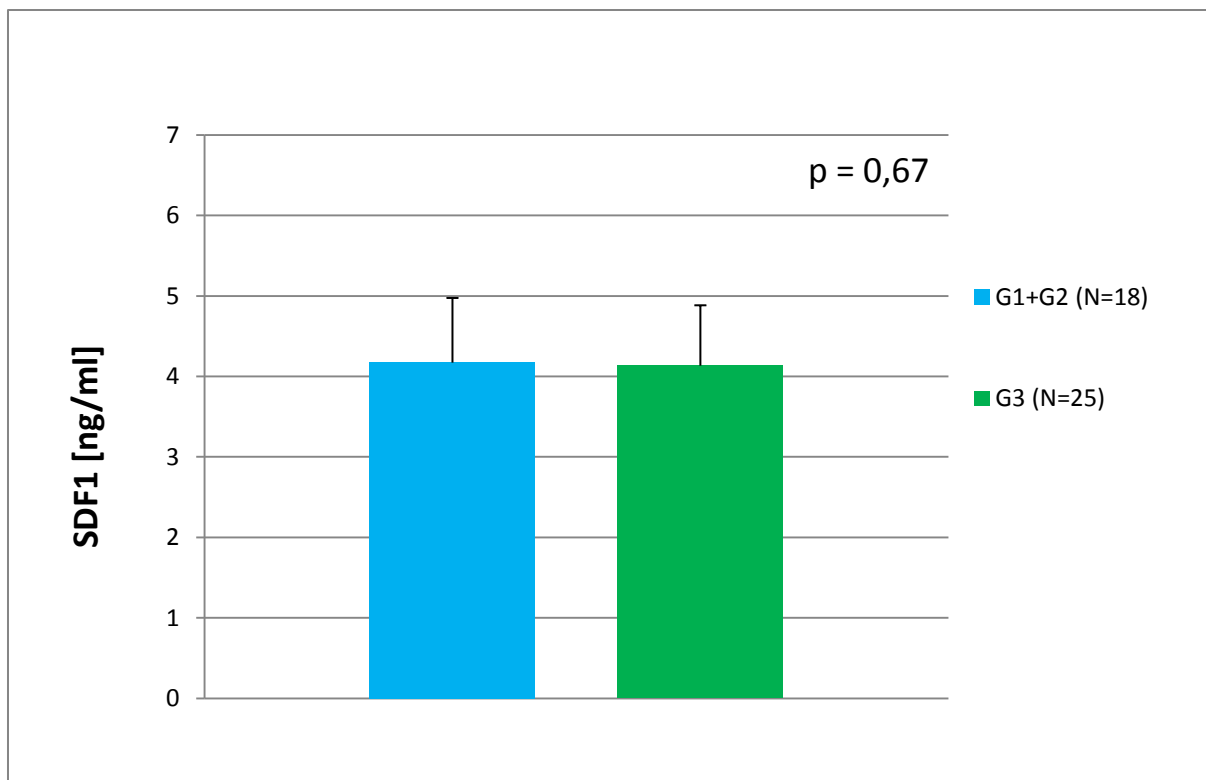
Tabela 19. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika o zróżnicowaniu histopatologicznym (G1 + G2) i G3 przed operacją .



Wykres 14. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika o zróżnicowaniu histopatologicznym (G1 +G2) i G3 po operacji. Słupki przedstawiają średnia, zaznaczono także SD.

GRUPA (N)	ŚREDNIE STĘŻENIE SDF1[ng/ml] PO OPERACJI	ODCHYLENIE STANDARDOWE
G1+G2 (N=18)	4,817	1,106
G3 (N=25)	4,842	0,949
p	0,75	

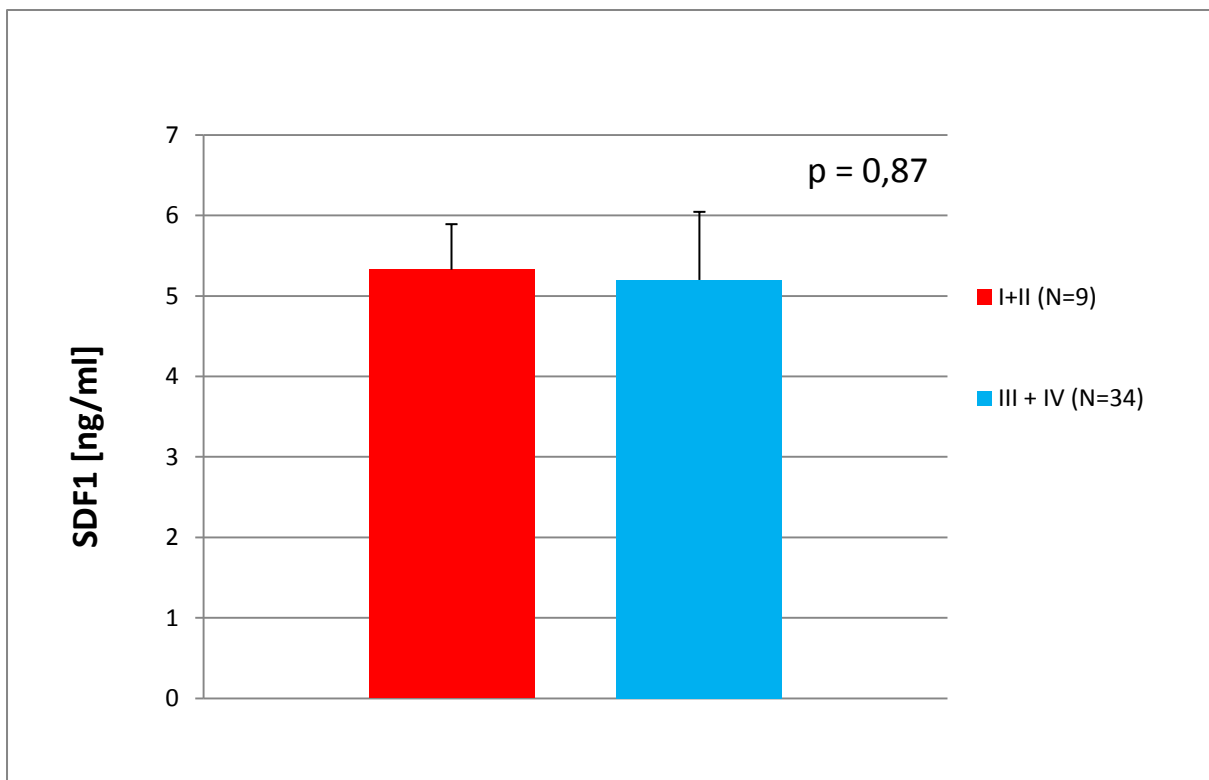
Tabela 20. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika o zróżnicowaniu histopatologicznym (G1 +G2) i G3 po operacji .



Wykres 15. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika o zróżnicowaniu histopatologicznym (G1 +G2) i G3 po chemioterapii I rzutu. Słupki przedstawiają średnią, zaznaczono także SD.

GRUPA (N)	ŚREDNIE STĘŻENIE SDF1[ng/ml] PO CHEMIOTERAPII I RZUTU	ODCHYLENIE STANDARDOWE
G1+G2 (N=18)	4,173	0,803
G3 (N=25)	4,135	0,750
p	0,67	

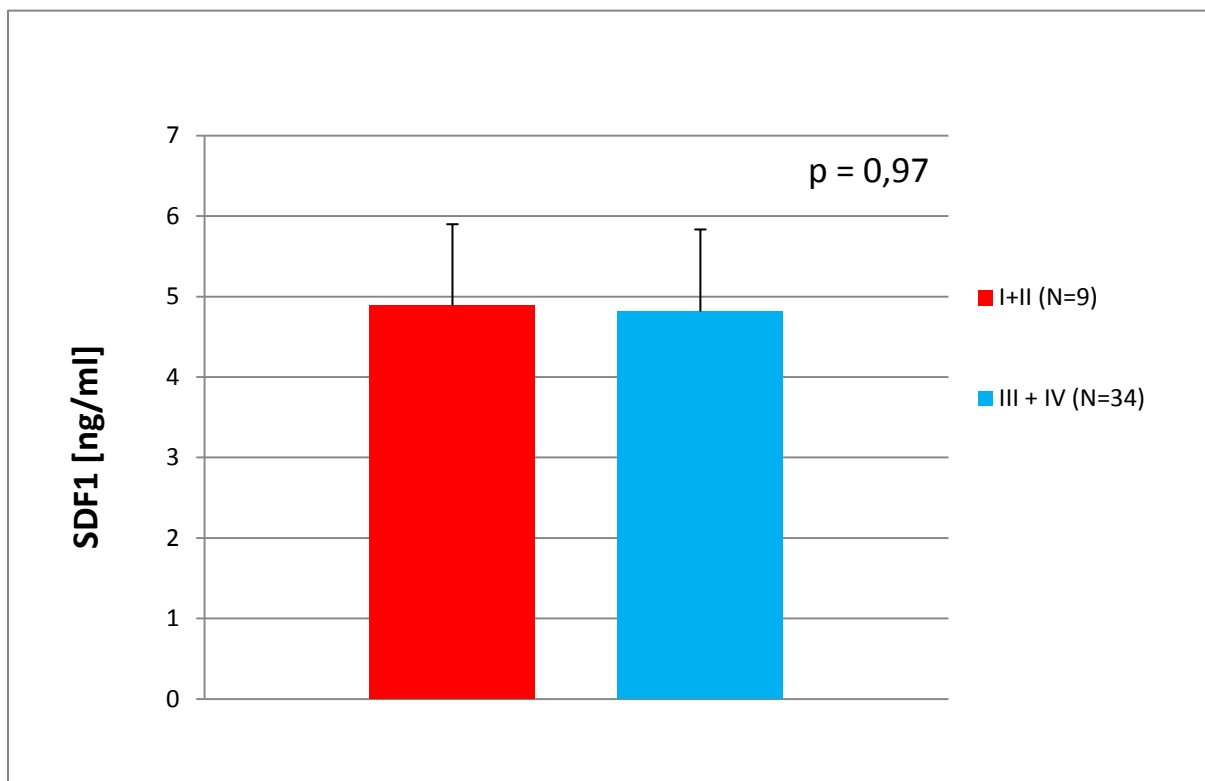
Tabela 21. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika o zróżnicowaniu histopatologicznym (G1 +G2) i G3 po chemioterapii I rzutu .



Wykres 16. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika w stopniu zaawansowania klinicznego wg FIGO I + II oraz III + IV przed operacją. Słupki przedstawiają średnią, zaznaczono także SD.

GRUPA (N)	ŚREDNIE STĘŻENIE SDF1[ng/ml] PRZED OPERACJĄ	ODCHYLENIE STANDARDOWE
I +II (N=9)	5,327	0,566
III +IV (N=34)	5,200	0,846
p	0,87	

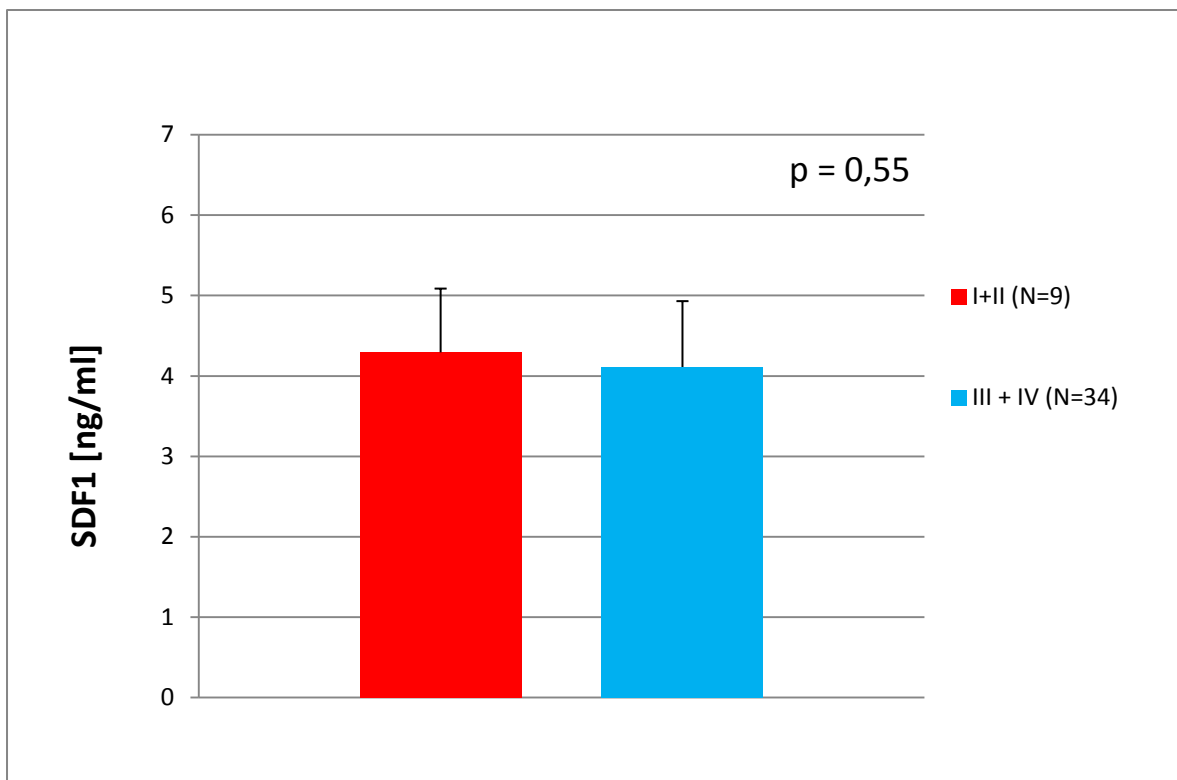
Tabela 22. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika w stopniu zaawansowania klinicznego wg FIGO I + II oraz III +IV przed operacją .



Wykres 17. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika w stopniu zaawansowania klinicznego wg FIGO I + II oraz III +IV po operacji. Słupki przedstawiają średnią, zaznaczono także SD.

GRUPA (N)	ŚREDNIE STĘŻENIE SDF1[ng/ml] PO OPERACJI	ODCHYLENIE STANDARDOWE
I +II (N=9)	4,887	1,013
III +IV(N=34)	4,817	1,018
p	0,97	

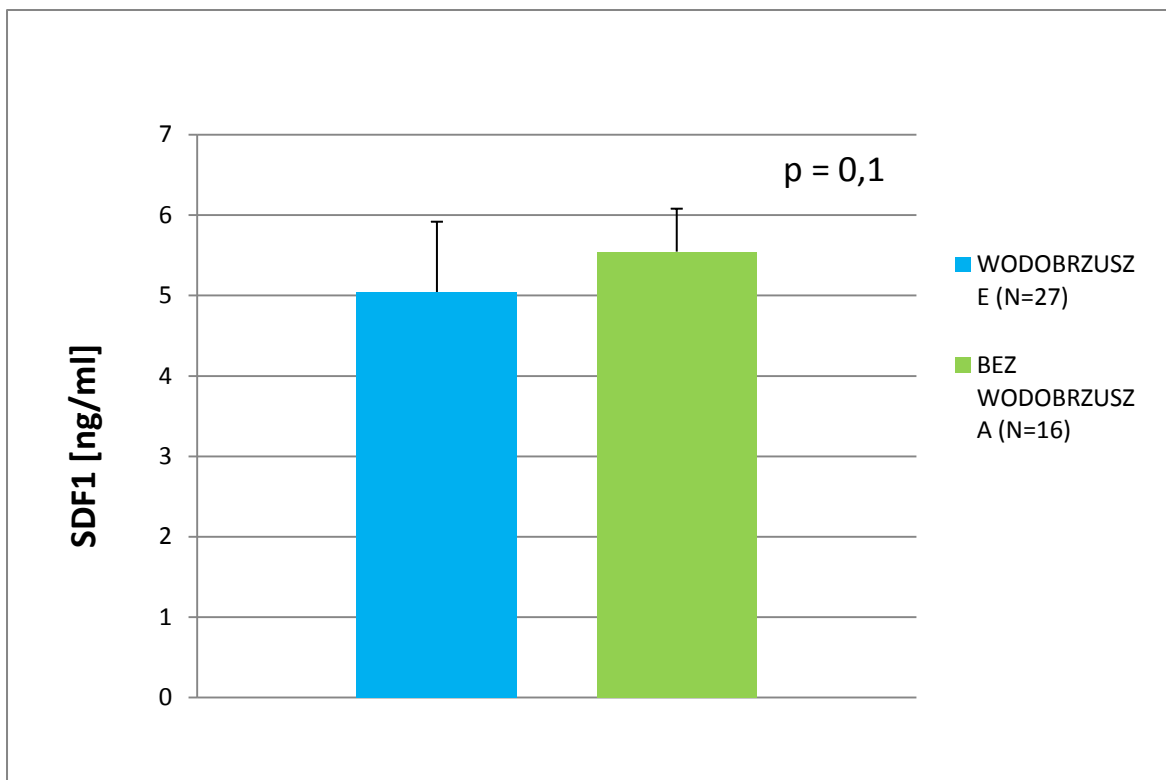
Tabela 23. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika w stopniu zaawansowania klinicznego wg FIGO I + II oraz III +IV po operacji .



Rysunek 18. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika w stopniu zaawansowania klinicznego wg FIGO I + II oraz III +IV po chemioterapii I rzutu. Słupki przedstawiają średnią, zaznaczono także SD.

GRUPA (N)	ŚREDNIE STĘŻENIE SDF1[ng/ml] PO CHEMIOTERAPII I RZUTU	ODCHYLENIE STANDARDOWE
I +II (N=9)	4,295	0,793
III +IV(N=34)	4,113	0,819
p	0,55	

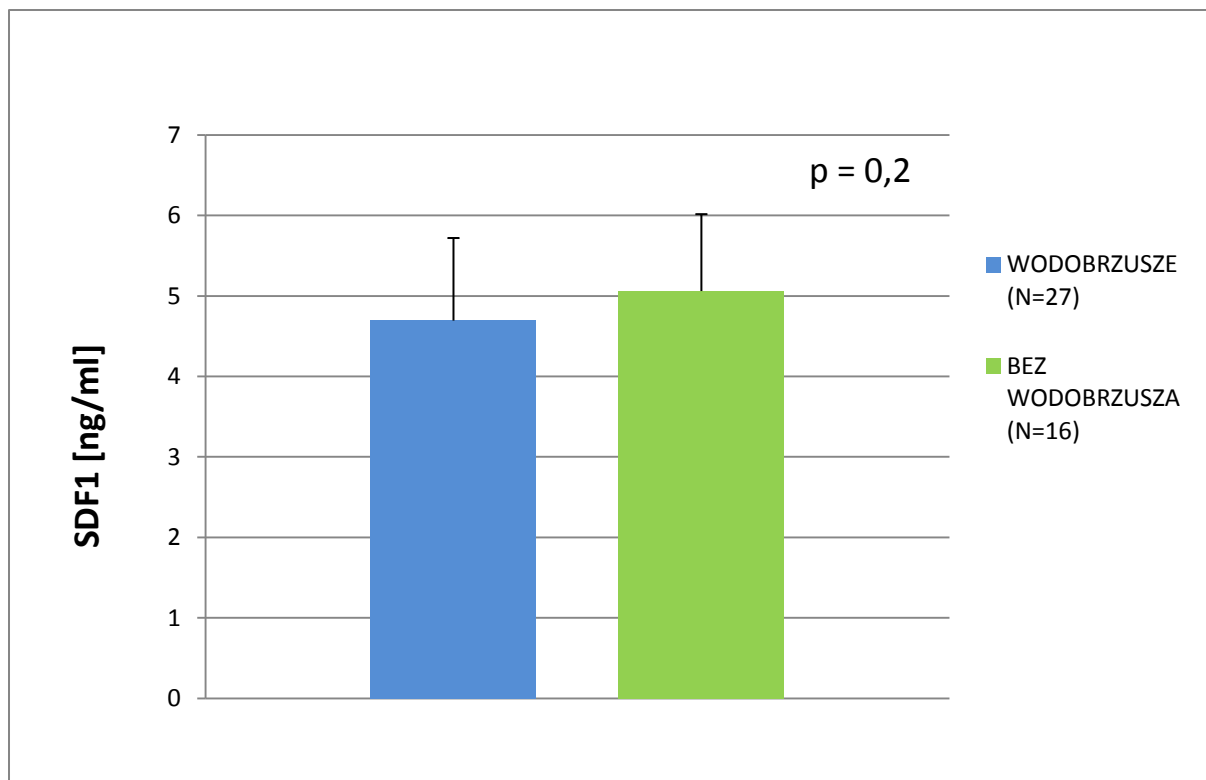
Tabela 24. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika w stopniu zaawansowania klinicznego wg FIGO I + II oraz III +IV po chemioterapii I rzutu.



Wykres 19. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika z wodobrzuszem i bez wodobrzusza przed operacją. Słupki przedstawiają średnią, zaznaczono SD.

GRUPA (N)	ŚREDNIE STĘŻENIE SDF1[ng/ml] PRZED OPERACJĄ	ODCHYLENIE STANDARDOWE
WODOBRZUSZE (N=27)	5,046	0,874
BEZ WODOBRZUSZA (N=16)	5,548	0,534
p	0,1	

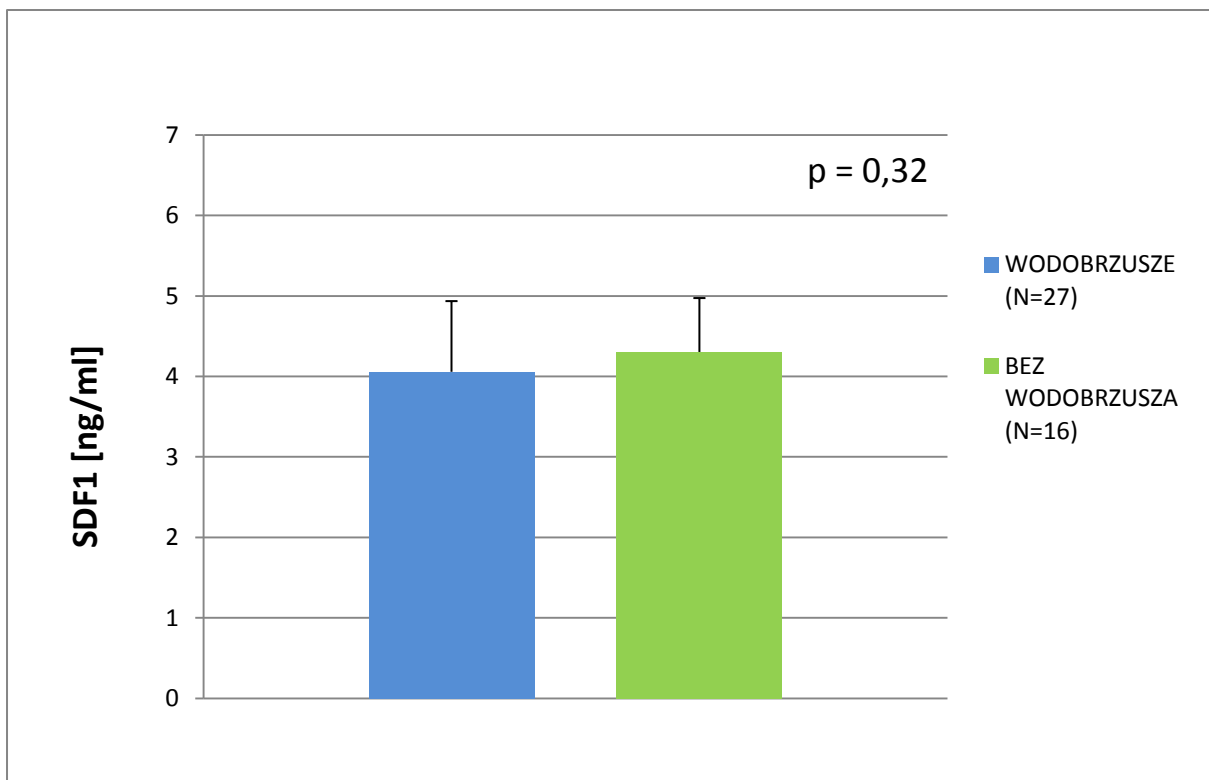
Tabela 25. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika z wodobrzuszem i bez wodobrzusza przed operacją.



Wykres 20. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika z wodobrzuszem i bez wodobrzusza po operacji. Słupki przedstawiają średnią, zaznaczono SD.

GRUPA (N)	ŚREDNIE STĘŻENIE SDF1[ng/ml] PO OPERACJI	ODCHYLENIE STANDARDOWE
WODOBRZUSZE (N=27)	4,695	1,026
BEZ WODOBRZUSZA (N=16)	5,062	0,955
p	0,2	

Tabela 26. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika z wodobrzuszem i bez wodobrzusza po operacji.



Wykres 21. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika z wodobrzuszem i bez wodobrzusza po chemioterapii I rzutu. Słupki przedstawiają średnią, zaznaczono SD.

GRUPA (N)	ŚREDNIE STĘŻENIE SDF1[ng/ml] PO CHEMIOTERAPII	ODCHYLENIE STANDARDOWE
WODOBRZUSZE (N=27)	4,059	0,878
BEZ WODOBRZUSZA (N=16)	4,305	0,670
p	0,32	

Tabela 27. Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika z wodobrzuszem i bez wodobrzusza po chemioterapii I rzutu.

4.5. STĘŻENIE SDF1 i CA 125 A STOPIEŃ ZAAWANSOWANIA KLINICZNEGO wg FIGO

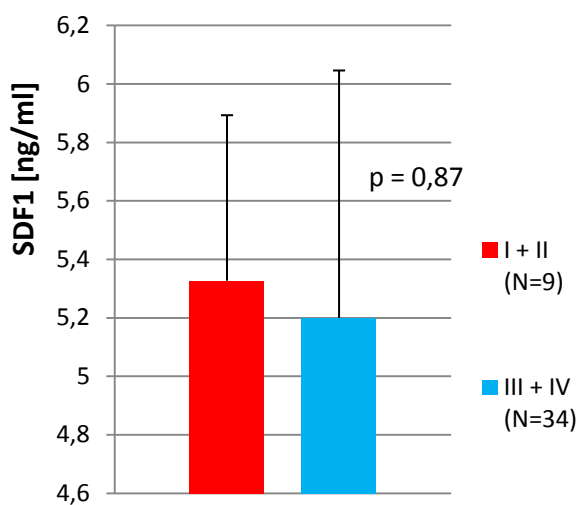
W grupach chorych z rakiem jajnika z niskim (I i II) i wysokim (III i IV) stopniem zaawansowania klinicznego wg FIGO stężenie SDF1 było wysokie bez różnicy istotnej statystycznie. Porównując natomiast zachowanie się stężenia markera CA125 w surowicy obu tych grup, wykazano, że stężenie CA125 jest wyższe w zaawansowanym raku jajnika. Różnica istotna statystycznie na poziomie $p < 0,001$.

4.6. STĘŻENIE SDF1 i CA 125 A WODOBRZUSZE

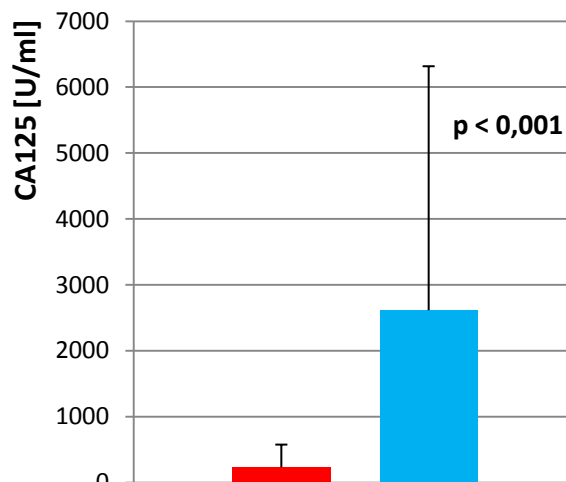
Stężenie SDF1 jest wysokie i nie wykazuje różnicy istotnej statystycznie u pacjentek z rakiem jajnika z wodobrzuszem i bez wodobrzusza. Natomiast marker CA 125 jest znacząco wyższy u pacjentek z wodobrzuszem ($p < 0,0001$).

GRUPA (N)	ŚREDNIE STĘŻENIE SDF1[ng/ml]±ODCHYLENIE STANDARDOWE	STĘŻENIE CA125[U/ml]±ODCHYLENIE STANDARDOWE
I + II (N=9)	5,327±0,566	233,86±343,37
III + IV (N=34)	5,200±0,846	2615,53±3703,32
p	0,87	0,001

Tabela 28. Porównanie zachowania się stężeń SDF1 i CA 125 w surowicy kobiet w różnych stopniach zaawansowania klinicznego.



Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika w stopniu zaawansowania wg FIGO I i II oraz III i IV.

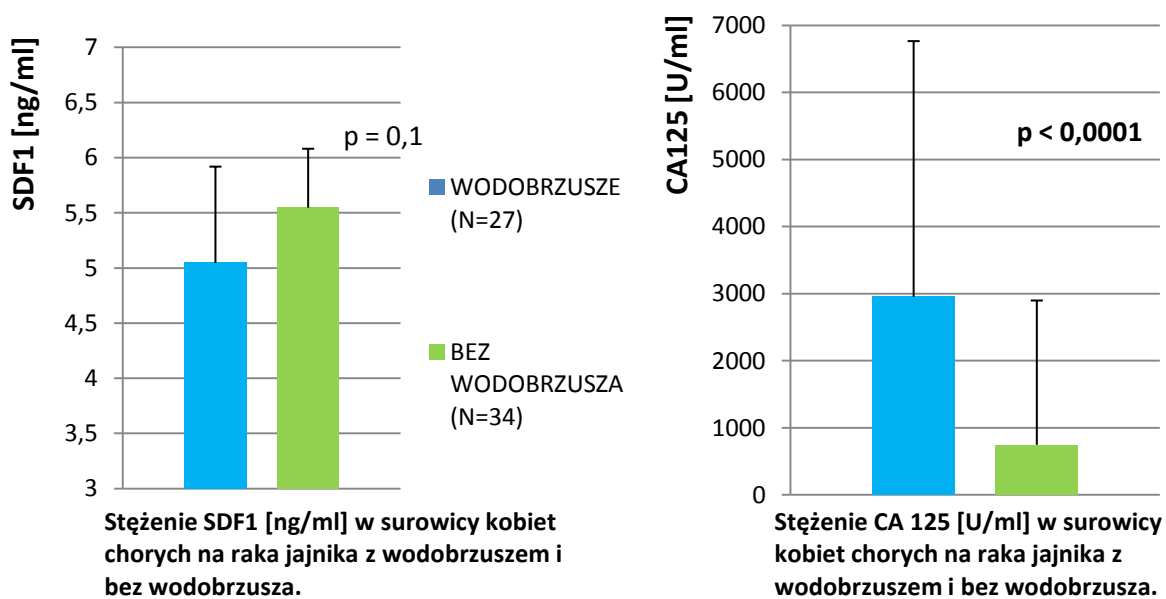


Stężenie CA125 [U/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika w stopniu zaawansowania wg FIGO I i II oraz III i IV.

Wykres 22. Porównanie zachowania się stężeń SDF1 [ng/ml] i CA 125 [U/ml] w surowicy kobiet w różnych stopniach zaawansowania klinicznego. Słupki przedstawiają średnią, zaznaczono SD.

GRUPA (N)	ŚREDNIE STĘŻENIE SDF1[ng/ml] ± ODCHYLENIE STANDARDOWE	ŚREDNIE STĘŻENIE CA125[U/ml]±ODCHYLENIE STANDARDOWE
WODOBRZUSZE (N=27)	5,046 ± 0,874	2954,76 ± 3811,37
BEZ WODOBRZUSZA (N=16)	5,548 ± 0,534	748,74 ± 2151,16
p	0,1	0,0001

Tabela 29. Porównanie zachowania się stężeń SDF1 i CA 125 w surowicy kobiet chorych na raka jajnika z wodobrzuszem i bez wodobrzusza.



Wykres 23. Porównanie zachowania się stężeń SDF1 [ng/ml] i CA 125 [U/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika z wodobrzuszem i bez wodobrzusza. Słupki przedstawiają średnią, zaznaczono SD.

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

5.1. OCENA EKSPRESJI *SDF1v1-4* I *CXCR4v1-2* U KOBIET Z RAKIEM JAJNIKA W PORÓWNANIU Z EKSPRESJĄ W JAJNIKACH KOBIET GRUPY KONTROLNEJ

Chemokiny odgrywają ważną rolę w patogenezie wielu nowotworów. Wcześniejsze badania pokazały ważną korelację pomiędzy obecnością receptorów chemokinowych a prognozą lub przerzutowaniem w różnych złośliwych nowotworach u ludzi.

Wśród wszystkich receptorów CXCR4 jest szczególnie ważny w przerzutowaniu guzów złośliwych. CXCR4 jest receptorem najczęściej ulegającym nadekspresji w wielu nowotworach u ludzi. Więcej niż 23 różnych nowotworów złośliwych wykazuje ekspresję receptora CXCR4.

Guzy nowotworowe często wykazują znaczącą ekspresję CXCR4. W wielu nowotworach zwiększenie ekspresji CXCR4 koreluje z przerzutami na drodze krwionośnej i limfatycznej oraz obniża czas całkowitego przeżycia [113-115].

In vitro, aktywność receptora CXCR4 związana jest ze wzrostem proliferacji, migracji i inwazji. Te właściwości mogłyby być sprawnie zahamowane poprzez blokadę CXCR4 w guzach.

Znacząca rola CXCR4 dla rozsiewu komórek nowotworowych potwierdzona została na modelach zwierzęcych.

Ekspresję CXCR4 stwierdzono w następujących nowotworach: raku piersi [76,117] raku prostaty [117], raku płuca [118], raku jajnika [119,120], raku trzustki [121], czerniaku [122], neuroblastoma [123], raku przełyku [124], raku jelita grubego [125], osteosarkoma [126], raku nerki [127].

W mojej pracy oznaczyłam ekspresję wszystkich czterech izoform *SDF1* w raku jajnika i grupie kontrolnej. W przypadku ekspresji *SDF1* wariant 1, to w grupie z rakiem jajnika w porównaniu z grupą kontrolną poziom ekspresji względnej *SDF1* był wyższy niż w grupie kontrolnej i różnica była istotna statystycznie.

Względny poziom ekspresji *SDF1* wariant 2 w grupach badanych był równy, natomiast *SDF1* wariant 3 i 4 w obu grupach był śladowy nie różniący się istotnie statystycznie. Podkreślenia wymaga fakt, iż niekoniecznie ta śladowa ekspresja związana była z guzem, być może pochodziła ona z komórek napływowych, np. limfocytów.

W przypadku ekspresji receptora CXCR4 wariant 1 nie stwierdzono jej w żadnej z badanych grup. Aby wykluczyć błąd w wykonaniu reakcji, wykonałam kontrolę pozytywną na fragmentach łożyska (którym dysponowała Katedra Histologii i Embriologii), gdzie ekspresja CXCR4 wariantu 1 wystąpiła. Ekspresja CXCR4 wariant 2 wystąpiła w obu badanych grupach bez istotnych różnic statystycznych. W 2001 i 2002 Scotton i wsp. [119,120] po raz pierwszy odkryli rolę *SDF1* w raku jajnika. Ekspresję *SDF1* i jego receptora wykazano w dziesięciu przypadkach raka jajnika, sześciu liniach komórkowych i 20. płynach z jamy brzusznej w raku jajnika. Ekspresji nie wykazano w komórkach prawidłowego jajnika i w komórkach u kobiet z rodzinną historią raka jajnika.

W następnych latach ekspresje CXCR4 i *SDF1* były badane w wielu ośrodkach [128-130].

Kajiyama i wsp. [128] postanowili ustalić, czy kompleks *SDF1*/CXCR4 jest zaangażowany we wzajemne oddziaływanie komórek raka jajnika z komórkami mezotelium w przerzutach do otrzewnej. Przeprowadzili oni badanie w 36 rakach jajnika, używając immunohistochemii. 16 przypadków (44,4 %) wykazało ekspresję CXCR4. Wykazano ekspresję CXCR4 w komórkach raka jajnika, jak i w komórkach nabłonka surowiczego otrzewnej. Pięcioletni okres całkowitego przeżycia u pacjentek z ekspresją CXCR4 wynosił 36,1% w porównaniu z grupą pacjentek bez ekspresji CXCR4 78,2%. Wyniki badania zasugerowały, że istnieje zależność między kompleksem *SDF1*/CXCR4 a przerzutami raka jajnika do otrzewnej oraz, że CXCR4 może okazać się nową tarczą terapeutyczną dla raka jajnika.

Jiang i wsp. [129] w swoim badaniu natomiast wykorzystali materiał pochodzący z 6 prawidłowych jajników, 44 pierwotnych raków jajnika i 30 przerzutów do sieci większej. Badali oni ekspresję CXCR4 i *SDF1* metodą immunohistochemiczną. Intensywność ekspresji *SDF1* korelowała z wodobrzuszem ($p=0,04$). Wielkość ekspresji CXCR4 w grupie odpornej na leczenie i ze wznową (81% i 28% odpowiednio $p=0,0008$) była znacząco wyższa, niż w grupie bez wznowy. Po 37 miesiącach obserwacji ekspresja CXCR4 towarzyszyła niekorzystnej prognozie z krótszym

czasem przeżycia do wznowy i całkowitym czasem przeżycia (odpowiednio 15 miesięcy [p=0,0004] i 27 miesięcy [p=0,017]) w porównaniu do chorych, u których nie wykazano ekspresji CXCR4.

Jiang YP i wsp. [129] w swojej pracy uzyskali ekspresję CXCR4 w 59% w raku jajnika, podczas gdy ekspresja *SDF1* była obecna w 91% raków.

Natomiast Scotton i wsp. [119] donieśli o ekspresji *SDF1* w 88% pacjentek z rakiem jajnika. Sugeruje to, że kompleks *SDF1/CXCR4* odgrywa ważną rolę w przerzutowaniu komórek nowotworowych CXCR4+ do narządów posiadających ekspresję *SDF1*.

Jiang YP i wsp. [129] przedstawili korelację pomiędzy ekspresją *SDF1* i CXCR4 a kliniczno-patologicznymi aspektami. Tylko w przypadku chorych z wodobrzuszem ekspresja *SDF1* była znacząco wyższa. W pozostałych przypadkach (stopnia zaawansowania klinicznego, typu i stopnia zróżnicowania histopatologicznego) nie było różnic istotnych statystycznie. Porównując zależności pomiędzy ekspresją *SDF1* i CXCR4 a kliniczną prognozą, okazało się, że obecność ekspresji CXCR4 związana była z krótszym czasem do wystąpienia progresji i skróceniem czasu przeżycia. Te wyniki pozwalają na dalsze wnioskowanie, że guzy jajnika z brakiem ekspresji CXCR4 są wrażliwe na chemioterapię opartą na platynie i efekt chemioterapii jest lepszy.

W innym badaniu immunohistochemicznym przeprowadzonym przez Nowak - Markwitz i wsp. [131] u 82 pacjentek z rakiem jajnika wykazano obecność białka *SDF-1* w 79/82 (96%) przypadków. *SDF-1* wykazywało ekspresję w jądrach komórkowych i w cytoplazmie. Wykazano również ekspresję cytoplazmatyczną CXCR-4 w 80/82 (97%) przypadków. Uzyskane wyniki ekspresji na komórkach nowotworowych skorelowano z danymi klinicznymi i histopatologicznymi. Nie stwierdzono istotnej korelacji pomiędzy ekspresją *SDF-1* i CXCR-4 na komórkach nowotworowych z danymi kliniczno-patologicznymi.

Wang i wsp. [132] w lutym bieżącego roku przeprowadzili kolejne badanie mające na celu określenie ekspresji CXCR4 w raku jajnika. Przeprowadzili oni badanie na 7. tkankach pochodzących ze zdrowych jajników, 49. tkankach raka jajnika oraz na trzech liniach komórkowych raka jajnika (A2780, SKOV3, CAO3). W badaniu PCR ekspresja CXCR4 w raku jajnika była wyższa niż w zdrowym jajniku (p<0,001).

Również ekspresja CXCR4 w linii komórkowej raka jajnika CAO3 była wyższa niż w

pozostałych liniach komórkowych. Podobnie w badaniu immunohistochemicznym ekspresja CXCR4 była wyższa w tej linii komórkowej.

W swoim badaniu Wang i wsp. [132] nie obserwowali korelacji pomiędzy ekspresją CXCR4 a wiekiem pacjentek, stopniem zróżnicowania histopatologicznego oraz stopniem zaawansowania klinicznego wg FIGO. Odnotowali jednak wyższą ekspresję CXCR4 u pacjentek z rakiem jajnika z przerzutami do węzłów chłonnych (n=8) niż u pacjentek bez przerzutów do węzłów chłonnych (n=41) p=0,016. W tym samym badaniu uzyskano znaczącą pozytywną korelację pomiędzy ekspresją CXCR4 a ekspresją β -kateniny.

W dostępnej literaturze ekspresja CXCR4 towarzyszy złej prognozie w wielu nowotworach złośliwych.

Nadekspresja CXCR4 w raku jelita grubego koreluje ze stopniem zaawansowania (III i IV) i z przerzutami do krwi i węzłów chłonnych [133].

Ponadto SDF1 α stymuluje migrację i inwazję w CXCR4+ liniach komórkowych raka jelita grubego SW480 i SW 620 *in vitro* [133].

W raku przełyku średnia całkowitego przeżycia pacjentów z CXCR+ wynosiła 20. miesięcy w porównaniu do 76 miesięcy całkowitego przeżycia przypadku CXCR4- [134].

W raku żołądka ekspresja CXCR4 znacząco koreluje z rozsiewem nowotworowym do otrzewnej i wodobrzuszem, gdzie stwierdzono wysokie stężenie SDF1 [135].

W rakach trzustki nadekspresja CXCR4 koreluje z wysokim stopniem zaawansowania klinicznego (III i IV) oraz z tendencją do przerzutowania drogą krwionośną i progresją miejscową guza, bez wpływu na przeżycie [136].

W raku wątroby wysoka ekspresja CXCR4 czy CXCR7 związana jest z zaawansowaniem pierwotnego guza i przerzutami do węzłów chłonnych [137].

Poza tym nadekspresja CXCR4 prowadzi do znaczącego wzrostu przerzutów krwiopochodnych oraz do skrócenia czasu całkowitego przeżycia o 3 lata [137].

W raku nerki w 2010 roku Zhao FL i Guo W [138] przeprowadzili ciekawe badanie obejmujące 10. tkanek raka nerki oraz 30. tkanek z przerzutów raka nerki do kości. Badanie to wykazało wysoką ekspresję CXCR4 oraz SDF1 w obu rodzajach tkanek, jednak w przypadku przerzutów do kości ekspresja zarówno SDF1, jak i CXCR4 była wyższa.

Kompleks SDF1/CXCR4 związany jest z przerzutami do kości w raku prostaty [117] oraz w niedrobnokomórkowym raku płuc, zwłaszcza z jego przerzutami do opłucnej [118].

Receptor CXCR4 stał się możliwą tarczą do leczenia przerzutów nowotworowych [139].

Wykazano, że swoiste przeciwciała monoklonalne przeciwko CXCR4 hamują przerzutowanie raka piersi do płuc i do węzłów chłonnych, upośledzają przepuszczalność naczyń krwionośnych, angiogenezę i migrację komórek.

Na przykład przeciwciała anty-HER-2 (trastuzumab-Herceptin) w raku piersi wywołują efekt „down regulation” CXCR4 [100].

Inhibitory dla kompleksu SDF1/CXCR4 mogą stać się kolejną tarczą terapeutyczną w leczeniu raka jajnika.

Badania toczą się w dwóch kategoriach. Po pierwsze podawanie przeciwciał monoklonalnych anty-CXCR4, po drugie specyficznych „drobnych komórek” będących antagonistami dla CXCR4 [139].

Retz i wsp. [140] *in vitro* zahamowali migrację i inwazję komórek raka pęcherza moczowego przy użyciu antagonisty CXCR4- 4F-benzoyl-TE14011.

W czerniaku na mysich modelach Takenaga i wsp. [141] zredukowali ilość przerzutów do płuc przy użyciu tego antagonisty.

Inny antagonist CXCR4: TN14003 zahamował migrację i inwazję linii komórkowej raka trzustki *in vitro* [142] oraz zahamował przerzuty do płuc w raku piersi na mysich modelach [143].

AMD3100 (Bicyclam) ostatnio odkryta „mała molekula” hamująca CXCR4 i pokrewny związek AMD4365 blokuje CXCR4 w glioblastoma, medulloblastoma i raku tarczycy i redukuje masę guza *in vivo* [144,145].

Analog SDF1 CTCE-9908 hamuje przerzuty w płucach na modelach czerniaka i osteosarkoma [146].

Zarówno CTCE-9908 jak i AMD3100 są przedmiotem bieżących badań klinicznych.

Inny antagonist CXCR4 – T22 mocno hamuje przerzuty do płuc w mysich komórkach B16 czerniaka [147] i przerzuty do krwi w raku prostaty na komórkach mysich [148].

Przez wiele lat interakcja pomiędzy SDF1 i CXCR4 była unikatowa. Ostatnio odkryto, że SDF1 łączy się również z innym receptorem CXCR7 [149].

Interakcja SDF1 z CXCR4 wpływa na chemotaksję, a połączenie z CXCR7 odpowiada za proliferację komórek guza [150]. Zatem CXCR4 modeluje zdolność migracji, a CXCR7 wzmacnia proliferację komórek guza [151].

Kompleks SDF-1-CXCR4 odgrywa kluczową rolę w tworzeniu przerzutów nowotworów i w odpowiedzi na leczenie cytostatykami. Oznaczenie tego kompleksu może być użytecznym czynnikiem prognostycznym w monitorowaniu leczenia wielu raków. Możliwość blokowania CXCR4 wskazuje na istnienie nowych tarcz terapeutycznych w leczeniu raków (piersi, jajnika, gruczolakoraka szyjki macicy). Hamowanie lub stymulacja sygnałowania SDF-1-CXCR4 odbywa się na poziomie całego ustroju, nawet, jeśli korzystne jest dla stanu rozsiewu raka, może powodować ono trudne jeszcze do sprecyzowania powikłania z racji roli tego szlaku w odpowiedziach immunologicznych i dopływu na obwód komórek progenitorowych tkanek regenerujących. W ciągu ostatnich pięciu lat odbywa się rewolucja „chemokinowa” w nowotworach.

Naukowcy oraz onkolodzy kliniczni zdają sobie sprawę z kluczowej roli, jaką odgrywają chemokiny we wszystkich stopniach transformacji nowotworowej i progresjach.

Złożona zależność pomiędzy chemokinami i ich rolą w nowotworach będzie wkrótce przełożona na istotne korzyści dla pacjentów [49].

Być może wkrótce ukaże się nowy związek , który będzie bardziej skuteczny, bez efektów ubocznych, który będzie miał możliwość kontroli przerzutowania nowotworowych komórek CXCR4+ lub wzmocni mobilizację komórek progenitorowych dla wykorzystania w regeneracji tkankowej.

5.2. OCENA STEŻEŃ SDF1 W SUROWICY KOBIET CHORYCH NA RAKA JAJNIKA PRZED OPERACJĄ, PO OPERACJI (6 DOBA) I PO CHEMIOTERAPII I-GO RZUTU (W 6 CYKLACH CO 3 TYGODNIE)

W badaniu cytokin i ich wolnych receptorów w surowicy krwi chorych na nowotwory zakłada się, że procesy zachodzące w guzie nowotworowym z udziałem cytokin

znajdują swoje odzwierciedlenie w zmianach ich stężeń w surowicy krwi. Poszukiwanie związków między stężeniami różnych cytokin i ich wolnych receptorów surowicy krwi z różnymi cechami kliniczno-patologicznymi nowotworów umożliwia natomiast pośrednie wnioskowanie o związkach przyczynowych z czynnikami, które wyznaczają charakter i dynamikę procesów nowotworowych [6].

W mojej pracy porównałam stężenie SDF1 w surowicy krwi chorych na raka jajnika przed operacją ze stężeniem SDF1 w surowicy krwi grupy kontrolnej. Było ono wyższe u pacjentek chorych na raka jajnika i różniło się istotnie statystycznie.

Jak wiadomo, SDF-1 jest czynnikiem chemotaksji limfocytów T, monocytów i neutrofilów [152,153]. Jego ekspresję wykryto w trzustce, śledzionie, jajniku, jelicie cienkim, mózgu, okrężnicy, płucach, piersi, sercu, węzłach chłonnych i łożysku [81,82,85].

Wiadomo również, że sekrecja SDF-1 wzrasta także podczas uszkodzenia tkanek (zawał serca, niedokrwienie kończyn, toksyczne uszkodzenie wątroby, duże krwawienie, napromieniowanie organizmu, uszkodzenie tkanek spowodowane chemioterapią) [89].

W badaniu wykazałam, że stężenie SDF1 w surowicy krwi chorych na raka jajnika po operacji było istotnie statystycznie wyższe niż u kobiet z grupy kontrolnej.

Podobna sytuacja wystąpiła w surowicy pacjentek chorych po sześciu cyklach chemioterapii pierwszego rzutu w porównaniu z grupą kontrolną, gdzie stężenie SDF1 było również wyższe i różnica wykazała istotność statystyczną.

Stężenia SDF1 po leczeniu operacyjnym, jak i po chemioterapii były wysokie, mimo, że usunięto masy guza. Te wysokie stężenia mogły być związane z uszkodzeniem tkanek w trakcie zabiegu, jak i po chemioterapii [89].

5.3. OCENA STĘŻEŃ SDF1 W SUROWICY KOBIET Z RAKIEM JAJNIKA W ZALEŻNOŚCI OD TYPU I ZRÓŻNICOWANIA HISTOPATOLOGICZNEGO, ZAAWANSOWANIA KLINICZNEGO NOWOTWORU ORAZ OBECNOŚCI WODOBRZUSZA

W mojej pracy porównałam również stężenia SDF1 u chorych z surowicznym rakiem jajnika z pozostałymi typami histopatologicznymi. Nie uzyskałam różnic istotnych statystycznie.

Podobnie było ze znalezieniem zależności w grupie chorych na wysoko zróżnicowanego raka jajnika (G1+G2) i w grupie z nisko zróżnicowanym rakiem jajnika (G3).

Przy analizowaniu grup podzielonych w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego (gdzie pierwszą grupę stanowiły pacjentki w I i II stopniu zaawansowania klinicznego, a drugą grupę stanowiły pacjentki w III i IV stopniu zaawansowania klinicznego) również nie uzyskano różnic istotnych statystycznie.

U pacjentek chorych na raka jajnika z obecnością wodobrzusza i bez wodobrzusza stężenia SDF1 nie różniły się istotnie statystycznie.

Można powiedzieć, że wysokie stężenia SDF1 w surowicy krwi chorych na raka jajnika nie korelują z danymi klinicznymi i histopatologicznymi.

W piśmiennictwie nie spotkałam opracowania, które mówiłoby o określeniu stężeń SDF1 w surowicy chorych na raka jajnika i korelacji tych stężeń z danymi kliniczno-patologicznymi. Istnieje natomiast kilka prac, które określają ekspresję SDF1 w raku jajnika, którą uzyskano w badaniach immunohistochemicznych, a które zacytowałam omawiając ekspresję SDF1 i jego receptora CXCR4.

5.4. PORÓWNANIE STĘŻEŃ SDF1 I CA125 W ANALIZOWANYCH GRUPACH CHORYCH

Kolejnym celem pracy było porównanie stężeń SDF1 i CA 125 w analizowanych grupach chorych.

Markery biologiczne stosuje się do monitorowania odpowiedzi na leczenie, odróżniania łagodnych guzów jajnika od złośliwych, ustalania rokowania, przewidywania odpowiedzi na poszczególne leki oraz wykrywania pierwotnej choroby we wczesnym stadium.

Wśród znaczników biologicznych raka jajnika największą wartość posiada marker CA125.

Ze względu na ciągłe poszukiwania doskonałego markera, który przede wszystkim pozwoliłby na wykrycie wczesnych postaci raka jajnika (w I i II stopniu zaawansowania), postanowiłam przeanalizować, jak zachowuje się SDF1 w stosunku do CA 125 w wybranych grupach.

W grupach pacjentek z surowicznym rakiem jajnika i z pozostałymi typami histopatologicznymi raka jajnika nie wykazano różnic w stężeniach zarówno CA125, jak i SDF1. Wiemy, że podwyższone stężenie markera CA 125 występuje w raku trzustki, płuc, żołądka, jelit oraz u chorych na chłoniaki [6]. Ze względu na dużą czułość (78-85,5%) i swoistość (78,3-93%) CA 125 jest obecnie uważany za najlepszy marker dla surowicznych raków jajnika [6].

W grupie chorych z nisko zróżnicowanym rakiem jajnika (G3) oraz w grupie z wysoko zróżnicowanym rakiem jajnika (G2+G3) nie wykazano różnic w stężeniach w surowicy krwi zarówno CA125, jak i SDF1.

W grupie pacjentek z rakiem jajnika w I i II stopniu zaawansowania klinicznego poziom CA 125 był istotnie statystycznie niższy, niż w grupie pacjentek z III i IV stopniem zaawansowania klinicznego. Natomiast stężenia SDF1 zbliżone w obu tych grupach i nie wykazywały różnic istotnych statystycznie.

Na podstawie analizy 35 badań, obejmujących 2501 kobiet chorych na raka jajnika, Tuxen i wsp. [154] stwierdzili, że odsetek nieprawidłowych stężeń CA 125 wzrastał wraz z zaawansowaniem choroby: w I stopniu wg FIGO stężenie CA 125 było podwyższone u 51% chorych kobiet, w II stopniu u 71%, w III u 91% i w IV stopniu

choroby u 98% chorych. Średnie stężenie CA125 u kobiet chorych na raka jajnika w I stopniu klinicznym określono na 133 U/ml. Z innych badań wynika, że stężenie >150 U/ml towarzyszy procesowi rozsialemu [155].

Stężenia SDF1 we wszystkich stopniach wg FIGO w moim badaniu były bez różnic istotnych statystycznie. Wyciągnięcie wniosku, że SDF1 mógłby być markerem wykrywania raka jajnika we wczesnym stopniu zaawansowania klinicznego jest odważnym stwierdzeniem. Dlatego myślę, że można byłoby pokusić się o dalsze badania nad stężeniami SDF1 w surowicy krwi u chorych z rakiem jajnika, aby wyjaśnić, czy rzeczywiście SDF1 mógłby być nowym markerem wczesnego wykrywania raka jajnika.

W dalszej kolejności przeanalizowałam stężenia CA125 i SDF1 u chorych z rakiem jajnika z wodobrzuszem i bez wodobrzusza. Stężenia CA125 u pacjentek z wodobrzuszem w porównaniu z grupą pacjentek bez wodobrzusza były wyższe i różniły się istotnie statystycznie. Stężenia SDF1 nie wykazały żadnych różnic istotnych statystycznie.

Hunter i wsp. [156] dowiedli, że stężenia CA125 w surowicy chorych z wysiękami w jamie lub jamach ciała nie różnią się znacząco od wartości stwierdzanych w surowicy krwi kobiet z procesem rozsialemym, lecz bez wysięków.

Natomiast wpływ podwyższonego stężenia SDF1 w surowicy krwi kobiet z rakiem jajnika na ekspresję genu *SDF1*, jak i jego receptora *CXCR4* w rakach jajnika (up regulation?) wymaga dalszych badań.

6. WNIOSKI

1. Zarówno w jajnikach kobiet grupy kontrolnej, jak i w rakach jajnika na poziomie mRNA następuje ekspresja **SDF1 v 1 i 2** oraz **CXCR4 v 2**, co może sugerować parakrynnne działanie **SDF1** w gonadzie żeńskiej.
2. W rakach jajnika stwierdza się bardzo znaczne podwyższenie ekspresji **SDF1 v 1**, ale nie podwyższenie pozostałych wariantów transkryptów, jak i transkryptu **CXCR4 v 2**.
3. Stężenie **SDF1** w surowicy kobiet chorych na raka jajnika przed operacją, po operacji i po 6-ciu cyklach chemioterapii jest istotnie statystycznie wyższe w porównaniu do stężeń **SDF1** w surowicy kobiet grupy kontrolnej.
4. Stężenie **SDF1** w surowicy krwi nie koreluje z danymi kliniczno-patologicznymi (stopniem zaawansowania klinicznego wg FIGO, typem histologicznym, zróżnicowaniem histopatologicznym, bez lub z wodobrzuszem).
5. Stężenie **SDF1** w surowicy krwi chorych na raka jajnika jest podwyższone zarówno we wczesnych i późnych stopniach zaawansowania klinicznego wg FIGO, natomiast CA 125 tylko w stopniach zaawansowanych.

6. STRESZCZENIE

Rak jajnika stanowi jeden z największych problemów w ginekologii onkologicznej. Pomimo postępów w chirurgii i chemioterapii przeżywalność raku jajnika jest nadal niska.

SDF1 (stromal derived factor 1) lub CXCL12 należy do rodziny prozapalnych cytokin (CHEMOKIN). Receptorem dla SDF1 jest CXCR4. Kompleks SDF1/CXCR4 promuje proliferację, migrację i inwazję komórek nowotworowych i odpowiada za przerzutowanie komórek nowotworowych.

Celem pracy była ocena ekspresji *SDF1 v1-4* i *CXCR4 v1-2* w raku jajnika w porównaniu z jajnikami grupy kontrolnej, ocena stężeń SDF1 w surowicy kobiet chorych na raka jajnika przed operacją, po operacji (6 doba) i po chemioterapii I-go rzutu. Materiał stanowiły fragmenty guza jajnika pobrane od 27 kobiet operowanych z powodu raka jajnika, a grupę kontrolną fragmenty jajnika 13 operowanych kobiet z powodu mięśniaków macicy lub wypadania narządu rodowego po menopauzie. W tych jednostkach chorobowych prześledzono również stężenie SDF1 w surowicy krwi przed operacją, po operacji (na 6 dobę), po 6 cyklach chemioterapii.

Zarówno w jajnikach zdrowych i w rakach jajnika na poziomie mRNA następuje ekspresja *SDF1 v 1* i *2* oraz *CXCR4 v 2*. W rakach jajnika stwierdza się bardzo znaczne podwyższenie ekspresji *SDF1 v 1*, natomiast ekspresja pozostałych wariantów, jak również transkryptu *CXCR4 v 2* nie zmienia się w stosunku do normy. Stężenie SDF1 w surowicy kobiet chorych na raka jajnika przed operacją, po operacji i po 6-ciu cyklach chemioterapii jest istotnie statystycznie wyższe w porównaniu do stężeń SDF1 w surowicy kobiet grupy kontrolnej i nie koreluje ono z danymi klinicznymi i histopatologicznymi. Pozostaje do wyjaśnienia wpływ podwyższonego stężenia SDF1 w surowicy krwi kobiet z rakiem jajnika na ekspresję genu *SDF1*, jak i jego receptora *CXCR4* w rakach jajnika.

7. SUMMARY

Epithelial ovarian cancer is the most common type of gynecologic malignancy. Despite advances in surgery and chemotherapy, the survival rate in ovarian cancer is still low.

Chemokines are a family of proinflammatory chemotactic cytokines. SDF1 is a small cytokines belonging to the intercrine family. SDF1 works by its receptors CXCR4 and CXCR7. The SDF1/CXCR4 complex plays a significant role in the creation of metastases of neoplasms and as a response to cytostatic treatment.

Identification of this complex may be a useful prognostic factor in the therapy of ovarian cancer .

The aim of the work was the evaluation of *SDF1 v1-4* and *CXCR4 v1-2* expression in ovarian cancer cells comparing to the control group. The aim was also the SDF1 expression in plasma of ovarian cancer patients before the operation, after the operation (6 days) and after first-line chemotherapy.

The material was taken from the ovarian cancer tumor's tissue during the operation of 27 women. The material of the control group was taken from 13 ovaries of the women who were operated because of myomata or prolapsus after menopause age. SDF1 expression was examined in ovarian cancer patients' plasma before the operation, after the operation and after chemotherapy.

There is mRNA *SDF v 1 – 2* and *CXCR4 v 2* expression in ovarian cancer tissues as well as in healthy ovarian tissues. There is an important increase in *SDF1 v 1* expression in ovarian cancer patients. There is no significant different in the other *SDF1* variants expression and *CXCR4 v 2* expression. SDF1 expression in ovarian cancer plasma before the operation, after the operation, and after 6 cycles of chemotherapy is significantly higher comparing to SDF1 expression in control group plasma. It does not correlate with clinical and histopathological findings. It is to clear up the influence of increased SDF1 concentration in ovarian cancer patients to *SDF1* gene expression as its *CXCR4* receptor (up regulation?) in ovarian cancer patients.

8. PIŚMIENNICTWO

- [1] GLOBOCAN 2008, International Agency for Research on Cancer Ovary-incidence and mortality:<http://globocan.arc.fr/7/9/2010>
- [2] Wojciechowska U., Didkowska J., Zatoński W. :” Nowotwory złośliwe w Polsce w 2008 roku” Warszawa 2010.
- [3] Auersperg N, Ota T, Mitchell GW.:”Early events in ovarian epithelial carcinogenesis: progress and problems in experimental approaches.” *Int J Gynecol Cancer*. 2002; 12(6):691-703.
- [4] Nelson HD, Huffman LH, Fu R et al.:” Genetic risk assessment and BRCA mutation testing for breast and ovarian cancer susceptibility: systematic evidence review for the U.S.” *Ann Intern Med*. 2005; 143(5):362-79.
- [5] Brun JL, Feyler A, Chêne G. et al.: ”Long-term results and prognostic factors in patients with epithelial ovarian cancer.” *Gynecol Oncol*. 2000; 78(1):21-7.
- [6] Manyś G.: ”Czynniki prognostyczne w raku jajnika” Markowska J. (red):”Ginekologia Onkologiczna” Urban & Partner, Wrocław 2006; 847-855.
- [7] Ries LA :”Ovarian cancer. Survival and treatment differences by age.” *Cancer*. 1993; 71(2 Suppl):524-9.
- [8] Hoskins PJ, Le N.:”Identifying patients unlikely to benefit from further chemotherapy: a descriptive study of outcome at each relapse in ovarian cancer.” *Gynecol Oncol*. 2005; 97(3):862-9.
- [9] ”Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer.” *J Epidemiol Biostat ed. P. Boyle, C La Vecchia, A. Walker*. 2001,6.
- [10] Kavanagh JJ, Pecorelli S., Benedet JL et al.:”Cancer of the ovary.” [In] Pecorelli S., Ngan HYS, Hacker NF(eds): *Staging Classifications and Clinical Practice. Guidelines for Gynaecological Cancers, 3rd edition*. International Federation of Gynecology and Obstetrics 2000; 95-121.

[11] Markman M, Bundy BN, Alberts DS.:” Phase III trial of standard-dose intravenous cisplatin plus paclitaxel versus moderately high-dose carboplatin followed by intravenous paclitaxel and intraperitoneal cisplatin in small-volume stage III ovarian carcinoma: an intergroup study of the Gynecologic Oncology Group, Southwestern Oncology Group, and Eastern Cooperative Oncology Group.” J Clin Oncol. 2001; 19(4):1001-7.

[12] Muggia FM, Braly PS, Brady MF et al.”Phase III randomized study of cisplatin versus paclitaxel versus cisplatin and paclitaxel in patients with suboptimal stage III or IV ovarian cancer: a gynecologic oncology group study.” J Clin Oncol. 2000; 18(1):106-15.

[13] Vergote I, De Brabanter J, Fyles A et al.”Prognostic importance of degree of differentiation and cyst rupture in stage I invasive epithelial ovarian carcinoma.” Lancet. 2001; 357(9251):176-82.

[14] Puls LE, Duniho T, Hunter JE et al.”The prognostic implication of ascites in advanced-stage ovarian cancer.” Gynecol Oncol. 1996; 61(1):109-12.

[15] Rogulski L, Olejek A: ”Zastosowanie biomarkerów w diagnostyce i leczeniu raka jajnika.” Przegląd menopauzalny 6/2008

[16] Duffy MJ, Bonfrer JM, Kulpa J et al.”CA125 in ovarian cancer: European Group on Tumor Markers guidelines for clinical use.” Int J Gynecol Cancer. 2005; 15(5):679-91.

[17] Fishman DA ”The present and future of biomarkers for the early detection of epithelial ovarian carcinoma CME”. J. Gynecol Oncol 1999,4,33.

[18] Halila H, Stenman UH, Seppälä M. “Ovarian cancer antigen CA 125 levels in pelvic inflammatory disease and pregnancy.” Cancer. 1986; 57(7):1327-9.

[19] Verheijen RH, von Mensdorff-Pouilly S, van Kamp GJ et al.”CA 125: fundamental and clinical aspects.” Semin Cancer Biol. 1999; 9(2):117-24.

[20] Vuento MH, Stenman UH, Pirhonen JP et al.”Significance of a single CA 125 assay combined with ultrasound in the early detection of ovarian and endometrial cancer.” Gynecol Oncol. 1997; 64(1):141-6.

[21] Maughan TS, Fish RG, Shelley M et al.”Antigen CA125 in tumor tissue and serum from patients with adenocarcinoma of the ovary.” Gynecol Oncol. 1988; 30(3):342-6.

[22] Heinonen PK, Tontti K, Koivula T et al. "Tumour-associated antigen CA 125 in patients with ovarian cancer." *Br J Obstet Gynaecol.* 1985; 92(5):528-31.

[23] Rustin GJ, van der Burg ME, Berek JS "Advanced ovarian cancer. Tumour markers." *Ann Oncol.* 1993;4 Suppl 4:71-7.

[24] Tuxen MK, Sölétormos G, Dombernowsky P. "Tumor markers in the management of patients with ovarian cancer." *Cancer Treat Rev.* 1995; 21(3):215-45.

[25] Steffensen KD, Waldstrøm M, Jeppesen U et al. "The prognostic importance of cyclooxygenase 2 and HER2 expression in epithelial ovarian cancer." *Int J Gynecol Cancer.* 2007; 17(4):798-807.

[26] Seo SS, Song YS, Kang DH et al. "Expression of cyclooxygenase-2 in association with clinicopathological prognostic factors and molecular markers in epithelial ovarian cancer." *Gynecol Oncol.* 2004; 92(3):927-35.

[27] Gasparini G, Longo R, Sarmiento R et al. "Inhibitors of cyclo-oxygenase 2: a new class of anticancer agents?" *Review. Lancet Oncol.* 2003; 4(10):605-15..

[28] Patel VA, Dunn MJ, Sorokin A. "Regulation of MDR-1 (P-glycoprotein) by cyclooxygenase-2." *J Biol Chem.* 2002; 277(41):38915-20.

[29] Kim G, Minig L, Kohn EC. "Proteomic profiling in ovarian cancer." *Review. Int J Gynecol Cancer.* 2009; 19 Suppl 2:S2-6.

[30] Petricoin EE, Paweletz CP, Liotta LA. "Clinical applications of proteomics: proteomic pattern diagnostics." *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2002; 7(4):433-40.

[31] Boyce EA, Kohn EC "Ovarian cancer in the proteomics era: diagnosis, prognosis, and therapeutics targets." *Int J Gynecol Cancer.* 2005;15 Suppl 3:266-73.

[32] Bast RC Jr, Badgwell D, Lu Z et al. "New tumor markers: CA125 and beyond." *Review. Int J Gynecol Cancer.* 2005; 15 Suppl 3:274-81..

[33] Galgano MT, Hampton GM, Frierson HF "Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues." *Jr. Mod Pathol.* 2006; 19(6):847-53.

[34] Hellström I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M et al. "The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma." *Cancer Res.* 2003; 63(13):3695-700.

[35] Havrilesky LJ, Whitehead CM, Rubatt JM et al. "Evaluation of biomarker panels for early stage ovarian cancer detection and monitoring for disease recurrence." *Gynecol Oncol.* 2008; 110(3):374-82.

[36] Jacobs I, Oram D, Fairbanks J et al. "A risk of malignancy index incorporating CA 125, ultrasound and menopausal status for the accurate preoperative diagnosis of ovarian cancer." Br J Obstet Gynaecol. 1990; 97(10):922-9.

[37] Moore RG, Brown AK, Miller MC et al. "The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass." Jr. Gynecol Oncol. 2008; 108(2):402-8.

[38] Moore RG, McMeekin DS, Brown AK et al. "A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass." Gynecol Oncol. 2009; 112(1):40-6.

[39] Scholler N, Fu N, Yang Y et al. "Soluble member(s) of the mesothelin/megakaryocyte potentiating factor family are detectable in sera from patients with ovarian carcinoma." Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96(20):11531-6.

[40] Badgwell D, Lu Z, Cole L et al. "Urinary mesothelin provides greater sensitivity for early stage ovarian cancer than serum mesothelin, urinary hCG free beta subunit and urinary hCG beta core fragment." Gynecol Oncol. 2007; 106(3):490-7.

[41] Yen MJ, Hsu CY, Mao TL et al. "Diffuse mesothelin expression correlates with prolonged patient survival in ovarian serous carcinoma." Clin Cancer Res. 2006; 12(3 Pt 1):827-31.

[42] Kruk P, Saunders BO, Wilbanks GD, et al. "Detection of ovarian cancer by elevated urinary levels of Bcl-2." Proc Am Assoc Cancer Res 2006; 47:572-3

[43] Hall JM, Korach KS. "Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells." Mol Endocrinol. 2003; 17(5):792-803.

[44] Luo LY, Katsaros D, Scorilas A et al. "Prognostic value of human kallikrein 10 expression in epithelial ovarian carcinoma." Clin Cancer Res. 2001; 7(8):2372-9.

[45] Dorn J, Schmitt M, Kates R et al. "Primary tumor levels of human tissue kallikreins affect surgical success and survival in ovarian cancer patients." Clin Cancer Res. 2007; 13(6):1742-8.

[46] Rosen DG, Wang L, Atkinson JN et al. "Potential markers that complement expression of CA125 in epithelial ovarian cancer." Gynecol Oncol. 2005; 99(2):267-77.

[47] Radzikowski Cz, Opolski A, Wietrzyk J. "Postępy w badaniach procesu wzrostu inwazyjnego i przerzutowania" Nowotwory Journal of Oncology 2002 v52, suplement 3, 57-65.

[48] Judware R, Culp LA: "Extracellular matrix and matrix receptors: alteration during tumor progression." W: Bertino JR(red)Encyclopedia of Cancer. San Diego: Academic Press; 1997, vol. 1, 660-679.

[49] Kucia M, Jankowski K, Reza R et al.:"CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion."J Mol Histol. 2004, 35, 233.

[50] Balkwill F."Cancer and the chemokine network."Nat Rev Cancer. 2004, 4, 540.

[51] Zhang S, Lin QD, Di W "Suppression of human ovarian carcinoma metastasis by the metastasis-suppressor gene, BRMS1." Int J Gynecol Cancer. 2006; 16(2):522-31.

[52] Birchmeier C,Birchmeier W, Gherardi E, Gherardi E & Vande Woude "GF2003 Met, metastasis, motility and more." Nature Reviews. Molecular Cell Biology 4 915–925.

[53] Zaffaroni N, Pennati M, Daidone MG:" Survivin as a target for new anticancer interventions." J Cell Mol Med, 9(2005), pp.360–372.

[54] Liguang Z, Peishu L, Hongluan M et al.:"Survivin expression in ovarian cancer." Exp Oncol. 2007; 29(2):121-5.

[55] Messenger S: "Kisspeptin and its receptor: new gatekeepers of puberty." J Neuroendocrinol. 2005; 17(10):687-8.

[56] Papaioannidou E, Msaouel P, Makri A et al."The role of kisspeptin/GPR54 in the reproductive system."In Vivo. 2011; 25(3):343-54.

[57] Prentice LM, Klausen C, Kalloger S et al. "Kisspeptin and GPR54 immunoreactivity in a cohort of 518 patients defines favourable prognosis and clear cell subtype in ovarian carcinoma." BMC Med. 2007; 5:33.

[58] Kirby HR, Maguire JJ, Colledge WH et al. "Kisspeptin receptor nomenclature, distribution, and function." Pharmacol Rev. 2010; 62(4):565-78.International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVII.

[59] Dong JT, Suzuki H, Pin SS et al."Down-regulation of the KAI1 metastasis suppressor gene during the progression of human prostatic cancer infrequently involves gene mutation or allelic loss." Cancer Res. 1996; 56(19):4387-90.

[60] Schindl M, Birner P, Bachtary B et al."The impact of expression of the metastasis suppressor protein KAI1 on prognosis in invasive squamous cell cervical cancer." Anticancer Res. 2000; 20(6B):4551-5.

- [61] Huang CI, Kohno N, Ogawa E et al. "Correlation of reduction in MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 expression with recurrences in breast cancer patients." *Am J Pathol.* 1998; 153(3):973-83.
- [62] Adachi M, Taki T, Ieki Y et al. „Correlation of KAI1/CD82 gene expression with good prognosis in patients with non-small cell lung cancer." *Cancer Res.* 1996; 56(8):1751-5.
- [63] Sho M, Adachi M, Taki T et al. "Transmembrane 4 superfamily as a prognostic factor in pancreatic cancer." *Int J Cancer.* 1998; 79(5):509-16.
- [64] Takaoka A, Hinoda Y, Satoh S et al. "Suppression of invasive properties of colon cancer cells by a metastasis suppressor KAI1 gene." *Oncogene.* 1998; 16(11):1443-53.
- [65] Rosengard AM, Krutzsch HC, Sheam A et al. "Reduced Nm23/Awd protein in tumour metastasis and aberrant Drosophila development." *Nature* 1989, 342, 177-180.
- [66] Stahl J.A., Leone A., Rosengard A.M. et al. "Identification of a second human nm23 gene, nm23-H2." *Cancer Res.* 1991, 51, 445-449.
- [67] Subramanian C., Cotter M.A., Robertson E.S. "Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA-3C interacts with the human metastasis suppressor Nm23-H1: A molecular link to cancer metastasis." *Nature Med.* 2001, 7, 350--355.
- [68] Cohn KH, Wang F, Desoto-LaPaix F. et al. "Association of nm23-H1 allelic deletions with distant metastases in colorectal carcinomas." *Lancet* 1991, 338, 722-724.
- [69] Leone A., Seeger R.C., Hong C.M. et al. "Evidence for nm23 RNA overexpression, DNA amplification and mutation in aggressive childhood Neuroblastomas". *Oncogene* 1993, 8, 855-865.
- [70] Mandai M., Konishi I., Komatsu T. et al. "Mutation of the nm23 gene, loss of heterozygosity at the nm23 locus and K-ras mutation in ovarian carcinoma: correlation with tumour progression and nm23 gene expression." *Br. J. Cancer* 1995, 72, 691-695.
- [71] Sherbert G.U., Lakshmi M.S. "The genetics of cancer." Academic Press San Diego 1997, 184-189
- [72] Arik D, Kulaçoğlu S. "P53, bcl-2, and nm23 expressions in serous ovarian tumors: correlation with the clinical and histopathological parameters." *Turk Patoloji Derg.* 2011; 27(1):38-45.

- [73] Luster AD.: "Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation." *N Engl J Med.* 1998,338,436-45.
- [74] Laing KJ, Secombes CJ.: "Chemokines." *Dev Comp Immunol.* 2004 ,28, 443-60.
- [75] Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF et al. : "International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors." *Pharmacol Rev.* 2000, 52, 145-76.
- [76] Müller A, Homey B, Soto H et al.: "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." *Nature.* 2001 ,410, 50-6.
- [77] Plante M, Rubin SC, Wong GY et al.: "Interleukin-6 level in serum and ascites as a prognostic factor in patients with epithelial ovarian cancer." *Cancer.*1994,73,1882-8.
- [78] Porcile C, Bajetto A, Barbieri F et al.: "Stromal cell-derived factor-1alpha (SDF-1alpha/CXCL12) stimulates ovarian cancer cell growth through the EGF receptor transactivation." *Exp Cell Res.* 2005, 308, 241-53.
- [79] Richmond A.: "Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth." *Nat Rev Immunol.* 2002, 2, 664-74.
- [80] Burns J.M., Summers B.C., Wang Y. et al.: " A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development." *J. Exp. Med.*, 2006; 203: 2201-2213
- [81] Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM et al."A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1(SDF-1)." *J Exp Med.*1996, 184, 1101-9.
- [82] Shirozu M, Nakano T, Inazawa J et al.: "Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene." *Genomics.* 1995, 28, 495-500.
- [83] Vlahakis SR, Villasis-Keever A, Gomez T et al.: "G protein-coupled chemokine receptors induce both survival and apoptotic signaling pathways." *J Immunol.* 2002, 169, 5546-54.
- [84] Volin MV, Joseph L, Shockley MS et al."Chemokine receptor CXCR4 expression in endothelium." *Biochem Biophys Res Commun.* 1998, 242, 46-53.
- [85] Lee BC, Lee TH, Avraham S et al."Involvement of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1alpha in breast cancer cell migration through human brain microvascular endothelial cells." *Mol Cancer Res.* 2004, 2, 327-38.
- [86] Ganju RK, Brubaker SA, Meyer J et al.: "The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways." *J Biol Chem.* 1998, 273, 23169-75.

- [87] Caruz A, Samson M, Alonso JM et al.: "Genomic organization and promoter characterization of human CXCR4 gene." *FEBS Lett.* 1998, 426, 271-8.
- [88] Baggiolini M. "Chemokines and leukocyte traffic." *Nature.* 1998, 392, 565-8.
- [89] Kucia M, Reza R, Miekus K et al.: "Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis." *Stem Cells.* 2005, 23, 879-94.
- [90] Avigdor A, Goichberg P, Shivtiel S et al.: "CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34+ stem/progenitor cells to bone marrow." *Blood.* 2004, 103, 2981-9.
- [91] Kimura T, Boehmler AM, Seitz G et al.: "The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 supports CXCR4-dependent migration and bone marrow homing of human CD34+ progenitor cells." *Blood.* 2004, 103, 4478-86.
- [92] Wysoczynski M, Reza R, Ratajczak J et al.: "Incorporation of CXCR4 into membrane lipid rafts primes homing-related responses of hematopoietic stem/progenitor cells to an SDF-1 gradient." *Blood.* 2005, 105, 40-8.
- [93] Janowska-Wieczorek A, Majka M et al.: "Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment." *Blood.* 2001, 98, 3143-9.
- [94] Tachibana K, Hirota S, Izasa H et al.: "The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract." *Nature.* 1998, 393, 591-4.
- [95] Cooper CR, Chay CH, Gendernalik JD et al.: "Stromal factors involved in prostate carcinoma metastasis to bone." *Cancer.* 2003, 97, 739-47.
- [96] Hartmann TN, Burger M, Burger JA. "The role of adhesion molecules and chemokine receptor CXCR4 (CD184) in small cell lung cancer." *J Biol Regul Homeost Agents.* 2004, 18, 126-30.
- [97] Hall JM, Korach KS.: "Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells." *Mol Endocrinol.* 2003, 17, 792-803.
- [98] Kang H, Watkins G, Parr C et al.: "Stromal cell derived factor-1: its influence on invasiveness and migration of breast cancer cells in vitro, and its association with prognosis and survival in human breast cancer." *Breast Cancer Res.* 2005, 7, R402-10.
- [99] Yang YC, Lee ZY, Wu CC et al.: "CXCR4 expression is associated with pelvic lymph node metastasis in cervical adenocarcinoma." *Int J Gynecol Cancer.* 2007, 17, 676-86.

- [100] Arya M, Ahmed H, Silhi N et al.:" Clinical importance and therapeutic implications of the pivotal CXCL12-CXCR4 (chemokine ligand-receptor) interaction in cancer cell migration." *Tumour Biol.* 2007, 28, 123-31.
- [101] Trimbos JB, Parmar M, Vergote I et al. International Collaborative Ovarian Neoplasm 1; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Collaborators-Adjuvant Chemotherapy in Ovarian Neoplasm. "International Collaborative Ovarian Neoplasm trial 1 and Adjuvant Chemotherapy in Ovarian Neoplasm trial: two parallel randomized phase III trials of adjuvant chemotherapy in patients with early-stage ovarian carcinoma." *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95(2):105-12.
- [102] Trimbos JB, Vergote I, Bolis G et al. "Impact of adjuvant chemotherapy and surgical staging in early-stage ovarian carcinoma: European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant Chemotherapy in Ovarian Neoplasm trial." EORTC-ACTION collaborators. European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Adjuvant Chemotherapy in Ovarian Neoplasm. *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95(2):113-25.
- [103] Tropé C, Kaern J. "Adjuvant chemotherapy for early-stage ovarian cancer: review of the literature." *Review. J Clin Oncol.* 2007; 25(20):2909-20.
- [104] Fader AN, Rose PG. "Role of surgery in ovarian carcinoma." *Review. J Clin Oncol.* 2007; 25(20):2873-83.
- [105] Tropé C, Kaern J, Hogberg T et al. "Randomized study on adjuvant chemotherapy in stage I high-risk ovarian cancer with evaluation of DNA-ploidy as prognostic instrument." *Ann Oncol.* 2000; 11(3):281-8.
- [106] du Bois A, Rochon J, Pfisterer J et al. "Variations in institutional infrastructure, physician specialization and experience, and outcome in ovarian cancer: a systematic review." *Gynecol Oncol.* 2009; 112(2):422-36.
- [107] Eisenkop SM, Spirtos NM, Montag TW et al. "The impact of subspecialty training on the management of advanced ovarian cancer." *Gynecol Oncol.* 1992; 47(2):203-9.
- [108] Paulsen T, Kjaerheim K, Kaern J et al. "Improved short-term survival for advanced ovarian, tubal, and peritoneal cancer patients operated at teaching hospitals." *Int J Gynecol Cancer.* 2006; 16 Suppl 1:11-7.
- [109] McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF et al. "Cyclophosphamide and cisplatin versus paclitaxel and cisplatin: a phase III randomized trial in patients with suboptimal stage III/IV ovarian cancer (from the Gynecologic Oncology Group)." *Semin Oncol.* 1996; 23(5 Suppl 12):40-7.

- [110] du Bois A, Lück HJ, Meier W et al. Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group. "A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer." *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95(17):1320-9
- [111] Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L, Gynecologic Oncology Group. "Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer." *N Engl J Med.* 2006; 354(1):34-43.
- [112] González-Martín A "Treatment of recurrent disease: randomized trials of monotherapy versus combination chemotherapy." GEICO Group. Review. *Int J Gynecol Cancer.* 2005;15 Suppl 3:241-6.
- [113] Kato M, Kitayama J, Kazama S et al. "Expression pattern of CXC chemokine receptor-4 is correlated with lymph node metastasis in human invasive ductal carcinoma." *Breast Cancer Res* 2003; 5: R144-R150
- [114] Uchida D, Begum NM, Almofti A et al. "Possible role of stromal-cell-derived factor-1/CXCR4 signaling on lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma." *Exp Cell Res* 2003; 290: 289-302
- [115] Schimanski CC, Schwald S, Simiantonaki N et al. "Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer." *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1743-1750
- [116] Kato M, Kitayama J, Kazama S et al. "Expression pattern of CXC chemokine receptor-4 is correlated with lymph node metastasis in human invasive ductal carcinoma." *Breast Cancer Res* 2003; 5: 144–50.
- [117] Taichman RS, Cooper C, Keller ET et al. "Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone." *Cancer Res*, 2002; 62: 1832–7.
- [118] Oonakahara K, Matsuyama W, Higashimoto I et al. "Stromal-derived factor-1 α /CXCL12–CXCR4 axis is involved in the dissemination of NSCLC cells into pleural space." *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 30: 671–7.
- [119] Scotton CJ, Wilson JL, Scott K et al. "Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer." *Cancer Res* 2002; 62: 5930–8.
- [120] Scotton CJ, Wilson JL, Milliken DG et al. "Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors?" *Cancer Res* 2001; 61: 4961–5.
- [121] Saur D, Seidler B, Schneider G et al. "CXCR4 expression increases liver and lung metastasis in a mouse model of pancreatic cancer." *Gastroenterology* 2005; 129: 1237–50.
- [122] Scala S, Ottaiano A, Ascierto PA et al. "Expression of CXCR4 predicts poor

prognosis in patients with malignant melanoma.” *Clin Cancer Res* 2005; 11:1835–41.

[123] Russell HV, Hicks J, Okcu MF et al.” CXCR4 expression in neuroblastoma primary tumors is associated with clinical presentation of bone and bone marrow metastases.” *J Pediatr Surg* 2004; 39: 1506–11.

[124] Kaifi JT, Yekebas EF, Schurr P et al.: “Tumor-cell homing to lymph nodes and bone marrow and CXCR4 expression in esophageal cancer.” *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1840–7.

[125] Kim J, Takeuchi H, Lam ST et al. :“Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival.” *J Clin Oncol* 2005; 23: 2744–53.

[126] Oda Y, Yamamoto H, Tamiya S et al.:“CXCR4 and VEGF expression in the primary site and the metastatic site of human osteosarcoma: analysis within a group of patients, all of whom developed lung metastasis.” *Mod Pathol* 2006; 19: 738–45.

[127] Pan J, Mestas J, Burdick MD et al.:” Stromal derived factor-1 (SDF-1/ CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis.” *Mol Cancer* 2006; 3: 56–69.

[128] Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M et al.: “Involvement of SDF-1 α /CXCR4 axis in the enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma,” *International Journal of Cancer*, vol. 122, no. 1, pp. 91–99, 2008.

[129] Jiang Y-P, Wu X-H, Shi B et al. :“Expression of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in human epithelial ovarian cancer: an independent prognostic factor for tumor progression,” *Gynecologic Oncology*, vol. 103, no. 1, pp. 226–233, 2006.

[130] Furuya M, Suyama T, Usui H et al. :“Up-regulation of CXC chemokines and their receptors: implications for proinflammatory microenvironments of ovarian carcinomas and endometriosis,” *Human Pathology*, vol. 38, no. 11, pp. 1676–1687, 2007.

[131] Nowak-Markwitz E, Puła B, Szajnik M et al.:” Expression of survivin, SDF-1 and CXCR4 on tumor cells in ovarian cancer.” *Ginekol Pol.* 2010; 81(9):674-7.

[132] Wang J, Cai J, Han F et al.:” Silencing of CXCR4 blocks progression of ovarian cancer and depresses canonical wnt signaling pathway.” *Int J Gynecol Cancer.* 2011; 21(6):981-7.

[133] Schimanski CC, Schwald S, Simiantonaki N et al.:“Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1743-1750.

[134] Gockel I, Schimanski CC, Heinrich C et al.:”Expression of chemokine receptor CXCR4 in esophageal squamous cell and adenocarcinoma.” *BMC Cancer* 2006; 6: 290

- [135] Yasumoto K, Koizumi K, Kawashima A et al.: "Role of the CXCL12/CXCR4 axis in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer." *Cancer Res* 2006; 66: 2181-2187
- [136] Wehler T, Wolfert F, Schimanski CC et al.: "Strong expression of chemokine receptor CXCR4 by pancreatic cancer correlates with advanced disease." *Oncol Rep* 2006; 16: 1159-1164
- [137] Schimanski CC, Bahre R, Gockel I et al.: "Dissemination of hepatocellular carcinoma is mediated via chemokine receptor CXCR4." *Br J Cancer* 2006; 95: 210-217
- [138] Zhao FL, Guo W. : "Expression of stromal derived factor-1 (SDF-1) and chemokine receptor (CXCR4) in bone metastasis of renal carcinoma." *Mol Biol Rep.* 2011; 38(2):1039-45.
- [139] Koizumi K, Hojo S, Akashi T et al.: "Chemokine receptors in cancer metastasis and cancer cell-derived chemokines in host immune response." *Review. Cancer Sci.* 2007; 98(11):1652-8.
- [140] Retz M, Sidhu SS, Lehmann J et al.: "New HIV-drug inhibits in vitro bladder cancer migration and invasion." *Eur Urol* 2005; 48: 1025–30.
- [141] Takenaga H, Tamamura K, Hiramatsu N et al.: "A single treatment with microcapsules containing a CXCR4 antagonist suppresses pulmonary metastasis of murine melanoma." *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320:226–32.
- [142] Mori R, Doi M, Koizumi ET et al.: "CXCR4 antagonist inhibits stromal cell-derived factor 1-induced migration and invasion of human pancreatic cancer." *Mol. Cancer Ther* 2004; 3: 29–37.
- [143] Liang Z, Wu T, Lou H et al.: "Inhibition of breast cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4." *Cancer Res* 2004; 64: 4302–8.
- [144] Chen S, Tuttle DL, Oshier JT et al.: "Transforming growth factor- β 1 increases CXCR4 expression, stromal-derived factor-1 α -stimulated signalling and human immunodeficiency virus-1 entry in human monocyte-derived macrophages." *Immunology* 2005; 114:565–74.
- [145] Franitza S, Kollet O, Brill A et al.: "TGF- β 1 enhances SDF-1 α -induced chemotaxis and homing of naive T cells by up-regulating CXCR4 expression and downstream cytoskeletal effector molecules." *Eur J Immunol* 2002; 32:193–202.
- [146] Sato K, Kawasaki H, Nagayama H, Enomoto M et al.: "TGF- β 1 reciprocally controls chemotaxis of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells via chemokine receptors." *J Immunol* 2000; 164:2285–95.
- [147] Massa A, Casagrande S, Bajetto A et al.: "SDF-1 controls pituitary cell proliferation through the activation of ERK1/2 and the Ca²⁺-dependent, cytosolic tyrosine kinase Pyk2," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1090, pp. 385–398, 2006.

- [148] Venkatakrisnan G, Salgia R, and Groopman JE: "Chemokine receptors CXCR-1/2 activate mitogen-activated protein kinase via the epidermal growth factor receptor in ovarian cancer cells," J Biol Chem. 2000 Mar 10;275(10):6868-75.
- [149] Balabanian K, Lagane B, Infantino S et al.: "The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes," The Journal of Biological Chemistry, vol. 280, no. 42, pp. 35760–35766, 2005.
- [150] Burns JM, Summers BC, Wang Y et al.: "A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development," Journal of Experimental Medicine, vol. 203, no. 9, pp. 2201–2213, 2006. 275, no. 10, pp. 6868–6875, 2000.
- [151] Barbieri F, Bajetto A, Florio T.: "Role of chemokine network in the development and progression of ovarian cancer: a potential novel pharmacological target" J Oncol. 2010;2010:426956.
- [152] Caruz A., Samson M., Alonso JM et al.: "Genomic organization and promoter characterization of human CXCR4 gene." FEBS Lett 1998, 426: 271-8
- [153] Taub DD, Oppenheim JJ. : "Chemokines, inflammation and the immune system." Review. Ther Immunol. 1994; 1(4):229-46.
- [154] Tuxen MK, Sölétormos G, Dombernowsky P.: "Tumor markers in the management of patients with ovarian cancer." Review. Cancer Treat Rev. 1995; 21(3):215-45.
- [155] Markowska J, Manys G, Szewierski Z.: "CA 125 in monitoring clinical course in ovarian cancer patients. A prospective clinical study." Eur J Gynaecol Oncol. 1992;13(2):201-4.
- [156] Hunter VJ, Weinberg JB, Haney AF et al. : "CA 125 in peritoneal fluid and serum from patients with benign gynecologic conditions and ovarian cancer." Gynecol Oncol. 1990; 36(2):161-5.

9. SPIS TABEL

- Tabela 1 - Stopnie zaawansowania klinicznego nowotworu jajnika wg FIGO
- Tabela 2 - Charakterystyka I grupy badanej
- Tabela 3 - Skład mieszaniny reakcyjnej dla QPCR z zastosowaniem SYBR Green
- Tabela 4 - Charakterystyka starterów użytych w reakcji QPCR (sekwencje starterów sensownych (S), antysensownych (A) oraz sond typu tagman)
- Tabela 5 - Charakterystyka II grupy badanej
- Tabela 6 - Rodzaj wykonanej operacji w raku jajnika
- Tabela 7 - Ekspresja *SDF1v1* w raku jajnika i w grupie kontrolnej
- Tabela 8 - Ekspresja *SDF1v2* w raku jajnika i w grupie kontrolnej
- Tabela 9 - Ekspresja *SDF1v3* w raku jajnika i w grupie kontrolnej
- Tabela 10 - Ekspresja *SDF1v4* w raku jajnika i w grupie kontrolnej
- Tabela 11 - Ekspresja *CXCR4v2* w raku jajnika i w grupie kontrolnej
- Tabela 12 - Stężenie SDF1[ng/ml] w surowicy krwi kobiet z grupy kontrolnej i chorych na raka jajnika przed operacją
- Tabela 13 - Stężenie SDF1[ng/ml] w surowicy krwi kobiet z grupy kontrolnej i chorych na raka jajnika po operacji
- Tabela 14 - Stężenie SDF1[ng/ml] w surowicy krwi kobiet z grupy kontrolnej i chorych na raka jajnika po chemioterapii
- Tabela 15 - Stężenie SDF1[ng/ml] w surowicy krwi kobiet z grupy kontrolnej i chorych na raka jajnika przed operacją, po operacji i po chemioterapii
- Tabela 16 - Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na surowiczego raka jajnika i na pozostałe typy histologiczne raka jajnika przed operacją
- Tabela 17 - Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na surowiczego raka jajnika i na pozostałe typy histologiczne raka jajnika po operacji

- Tabela 18 - Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na surowiczego raka jajnika i na pozostałe typy histologiczne raka jajnika po chemioterapii
- Tabela 19 - Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika o zróżnicowaniu histopatologicznym (G1 +G2) i G3 przed operacją
- Tabela 20 - Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika o zróżnicowaniu histopatologicznym (G1 +G2) i G3 po operacji
- Tabela 21 - Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika o zróżnicowaniu histopatologicznym (G1 +G2) i G3 po chemioterapii
- Tabela 22 - Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika w stopniu zaawansowania klinicznego wg FIGO I + II oraz III +IV przed operacją
- Tabela 23 - Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika w stopniu zaawansowania klinicznego wg FIGO I + II oraz III +IV po operacji
- Tabela 24 - Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika w stopniu zaawansowania klinicznego wg FIGO I + II oraz III +IV po chemioterapii
- Tabela 25 - Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika z wodobrzuszem i bez wodobrzusza przed operacją
- Tabela 26 - Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika z wodobrzuszem i bez wodobrzusza po operacji
- Tabela 27 - Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika z wodobrzuszem i bez wodobrzusza po chemioterapii
- Tabela 28 - Porównanie zachowania się stężeń SDF1 i CA 125 w surowicy kobiet w różnych stopniach zaawansowania klinicznego
- Tabela 29 - Porównanie zachowania się stężeń SDF1 i CA 125 w surowicy kobiet chorych na raka jajnika z wodobrzuszem i bez wodobrzusza

10. SPIS WYKRESÓW

- Wykres 1 - Względny poziom ekspresji *SDF1v1* w grupie kontrolnej i w raku jajnika
- Wykres 2 - Względny poziom ekspresji *SDF1v2* w grupie kontrolnej i w raku jajnika
- Wykres 3 - Względny poziom ekspresji *SDF1v3* w grupie kontrolnej i w raku jajnika
- Wykres 4 - Względny poziom ekspresji *SDF1v4* w grupie kontrolnej i w raku jajnika
- Wykres 5 - Względny poziom ekspresji *CXCR4v2* w grupie kontrolnej i w raku jajnika
- Wykres 6 - Stężenie SDF1[ng/ml] w surowicy krwi kobiet z grupy kontrolnej i chorych na raka jajnika przed operacją
- Wykres 7 - Stężenie SDF1[ng/ml] w surowicy krwi kobiet z grupy kontrolnej i chorych na raka jajnika po operacji
- Wykres 8 - Stężenie SDF1[ng/ml] w surowicy krwi kobiet z grupy kontrolnej i chorych na raka jajnika po chemioterapii
- Wykres 9 - Stężenie SDF1[ng/ml] w surowicy krwi kobiet z grupy kontrolnej i chorych na raka jajnika przed operacją, po operacji i po chemioterapii
- Wykres 10 - Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na surowiczego raka jajnika i na pozostałe typy histologiczne raka jajnika przed operacją
- Wykres 11 - Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na surowiczego raka jajnika i na pozostałe typy histologiczne raka jajnika po operacji
- Wykres 12 - Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na surowiczego raka jajnika i na pozostałe typy histologiczne raka jajnika po chemioterapii
- Wykres 13 - Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika o zróżnicowaniu histopatologicznym (G1 +G2) i G3 przed operacją
- Wykres 14 - Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika o zróżnicowaniu histopatologicznym (G1 +G2) i G3 po operacji

- Wykres 15 - Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika o zróżnicowaniu histopatologicznym (G1 +G2) i G3 po chemioterapii
- Wykres 16 - Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika w stopniu zaawansowania klinicznego wg FIGO I + II oraz III +IV przed operacją
- Wykres 17 - Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika w stopniu zaawansowania klinicznego wg FIGO I + II oraz III +IV po operacji
- Wykres 18 - Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika w stopniu zaawansowania klinicznego wg FIGO I + II oraz III +IV po chemioterapii
- Wykres 19 - Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika z wodobrzuszem i bez wodobrzusza przed operacją
- Wykres 20 - Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika z wodobrzuszem i bez wodobrzusza po operacji
- Wykres 21 - Stężenie SDF1 [ng/ml] w surowicy kobiet chorych na raka jajnika z wodobrzuszem i bez wodobrzusza po chemioterapii
- Wykres 22 - Porównanie zachowania się stężeń SDF1 i CA 125 w surowicy kobiet w różnych stopniach zaawansowania klinicznego
- Wykres 23 - Porównanie zachowania się stężeń SDF1 i CA 125 w surowicy kobiet chorych na raka jajnika z wodobrzuszem i bez wodobrzusza

11. SPIS RYCIN

Rycina 1 - Lokalizacja zaprojektowanych starterów w obrębie analizowanych genów

Rycina 2 - Wynik analizy elektroforetycznej trzech wybranych produktów reakcji PCR

