

# Karcinom ovaria – na cestě k lepší diagnostice a léčbě

RNDr. Luděk Závěský, Ph.D.

Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN, Praha

Karcinom ovaria představuje nejzhoubnější gynekologický nádor a velmi heterogenní skupinu tumorů s kontroverzním původem a nedostatečnou diagnostikou a léčbou. Známé genetické predispozice (např. mutace genů BRCA1/2) vysvětlují pouze malé procento případů a ani epidemiologické faktory zvyšující riziko se dosud nepodařilo vysvětlit z hlediska jejich kauzálního působení. Pro vznik karcinomu ovaria jsou uvažovány tři hlavní koncepty: epiteliálně mezenchymální tranzice (a mezenchymálně epiteliální tranzice), sekundární původ (např. z endometria, vejcovodu) a aktivita rakovinných kmenových buněk. S přehodnocením dřívější představy produkce proteinů v linii DNA (gen) – mRNA – protein a díky objevům regulační role nekódujících RNA v různých buněčných procesech dochází k intenzivnímu výzkumu jejich role i v karcinogenezi u karcinomu ovaria. Nejvíce studovanou třídou jsou mikroRNA, jejichž deregulace může být spojena právě s karcinogenezí. Zde mohou mikroRNA působit např. jako tumor supresory či jako onkogeny. V článku je učiněn přehled současných diagnostických a terapeutických postupů u karcinomu ovaria na pozadí intenzivního výzkumu regulačních mikroRNA a dalších faktorů, souvisejících např. s chemorezistencí či prognózou vývoje nemoci.

**Klíčová slova:** karcinom ovaria, diagnostika, prognóza, léčba, mikroRNA.

## Ovarian cancer – on the road to improved diagnostics and treatment

Epithelial ovarian cancer (EOC) represents the most lethal gynecological malignancy and a very heterogeneous group of tumors with controversial origin and insufficient diagnostics and treatment methods. Known genetic predispositions (e.g. mutations of BRCA1/2 genes) are associated only with a small percentage of cases. Epidemiological factors causing elevated risk have not been elucidated so far from the point of their causal activity. Three concepts are suggested for the EOC origin: epithelial mesenchymal transition (and vice versa), secondary origin (e.g. from endometrium, fallopian tube) and activity of cancer stem cells. The discovery and investigation of novel, small regulatory molecules of RNA in the last decade have changed the previous view of gene regulations in the link DNA (gene) – mRNA – protein, in various cellular processes. The intensive research is focused also on ovarian cancer. The most investigated class of molecules represent microRNA, which may be also connected with carcinogenesis. They may function, for example, as tumor suppressors, or oncogenes. The survey is provided on the current diagnostic and treatment approaches regarding EOC, on the background of research on regulatory microRNA and other factors, associated for example with chemoresistance or prognosis.

**Key words:** epithelial ovarian cancer, diagnosis, prognosis, treatment, microRNA.

Interní Med. 2011; 13(12): 490–492

### Karcinom ovaria – nejzhoubnější gynekologický nádor

Karcinom ovaria představuje z hlediska gynekologických nádorů heterogenní skupinu nádorů s největší malignitou a pátý nejzhoubnější typ nádorů u žen (1). Za posledních třicet let se vysoká úmrtnost výrazně nezměnila. Více než dvě třetiny případů jsou diagnostikovány jako pokročilá stadia (III a IV), kdy je nemoc v organismu již značně rozšířena a pravděpodobnost pětiletého přežití pacientek je pouze 20–33 % (u stadia IV pouze 12–19%) (2–3). Díky chybějícím relevantním, klinicky ověřeným diagnostickým markerům neexistuje možnost efektivního screeningu ani časně diagnostiky této nemoci. Léčbu pacientek také výrazně komplikuje značná tendence k recidivám spojená s necitlivostí či rezistencí k chemoterapii.

### Vznik, diagnostika a nejnovější výzkumy regulačních RNA u karcinomu ovaria

Vznik karcinomu ovaria je stále předmětem diskuzí. Existuje několik konceptů, které se vzájemně nemusí vylučovat a zahrnují 1) epiteliálně mezenchymální tranzici – EMT (s její obrácenou verzí, mezenchymálně epiteliální tranzicí – MET), 2) sekundární původ a 3) rakovinné kmenové buňky. V prvním případě se mohou uplatňovat procesy dediferenciace a rediferenciace, současně se změnami exprese markerů typických pro epiteliální (např. E-cadherin), resp. mezenchymální (např. vimentin, N-cadherin) buňky. Epiteliální buňky jsou se sousedními buňkami těsně spojeny a jsou uzpůsobeny pro procesy endocytózy, exocytózy a vezikulárního transportu. Naproti tomu mezenchymální buňky jsou

díky své odlišné polarizaci schopny migrace. To je důvodem, proč je změna epiteliální buňky na mezenchymální spojena s tvorbou metastáz. Pro sekundární původ z jiné než ovariální tkáně existuje řada dokladů, podle kterých high-grade serózní karcinomy ovaria mohou pocházet z řasinek vejcovodu (ale některé mohou mít původ v OSE – povrchovém epitelu ovaria s epiteliálními i mezenchymálními charakteristikami), a endometrioidní a světlebuněčné typy patrně vznikají z endometriózy. Mucinózní, low-grade serózní, některé high-grade serózní a borderline tumory mohou vznikat v OSE (4). Rakovinné kmenové buňky mohou souviset s předchozími modely, neboť se při jejich vzniku zřejmě uplatňují procesy dediferenciace. Typické markery těchto buněk jsou CD133+, CD117+, CD44+, CD24–.

Dále existují genetické predispozice (např. mutace genů BRCA1/2), epidemiologické faktory (např. vyšší počet ovulačních let zvyšující riziko, protektivní účinek orální antikoncepce) či epigenetické mechanismy související s karcinomem ovaria. O některých těchto faktorech se ví již dlouho, ale pro diagnostické účely mají (zatím) nízkou použitelnost.

Komplexnost vzájemně interagujících faktorů znemožňuje zatím nalezení markeru, který by mohl být použit pro rutinní diagnostiku u rizikových skupin či přímo pro screening. Výskyt mutací genů BRCA1/2 u hereditární formy karcinomu ovaria (max. 10% případů) také neznamená automaticky výskyt karcinomu ovaria, ale pouze zvýšenou pravděpodobnost. Přítomnost BRCA1 mutace zvyšuje riziko získání karcinomu ovaria během života o 15–30%, u BRCA2 mutací o 10–15% (5).

U mnoha geneticky podmíněných nemocí jsme byli zvyklí hovořit o polygenní dědičnosti, pokud nebyl znám jeden gen, který buď dominantně, nebo recesivně danou nemoc způsobuje. Situace je komplikovanější, neboť se musíme oprostit od dřívějšího pohledu na fungování buněčných procesů v linii gen (DNA) – mRNA – protein a zdánlivě nevýznamných transkripčních faktorů s tímto „centrálním dogmatem molekulární biologie“ souvisejících. Relativně nedávný objev malých nekódujících RNA (první mikroRNA byla objevena teprve v roce 1993, druhá až v roce 2000) přinesl dramatickou změnu vnímání regulace buněčných procesů na posttranskripční úrovni.

Typů malých nekódujících RNA je více (např. piRNA, siRNA), nejvíce studované jsou však výše uvedené mikroRNA (průměrná délka 22 nukleotidů, jednořetězcová struktura), uplatňující se v somatických buňkách. Fungují tak, že štěpí cílovou mRNA nebo brání její translaci do proteinu, a mohou tak snížit expresi příslušného proteinu. Pokud je exprese vlastní mikroRNA snížena (down-regulovaná), je exprese cílové mRNA (a příslušného proteinu) zvýšena. Naopak, vyšší exprese (up-regulace) mikroRNA vede k nižší expresi mRNA (a proteinu).

Vraťme se ke karcinomu ovaria. Diferenciální exprese mikroRNA se zde ukázala jako faktor schopný odlišit tumorové tkáně od referenčních, diagnostikovat nemoc v séru či krvi, či být prognostickým faktorem pro přežití pacientek. Široce pojaté expresní profily diagnostikovaly desítky jednotlivých mikroRNA (dosud jich je u člověka celkově známo přes 1 100), které mohou být deregulovány u karcinomu ovaria.

MikroRNA hrají roli zřejmě ve všech buněčných procesech (např. buněčném dělení, růstu, vývoji, diferenciaci či apoptóze – programové buněčné smrti), s čímž souvisí jejich účast na dělení buněk nádoru, procesech EMT a MET (viz výše), spojených s karcinogenezí a tvorbou metastáz, a chemorezistencí, související s apoptózou a mitochondriemi. MikroRNA mají význam i při vývoji imunitního systému. Navíc, mikroRNA nejen regulují rozličné buněčné procesy, ale jsou schopny regulovat stovky mRNA. Mohou být také samy regulovány řadou mechanismů a jsou součástí složité sítě pozitivních a negativních zpětných vazeb.

Pro zjednodušení představy úlohy mikroRNA v karcinogenezí si uvedeme dva hlavní směry, kterými mohou mikroRNA působit. První skupinou jsou tumor supresorové mikroRNA (např. let-7), jejichž cílem jsou onkogeny (např. Myc, K-Ras, HMGA-2). Druhou skupinou jsou onkogenní mikroRNA (oncomiRs), snižující expresi tumor supresorů nebo genů regulujících buněčné dělení, příkladem je např. miR-21, jejímž cílem je mRNA tumor supresoru PTEN (6).

### Metodické problémy použití exprese mikroRNA pro diagnostické účely

S tím, jak rostou naše znalosti o roli mikroRNA ve výše uvedených procesech, roste zároveň množství nově objevovaných molekul mikroRNA a jejich potenciálních cílů, čímž se situace značně znepráhledňuje. Důraz na výzkumy analyzující tumorové tkáně (bez analýz krve) či buněčné kultury a rozdílnost metodických přístupů k analýzám exprese RNA jsou hlavní faktory způsobující, že zatím neexistuje klinicky validovaný, široce geograficky aplikovatelný panel expresních mikroRNA markerů, jež by se daly použít pro diagnostiku karcinomu ovaria, ačkoli klinické studie tohoto typu již probíhají.

### „Klasická“ diagnostika karcinomu ovaria

Pro časná stadia nemoci neexistuje efektivní screeningová metoda (7). Rutinní diagnostika zahrnuje vyšetření pánve, stanovení markeru CA-125 (tumor marker) a transvaginální ultrazvuk, potenciálně spojených s analýzou některých dalších tumor markerů. CA-125 má však slabou senzitivitu i přes vylepšené algoritmy použití, zvláště pro časná stadia nemoci. Jako tumor markery jsou dále testovány např. glykoproteiny příbuzné mucinu, tj. HE-4, OVX1, CA-125 II, CA-72-4, CA15-3, mesothelin, kam patří i výše zmíněný CA-125, a také hepatické proteiny

a proteiny akutní fáze (haptoglobin-alfa, bikunin, C-reactive protein), i jiné markery s různou specificitou a senzitivitou (8–9). Při porovnání spolehlivosti cytologických a histologických metod (např. paracentéza, biopsie, chirurgická operace) a metod radiologických v kombinaci se stanovením CA-125 se dokonce ukázala nižší spolehlivost posledně jmenovaných metod (10).

### Léčba karcinomu ovaria a vznik chemorezistence

Radikální chirurgický zákrok (odstranění makroskopicky patrného ložiska) kombinovaný s následnou aplikací chemoterapeutických léků je základem léčby; navzdory vylepšeným postupům při operaci i při kombinované léčbě je však celkové procento vyléčených pacientek malé (30–35%). Radioterapie je využívána spíše výjimečně. Chemoterapeutická léčba může být neoadjuvantní (předoperačně) a nebo je aplikována adjuvantní chemoterapie po chirurgickém zákroku. Obecně jsou používány léky na bázi platiny (cis-platina, karboplatina) společně s taxany (paclitaxel, docetaxel). U nás je nejběžněji používaná kombinace paclitaxel + karboplatina.

U chemoterapeutické léčby karcinomu ovaria je úspěšnost iniciační léčby u 80–90% pacientek, u většiny z nich (60–80%) ovšem dochází k recidivám mezi 6 měsíci až 2 lety po léčbě, spojeným s výraznou rezistencí (asi u 85% pacientek) k širokému spektru chemoterapeutik. Chemorezistence může souviset s různými faktory, jejichž detailní vzájemné vazby zůstávají dosud neznámé. Mezi hlavní zkoumané faktory patří procesy epiteliálně mezenchymální tranziční (EMT), při které epiteliální buňky získávají schopnost migrovat a tvořit metastázy. Při těchto procesech dochází k up-regulaci transkripčních represorů E-cadherinu (Snail, Slug a Twist), mezenchymálních markerů (např. vimentinu a N-cadherinu) a u chemorezistentních nádorů také up-regulaci endothelinu-1 (ET-1)/endothelin A receptoru (ETAR). V chemorezistenci je dále uvažován vliv proteinů v extracelulární matrixi, např. TGFbeta-induced, který je regulován TGFbeta, a patrně se uplatňuje i řada jiných faktorů snižujících pravděpodobnost přežití. Nově byla nalezena vazba rakovinných kmenových buněk (CSCs) a EMT v souvislosti s chemorezistencí a velmi významnou roli hrají také mikroRNA při regulaci řady buněčných procesů souvisejících s rezistencí na chemoterapii (11).

Kontroverzní výsledky v mikroRNA-expresních studiích souvisejících s EMT byly zjištěny např. pro expresi členů miR-200 rodiny (miR-141,

miR-200a, b, c a miR-429), nicméně se ukazuje, že jejich nižší exprese patrně indukuje EMT a je spojena s recidivou a sníženou pravděpodobností přežití (a naopak). Na definitivní závěry si však musíme počkat (11, 12).

Další známou mikroRNA, účastníci se procesů souvisejících s chemorezistencí, je miR-199a, asociovaná (při nízké expresi) s chemorezistencí u recidivujících nádorů, jedním z jejích cílů je IKKbeta (indukuje sekreci prozánětlivých a protumorových cytokinů). Dále, miR-214 reguluje expresi PTEN (regulátor buněčného dělení), represe PTEN vede k aktivaci PI3K-Akt pathway (zvýšené přežívání buněk). Jiné faktory mohou souviset s transportem léků, např. miR-130a, jejímž cílem je M-CSF (prometastatický faktor asociovaný s chemorezistencí), či miR-27a a miR-451 regulující expresi transportéru MDR1 (role u rezistence na paclitaxel (11, 13)). Společné deregulace (buď zvýšená, nebo snížená exprese) byly zjištěny pro buněčné linie rezistentní k paclitaxelu a cis-platině, týkající se 6 mikroRNA: let-7e, miR-30c, miR-125b, miR130a, b, miR-335 (13).

Pro léčbu karcinomu ovaria jsou v současnosti testovány nové léky či imunoterapeutické přístupy a potenciál bude mít patrně i využití RNA-interference (RNAi) za použití exogenních siRNA. V souvislosti s výše uvedenými regulačními vlastnostmi mikroRNA lze v budoucnu očekávat i klinické využití inhibitorů onkogenních mikroRNA. V kombinaci se zavedením nových diagnostických markerů, právě např. mikroRNA, by mohlo dojít ke změně neuspokojivé bilance léčených a přeživších pacientek.

### Prognostické faktory u karcinomu ovaria

Uvedeme si některé příklady mikroRNA nebo proteinů, jejichž deregulovaná (snížená nebo zvýšená) exprese byla korelována se zhoršenou prognózou vývoje nemoci u pacientek a kratší dobou přežití (14–17): 1) Vyšší exprese rodiny miR-200, miR-519a, Lin28 a Lin28b, Wnt5a a Wnt7a; 2) Nižší exprese miR-153, let-7b a proteinů Dicer, Drosha, eIF6 (proteiny zahrnuté při zrání mikroRNA).

Role imunitního systému ve vývoji karcinomu ovaria zatím zůstává nedořešena. Předchozí

výzkumy však ukázaly určité korelace mezi množstvím určitých typů tumor infiltrujících lymfocytů a prognózou vývoje nemoci (18–19, dále viz 20). U zvýšených proporcí CD3+ a CD8+ T lymfocytů byla nalezena korelace s příznivější prognózou, ačkoli zvýšené množství CD3+ a gamma-delta T buněk se v jiném výzkumu ukázala jako nepříznivý faktor. Stejně kontroverzní jsou výsledky pro CD8+ buňky a makrofágy, jejichž vyšší počty byly korelovány s malignitou tumorů. Regulační CD4+CD25+FoxP3+ T buňky ve zvýšeném množství infiltrující tumory byly asociovány s horší prognózou pro pacientky.

Rozsáhlejší studie definitivně potvrzující uvedené korelace ať exprese mikroRNA, proteinů či množství tumor infiltrujících lymfocytů s prognózou vývoje nemoci však zatím chybí.

### Závěr

Od objevů nových regulačních molekul v podobě mikroRNA či dalších regulačních RNA k úspěšnému využití v cílené diagnostice a terapii karcinomu ovaria zbývá ještě dlouhá cesta. Předpokladem musí být úspěšná národní a mezinárodní validace jak diagnostických, terapeutických či v prognóze vývoje nemoci použitelných postupů v rámci rozsáhlých klinických studií. Další kapitolou bude zajištění odpovídajícího financování. Pokud se podaří vyřešit uvedené aspekty, možná se pacientky s karcinomem ovaria dočkají takové zdravotní péče, která povede k výrazně snížené úmrtnosti, než je dosud.

### Poděkování

Autor děkuje za podporu Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (VZ MSM 0021620808).

### Literatura

1. Jemal A, Siegel R, Xu JQ, Ward E. Cancer Statistics, 2010. *Ca-Cancer J Clin* 2010; 60: 277–300.
2. Gatta G, Lasota MB, Verdecchia A. Survival of European women with gynaecological tumours, during the period 1978–1989. *Eur J Cancer* 1998; 34: 2218–2225.
3. Heintz APM, Odicino F, Maisonneuve P, et al. Carcinoma of the ovary. *Int J Gynecol Obstet* 2006; 95: S161–S192.
4. Auersperg N. The Origin of Ovarian Carcinomas: A Unifying Hypothesis. *Int J Gynecol Pathol* 2011; 30: 12–21.
5. Wenham RM, Schildkraut JM, McLean K, et al. Polymorphisms in BRCA1 and BRCA2 and risk of epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4396–4403.

6. Wang D, Qiu CX, Zhang HJ, et al. Human microRNA Oncogenes and Tumor Suppressors Show Significantly Different Biological Patterns: From Functions to Targets. *PLoS One* 2010; 5: e13067.

7. Smith RA, Cokkinides V, Brooks D, et al. Cancer Screening in the United States, 2011 A Review of Current American Cancer Society Guidelines and Issues in Cancer Screening. *Ca-Cancer J Clin* 2011; 61: 8–30.

8. Terry KL, Sluss PM, Skates SJ, et al. Blood and urine markers for ovarian cancer: A comprehensive review. *Dis Markers* 2004; 20: 53–70.

9. Husseinzadeh N. Status of tumor markers in epithelial ovarian cancer has there been any progress? A review. *Gynecol Oncol* 2011; 120: 152–157.

10. Freedman OC, Dodge J, Shaw P, et al. Diagnosis of epithelial ovarian carcinoma prior to neoadjuvant chemotherapy. *Gynecol Oncol* 2010; 119: 22–25.

11. van Jaarsveld MTM, Helleman J, Berns EMJJ, Wiemer EAC. MicroRNAs in ovarian cancer biology and therapy resistance. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42: 1282–1290.

12. Chen J, Wang LJ, Matzunina LV, et al. Overexpression of miR-429 induces mesenchymal-to-epithelial transition (MET) in metastatic ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2011; 121 (1): 200–205.

13. Sorrentino A, Liu CG, Addario A, et al. Role of microRNAs in drug-resistant ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2008; 111: 478–486.

14. Merritt WM, Lin YG, Han LY, et al. Dicer, Drosha, and Outcomes in Patients with Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2008; 359: 2641–2650.

15. Nam EJ, Yoon HJ, Kim SW, et al. MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 2690–2695.

16. Viswanathan SR, Daley GQ, Gregory RI. Selective blockade of MicroRNA processing by Lin 28. *Science* 2008; 320: 97–100.

17. Kim TH, Kim YK, Kwon Y, et al. Deregulation of miR-519a, 153, and 485–5p and its clinicopathological relevance in ovarian epithelial tumours. *Histopathology* 2010; 57: 734–743.

18. Milne K, Kobel M, Kalloger SE, et al. Systematic Analysis of Immune Infiltrates in High-Grade Serous Ovarian Cancer Reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as Positive Prognostic Factors. *PLoS One* 2009; 4: e6412.

19. Wolf D, Wolf AM, Rumpold H, et al. The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8326–8331.

20. Závěský L, Jančárková N, Kohoutová M. Ovarian cancer: Origin and factors involved in carcinogenesis with potential use in diagnosis, treatment and prognosis of the disease. *Neoplasma* 2011; 58(6): 457–468.

Článek přijat redakcí: 20. 9. 2011

Článek přijat k publikaci: 17. 10. 2011

### RNDr. Luděk Závěský, Ph.D.

Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN  
Albertov 4, 128 00 Praha 2  
ludek.zavesky@vfn.cz