

Received: 2008.10.27
Accepted: 2009.02.16
Published: 2009.02.27

Molekularne markery karcynogenezy w diagnostyce raka szyjki macicy

Molecular markers of carcinogenesis in the diagnostics of cervical cancer

Grażyna Ewa Będowska, Sławomir Ławicki, Maciej Szmitkowski

Zakład Diagnostyki Biochemicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Streszczenie

Rak szyjki macicy jest najczęstszym nowotworem złośliwym narządu rodniczego, zajmuje drugie miejsce pod względem częstości występowania u kobiet, zaraz po raku piersi. Cechuje się również wysoką umieralnością, dlatego też poszukuje się nowych metod diagnostycznych, w tym markerów nowotworowych, umożliwiających wcześniejsze rozpoznanie nowotworu oraz wykrycie nawrotów raka po zastosowanym leczeniu. W diagnostyce raka szyjki macicy wykazują zastosowanie różne markery nowotworowe, np. antygen raka płaskonabłonkowego (SCC-Ag), tkankowy polipeptydowy antygen (TPA), CYFRA 21-1, a także niektóre cytokiny, tj. czynnik wzrostu (VEGF), czynnik stymulujący kolonie granulocytarne (G-CSF) czy czynnik stymulujący kolonie makrofagowe (M-CSF). Ponadto zidentyfikowano około 150 genów związanych z karcynogenezą raka szyjki macicy. Dlatego też pracę poświęcono ocenie przydatności diagnostycznej molekularnych markerów karcynogenezy, a zwłaszcza P53, Bcl-2, Brn-3a, MCM, porównując je z markerami klasycznymi lub cytokinami przydatnymi w diagnostyce tego nowotworu. Wykazano przydatność telomerazy i białek Brn-3a w badaniach przesiewowych raka szyjki macicy, P53 w monitorowaniu skuteczności leczenia, a Bcl-2 jako czynnika prognostycznego przeżycia pacjentek. Podsumowując, należy zauważyć, iż molekularne markery karcynogenezy wykazują przydatność w diagnostyce raka szyjki macicy, jednak wymaga to dalszych i bardziej szczegółowych badań.

Słowa kluczowe:

molekularne markery karcynogenezy • rak szyjki macicy • markery nowotworowe

Summary

Cervical carcinoma is the most frequent disease of the reproductive organ and is the second most common cancer in women after breast cancer. As it is characterized by high mortality, new diagnostic methods are needed, for example tumor markers, enabling earlier diagnosis and rapid detection of recurrence after therapy. Different tumor markers may be useful in the diagnostics of cervical cancer, for example squamous cell carcinoma antigen (SCC-Ag), tissue polypeptide antigen (TPA), and CYFRA 21-1, as well as some cytokines such as vascular endothelial growth factor (VEGF), granulocyte colony-stimulating factor, and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF). About 150 genes connected with the carcinogenesis of cervical carcinoma have been identified. This paper is devoted to evaluating the diagnostic usefulness of molecular markers of carcinogenesis, especially P53, Bcl-2, Brn-3a, and MCM, and comparing the results with those of typical tumor markers or cytokines useful in diagnosing this type of cancer. It was shown that telomerase and Brn-3a proteins demonstrate usefulness in screening examination, P53 in monitoring the effectiveness of therapy, and Bcl-2 as a survival prognostic factor. In summary, it is

evident that molecular makers of carcinogenesis are helpful in the diagnostics of cervical cancer, but further investigation and confirmation by a prospective study is necessary.

Key words: molecular markers of carcinogenesis • cervical cancer • tumor markers

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=880003>

Word count: 2906

Tables: –

Figures: –

References: 52

Adres autora: prof. dr hab. Maciej Szmitkowski, Zakład Diagnostyki Biochemicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, ul. Waszyngtona 15A, 15-269 Białystok; e-mail: zdb@umwb.edu.pl

EPIDEMIOLOGIA RAKA SZYJKI MACICY

Rak szyjki macicy jest jednym z najczęstszych nowotworów złośliwych narządu rodno. Rocznie na świecie diagnozuje się 500 tys. nowych przypadków zachorowań oraz 200 tys. zgonów z powodu tego nowotworu. W Polsce rak szyjki macicy stanowi około 7,7% wszystkich nowotworów złośliwych u kobiet. Rocznie z powodu tego nowotworu umiera w Polsce prawie 2 tys. kobiet, a najczęstsze zgony występują w grupach wiekowych 45–49 i 65–74 lata [21]. W porównaniu z krajami Europy Zachodniej mamy również jeden z najniższych odsetków pięcioletnich przeżyć [18,52].

Jednym z głównych czynników zwiększających ryzyko zachorowania na raka szyjki macicy jest infekcja wirusem brodawczaka ludzkiego typu HPV-16 lub HPV-18 i dotyczy to 90–98% przypadków tego nowotworu [45]. Te typy wirusa są też najczęstszą przyczyną powstawania stanów przedrakowych (cervical intraepithelial neoplasia – CIN) CIN 2 i 3, które nieleczone mogą prowadzić do przekształcenia zmiany w nowotwór szyjki macicy zarówno płaskonabłonkowy, jak i gruczolowy [14].

Podstawą rozpoznania raka szyjki macicy jest badanie histopatologiczne, najczęściej występuje typ płaskonabłonkowy (95%), rzadziej typ gruczolowy (około 4%) [21]. Stopień klinicznego zaawansowania raka szyjki macicy i raka endometrium określany jest według Międzynarodowej Federacji Ginekologów i Położników (FIGO) lub TNM. Najwyższe odsetki przeżyć chorych występują w niskich stopniach zaawansowania raka (w stopniu 0 przeżywa prawie 100% leczonych kobiet) i maleją wraz z zaawansowaniem nowotworu do około 20% w stopniach IIIA i IIIB [21,50].

MARKERY NOWOTWOROWE W DIAGNOSTYCE RAKA SZYJKI MACICY

Markerem nowotworowym nazywamy substancję wielkocząsteczkową, najczęściej białko z komponentą węglowodanową lub lipidową, albo glikolipid, które bez względu na spełniane funkcje (enzym, hormon, substancja biologicznie nieczynna), jest wytwarzana albo wyłącznie w komórkach nowotworowych, albo zarówno w komórkach nowotworowych, jak i w komórkach prawidłowych, jeżeli tylko jej wytwarzanie w nowotworze jest znacząco większe od wytwarzania w komórce prawidłowej [39].

Markery wykazują zastosowanie w poszczególnych etapach procesu diagnostycznego raka szyjki macicy, tj. w wykrywaniu (badania przesiewowe wybranych populacji lub grup o zwiększonym ryzyku zapadalności na ten nowotwór), określaniu stopnia zaawansowania (wykorzystanie zależności stężenia danego markera od rozległości procesu nowotworowego), lokalizowaniu zmian nowotworowych przez podanie znakowanego przeciwciała o dużej swoistości i powinowactwie do wybranego markera na powierzchni komórki nowotworowej, monitorowaniu leczenia, wczesnym wykryciu wznowy po zastosowanym leczeniu zwłaszcza po zabiegu uznanym za doszczętny [24].

W diagnostyce raka szyjki macicy znalazły zastosowanie klasyczne markery nowotworowe, takie jak antygen raka płaskonabłonkowego (squamous cell carcinoma antigen – SCC-Ag) [6,37,40], tkankowy antygen polipeptydowy (tissue polypeptide antigen – TPA) [19] i CYFRA 21-1 [38].

Do grupy nowych markerów raka szyjki macicy zalicza się np. niektóre cytokiny. Wykazano, iż w przebiegu różnych nowotworów często dochodzi do nadmiernej i niekontrolowanej ekspresji genów cytokin i ich receptorów w komórkach nowotworowych (wykazanie mRNA), a także do zwiększenia syntezy tych czynników w komórkach narządów objętych procesem nowotworowym, jak również do ich wytwarzania bezpośrednio przez komórki nowotworowe [47]. W diagnostyce raka szyjki macicy wykazują zastosowanie m.in. takie cytokiny jak: naczyniowy czynnik wzrostu (vascular endothelial growth factor – VEGF) [2,13], receptory naskórkowego czynnika wzrostu – (epidermal growth factor receptor – EGFR) [23], a także cytokiny hematopoetyczne, np. czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytarnych (granulocyte – colony stimulating factor – G-CSF) [22,27,46], czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagowych (macrophage – colony stimulating factor – M-CSF) [26], czynnik wzrostu komórek pnia (stem cell factor – SCF) [26] oraz czynnik martwicy nowotworów (tumor necrosis factor- α – TNF- α) [1].

Trwają badania nad wykorzystaniem, jako markerów neoplazji w raku szyjki macicy, innych substancji, takich jak np. przenośnik glukozy bariera krew-mózg typ 1 (glucose transporter type 1 – GLUT1) [34] czy receptora transferyny (transferin receptor – TfR) [20].



Vieira i wsp. [44] oceniali przydatność antygeny CD34 (glikoproteina występująca w hematopoetycznych komórkach progenitorowych i komórkach endotelium) jako markera angiogenezy u pacjentek z rakiem szyjki macicy.

MOLEKULARNE MARKERY KARCYNogenezy W RAKU SZYJKI MACICY

Postęp metod badawczych pozwolił na wykorzystanie w diagnostyce raka szyjki macicy molekularnych markerów karcynogenezy. Szybki i niekontrolowany wzrost, który charakteryzuje cykl rozwojowy komórek nowotworu zależy od wielu czynników, a przede wszystkim od zmian w genach związanych z kontrolą cyklu komórkowego. Na rozwój nowotworu mają wpływ mutacje DNA, które prowadzą do zaburzeń wzrostu, różnicowania, proliferacji, starzenia i śmierci komórek. Badania molekularne doprowadziły do wykrycia i zidentyfikowania prawie 150 genów związanych z karcynogenezą, większość z tych genów koduje białka regulujące cykl komórkowy, różnicowanie i apoptozę.

Białko P53

Do najważniejszych molekularnych markerów karcynogenezy należy białko supresorowe nowotworów - P53. W prawidłowych warunkach białko to uczestniczy w regulacji cyklu komórkowego, wykazuje również działanie anty-onkogenne zapoczątkując apoptozę nieodwracalnie uszkodzonej komórki. Mutacja genu pozbawia białko P53 właściwości kontrolnych nad cyklem komórkowym, powodując nadmierną ekspresję jego nieaktywnej postaci i prowadzi do onkogenezy [30]. Do inaktywacji dochodzi też często pod wpływem wirusowo kodowanych białek, takich jak np. onkoproteina HPV-E6. W przeważającej większości raków szyjki macicy wykryto HPV-DNA o typie wysokiego ryzyka, dlatego też nowotwory te wykazywały ekspresję onkoprotein E6 i E7 [15]. Białko E6 wytwarzane przez HPV-16 i HPV-18 łączy się swoiście z prawidłowym typem białka P53, co prowadzi do jego funkcjonalnej inaktywacji i szybkiej degradacji przez szlak ubiquityny [9].

Horn i wsp. [16] badali kliniczne znaczenie zmutowanego białka P53 i oceniali jego wartość, jako czynnika prognostycznego, u pacjentek poddanych operacji z powodu raka szyjki macicy (rak płaskonabłonkowy i gruczolakorak) we wczesnym stadium. Badania immunohistochemiczne na obecność inaktywowanego białka P53 dały pozytywny wynik w 63,8% badanych przypadków płaskonabłonkowego raka szyjki macicy, zwłaszcza w bardziej zaawansowanym stadium (istotna statystycznie różnica w liczbie pozytywnych wyników między I a II stopniem zaawansowania wg TNM ($P=0,007$)). W gruczolakoraku barwienie immunohistochemiczne dało negatywny wynik we wszystkich próbkach ($P=0,0000$), co jak sądzą autorzy jest związane prawdopodobnie ze zwiększoną degradacją zmutowanego białka P53 w tym typie raka. Konkludując, immunoreaktywność zmutowanego białka P53 korelowała znacząco jedynie z miejscowym rozwojem nowotworu, nie wykazując zależności z zajęciem naczyń chłonnych. Autorom nie udało się również wykazać znaczenia zmutowanego białka P53 jako czynnika prognozującego długość okresu przeżycia wolnego od wznovy (disease-free survival – DFS), jak również przepowiadającego nawrót nowotworu [16].

Oh i wsp. [28] badali stężenia zmutowanego białka P53 i receptora naskórkowego czynnika wzrostu (epidermal growth factor – EGFR) w surowicy pacjentek z rakiem szyjki macicy przed leczeniem, ich wzajemną korelację oraz znaczenie prognostyczne. Badaniem objęto pacjentki z rakiem szyjki macicy w stadiach IA-IV wg FIGO, w tym z rakiem *in situ* i z gruczolakorakiem. Za punkt odcięcia dla zmutowanego białka P53 przyjęto stężenie na poziomie 0,20 ng/ml. Nie wykazano statystycznych różnic stężeń zmutowanego białka P53 w grupie badanej i kontrolnej ($P=0,324$), a także między pacjentkami, u których występowanie komórek mających charakter złośliwy ogranicza się jedynie do nabłonka (*carcinoma in situ* – CIS), rakiem inwazyjnym czy ze stwierdzoną wznową oraz w zależności od stopnia zaawansowania raka wg FIGO. Stężenie zmutowanego białka P53 było podwyższone jedynie u 19% pacjentek z rakiem inwazyjnym lub wznową oraz u 8% pacjentek z CIS. Jedną z pacjentek, u której stwierdzono przerzuty do węzłów chłonnych miała wysokie stężenie zmutowanego białka P53 i EGFR. Wykazano jednak dodatnią korelację między stężeniami w surowicy EGFR i zmutowanego białka P53 ($P<0,0001$). W analizie wieloczynnikowej podwyższone stężenie zmutowanego białka P53 było znaczącym statystycznie czynnikiem prognostycznym niskiej przeżywalności pacjentek z inwazyjnym rakiem szyjki macicy ($P=0,046$), oraz pacjentek ze wznową raka szyjki macicy ($P=0,046$). W związku z powyższym, autorzy sugerują możliwość wykorzystania zmutowanego białka P53 i EGFR jako markerów w monitorowaniu leczenia pacjentek z rakiem szyjki macicy, jednak wymaga to dalszych badań [28].

Inhibitory cyklinozależnej kinazy

Inhibitory cyklinozależnej kinazy należą do dwóch grup: Cip/Kip (P21, P27, P57) inhibitującej kompleks cyklina A/E-cdk2, oraz INK4 (P15, P16, P18, P19) inhibitującej kompleks cyklina D-cdk 4/6. Inhibitory cdk są supresorami guzów nowotworowych, a utrata tej funkcji prowadzi do transformacji nowotworowej. Białko P27 pełni decydującą rolę w regulacji odpowiedzi komórek na sygnały zewnętrzne, jest również mediatorem różnicowania komórki, adhezji komórka-komórka, oraz apoptozy [35]. Onkoproteina HPV-16 E7 inaktywuje białko P27 nie degradując go, a jednocześnie inaktywacja ta nie musi prowadzić do zapoczątkowania transformacji nowotworowej [51].

Białko P21 odgrywa rolę w odpowiedzi komórek na uszkodzenia DNA, przez zatrzymanie cyklu komórkowego i umożliwienie jego naprawy lub zainicjowanie apoptozy i jest uważane również za główny efektor białka P53 [10]. HPV-16 E7 onkogen może również inaktywować białko P21 nie degradując go, co daje w rezultacie dużą aktywność cdk2, mimo wysokiego poziomu białka P21, tak jak w przypadku białka P27 [12]. Białko P16 odgrywa rolę w procesie starzenia się komórki, jej wroście oraz w procesie angiogenezy. Mutacje w genie kodującym białko P16 wykryto w wielu nowotworach, również w występujących rodzinie [33].

Van de Putte i wsp. [42] zajęli się oceną prognostycznego znaczenia białek: P27, P21 i P16 - inhibitorów cyklinozależnej kinazy (cdk) we wczesnych stadiach raka szyjki macicy. Badaniem immunohistochemicznymi objęto tkanki płasko-

nabłonkowego raka szyjki macicy w stadium IB wg FIGO. Wszystkie pacjentki poddano histerektomii i obustronemu usunięciu węzłów chłonnych miedniczych. Pomimo tak wczesnego stadium zaawansowania wg FIGO u części z nich stwierdzono obecność komórek nowotworowych w usuniętych naczyniach chłonnych. Rezultaty przeprowadzonych badań wykazały brak ekspresji białek P21 i P16 w prawidłowym nabłonku płaskim w grupie kontrolnej (osoby zdrowe), podczas gdy ekspresja białka P27 została ujawniona w ponad połowie badanych komórek. W przypadku płaskonabłonkowego raka szyjki macicy zauważono wzrost ekspresji dwóch z trzech badanych białek P21 i P16. Wysoką ekspresję zaobserwowano odpowiednio w 20 i 43% badanych przypadków. Ekspresja białka P27 w płaskonabłonkowym raku szyjki macicy była obniżona, ale była ona znacząco związana z większym rozmiarem guza ($P=0,009$) oraz młodym wiekiem pacjentek ($P=0,025$). Ekspresji białka P21 nie udało się powiązać z żadnym z klinicznoopatologicznych parametrów. W 57% przypadków zaobserwowano niską ekspresję (<50% wybarwionych komórek) białka P16, jednak była ona znacząco związana z wielkością guza ($>4\text{cm}$), głębokością nacieczenia i zajęciem węzłów chłonnych. W wieloczynnikowych analizach tylko głębokość nacieczenia przez nowotwór była jedynym i niezależnym czynnikiem prognostycznym zarówno dla okresu przeżycia wolnego od wznowy (DFS) ($P<0,0001$), jak i przeżycia zależnego od nowotworu (disease-specific survival – DSS) ($P<0,0001$). Żadne z badanych białek będących inhibitorami cdk nie wykazało znaczenia jako niezależny prognostycznie czynnik w badanej grupie pacjentek z płaskonabłonkowym rakiem szyjki macicy w stadium IB.

Bcl-2 i kaspazy

Rodzina Bcl-2 łączy białka reprezentujące jedną z biologicznie najistotniejszych klas produktów genów regulujących apoptozę, które mogą pełnić rolę antagonistów (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w Bfl-1/A1 i Mcl-1) lub agonistów apoptozy (Bax, Bak, Bok, Bcl-X_s, Bad, Bid, Bik, Bim, Noxa i Hrk). Stosunek antagonistów do agonistów uśmiercania komórki determinuje wrażliwość komórek na sygnał apoptozy. Badania ujawniły, że oprócz grupy białek Bcl-2, liczne proteazy z rodziny enzymu konwertującego IL-1 β (interleukin-1 beta-converting enzyme – ICE), znane jako kaspazy, również odgrywają rolę w fazie efektorowej apoptozy. Kaspazy są niezbędnymi komponentami proteolitycznej kaskady, która jest wywołana w odpowiedzi na bodźce wywołujące śmierć komórki, odgrywają one rolę zarówno w regulacji, jak i przeprowadzaniu poszczególnych stadiów apoptozy. Dotychczas zidentyfikowano dwunastu członków rodziny kaspaz, a wśród nich kaspazy 3 i 6 [31].

Chung i wsp. [8] badali zmiany w ekspresji genów regulujących apoptozę (pięciu genów z grupy Bcl-2 i dwóch z grupy kaspaz) oraz ich znaczenie w raku szyjki macicy. Badaniami immunohistochemicznymi objęto pacjentki z inwazyjnym płaskonabłonkowym rakiem szyjki macicy w stadiach I-IV wg FIGO. W badaniach immunohistochemicznych uzyskano dodatnie wyniki ekspresji u pacjentek z inwazyjnym rakiem szyjki macicy dla wszystkich siedmiu badanych białek: Bcl-2 w 65%, Mcl-1 w 70%, Bcl-X_L w 81%, Bax w 65% i Bak w 56%, kaspazy 3 w 77%, a kaspazy 6 w 21% próbek. Ekspresja Bcl-2 i Bak była znacząco skorelowana ze stopniem dojrzałości histologicznej guza ($P<0,05$). Częstość występowania dodatnich wyników

na obecność kaspazy 6 była znacząco wyższa w zaawansowanych stadiach nowotworu w porównaniu do niższych ($P<0,01$). Odsetek procentowy przypadków z ekspresją Bax był wyższy u pacjentek bez objawów choroby po zastosowanym leczeniu, w porównaniu do pacjentek z przetrwalą chorobą, lub zmarłych z jej powodu ($P<0,05$). Znaczące różnice w odsetku DFS wykazano w grupie pacjentek z dodatnią ekspresją Bax ($P<0,05$), natomiast w odsetku przeżyć całkowitych (overall survival – OS) zauważono w grupie pacjentek z dodatnią ekspresją Mcl-1 ($P<0,05$).

Tjamlą i wsp. [41] badali zależności między białkami powiązаныmi z apoptozą (Bcl-2 i Bax), białkiem supresorowym P53, markerami proliferacji: jądrowym antygenem komórek proliferujących (proliferating cell nuclear antigen – PCNA) i indeksem mitotycznym (mitotic index – MI), a wirusem HPV i angiogenezą u pacjentek z rakiem szyjki macicy (rak płaskonabłonkowy, gruczolakorak i inne typy) w stadiach IA-IVB. Wyniki badań immunohistochemicznych ujawniły ekspresję białka Bcl-2 w 68% badanych przypadków i korelowały one z ekspresją PCNA ($P=0,045$), gęstością unaczynienia guza ($P=0,010$) oraz zajęciem naczyń chłonnych ($P=0,015$). Badania na obecność białka Bax dały dodatni wynik w 83% badanych przypadków, nie stwierdzono jednak żadnej znaczącej korelacji z innymi badanymi czynnikami czy parametrami histopatologicznymi. Immunoreaktywność zmutowanego białka P53 potwierdzono w 42% badanych przypadków i korelowała ona jedynie ze stopniem dojrzałości histologicznej guza ($P=0,023$). Barwienie immunohistochemiczne na obecność PCNA dało dodatni wynik w 74% przypadków, a jego wysoka ekspresja korelowała z ekspresją białka Bcl-2 ($P=0,045$), MI ($P<0,001$), HPV ($P=0,021$), stopniem dojrzałości histologicznej guza ($P=0,009$), nacieczeniem naczyń chłonnych ($P=0,019$), oraz zajęciem węzłów chłonnych ($P=0,010$). MI był dodatni w 74% przypadków i istotnie korelował z PCNA ($P<0,001$), stopniem zróżnicowania histologicznego guza ($P=0,018$) oraz z nacieczeniem naczyń chłonnych ($P=0,019$). Z ogólnej liczby 96 przypadków 87% wykazało obecność wirusa HPV, najczęściej w typie HPV 16. Jedyny istotny statystycznie związek odnaleziono z ekspresją PCNA ($P=0,021$). Gęstość unaczynienia korelowała jedynie z naciekaniem naczyń chłonnych ($P=0,048$). Autorzy nie wykryli istnienia żadnej korelacji między Bcl-2, Bax, stadiem zaawansowania wg FIGO, stopniem zróżnicowania guza, nacieczeniem naczyń chłonnych, zajęciem węzłów chłonnych a typem HPV 16 i 18. Odsetek przeżyć całkowitych (OS) wskazał na ekspresję Bcl-2 ($P<0,001$), nacieczenie naczyń chłonnych ($P=0,004$), MI ($P=0,019$), oraz stopień dojrzałości histologicznej guza ($P=0,048$) jako na niezależne czynniki prognostyczne w raku szyjki macicy. Wieloczynnikowa analiza przeprowadzona po włączeniu do grupy badanej pacjentek z przerzutami do węzłów chłonnych wykazała, iż najlepszymi niezależnymi prognostycznie czynnikami OS pacjentek z rakiem szyjki macicy były ekspresja Bcl-2 ($P=0,001$), nacieczenie naczyń chłonnych ($P=0,003$), oraz indeks mitotyczny ($P=0,044$).

Białka MCM

Białka MCM są istotnym elementem inicjującym i limitującym replikację DNA w komórkach eukariotycznych. Są one obecne w komórkach w czasie cyklu, a zanikają po przejściu komórki w stadium różnicowania się lub spoczynku. Dlatego



mogą być czułym i swoistym markerem nowotworowego cyklu komórkowego. Wykazano wysoką ekspresję białek MCM na powierzchni zmienionych nowotworowo komórek nabłonkowych, nie występują one natomiast na powierzchni komórek prawidłowych [11]. Badania przeprowadzone z użyciem przeciwciał przeciw białkom MCM pozwoliły znacznie uwytłumaczyć nieprawidłowe komórki w badaniu cytologicznym [48], potwierdzono również dodatnią korelację tych białek ze stopniem dysplazji szyjki macicy [4].

Telomeraza

Telomeraza jest wyspecjalizowaną odwrotną transkryptazą, a jej zadaniem jest odbudowa zakończeń chromosomów zwanych telomerami. Podczas podziałów komórkowych dochodzi do stopniowego skracania telomerów. Powyżej określonej liczby podziałów następuje skrócenie telomerów prowadzące do niestabilności chromosomowej, starzenia i śmierci komórki. Występują dwie podjednostki telomerazy: hTR (podjednostka telomerazy odpowiedzialna za immortalizację komórek) i hTERT (podjednostka katalityczna o aktywności odwrotnej transkryptazy), odbudowujące nić DNA telomeru. Telomeraza wytwarzana jest jedynie w komórkach płodu. Gen kodujący telomerazę jest nieczynny w prawidłowych komórkach, natomiast w komórkach nowotworowych ulega stałej aktywacji pobudzając bezustannie komórki do podziału. Komórki nowotworowe mogą również rozpocząć wytwarzanie telomerazy i w ten sposób ułatwić sobie intensywne podziały. Ostatnio badano użycie telomerazy jako biomarkera dysplazji i raka szyjki macicy [17].

Wykazano zwiększoną ekspresję telomerazy w bardziej zaawansowanych stadiach raka szyjki macicy – 5–83% (high grade squamous intraepithelial lesions – HSIL), w stosunku do mniej zaawansowanego stadium – 12–63% (low grade squamous intraepithelial lesions – LSIL). 31–100% komórek nowotworowych oraz 0–11% komórek prawidłowych ujawniło zwiększoną aktywność tej transkryptazy [17]. Badanie ekspresji telomerazy jest jednak niewystarczająco swoistym i czułym markerem wczesnej detekcji neoplazji szyjki macicy [32].

Brn-3a

Kolejnym badanym markerem karcynogenezy jest Brn-3a będący komórkowym czynnikiem transkrypcyjnym rodziny POU (Pit-Oct-Unc family). W badaniach cytologicznych ekspresja białka Brn-3a rosła wraz ze stopniem zaawansowania neoplazji szyjki macicy, co pozwala na rozważenie jego roli jako potencjalnego markera w badaniach przesiewowych [36]. Użycie tego białka jako markera wymaga jednak dalszych badań.

Gen supresorowy FHIT

Badanie genomu ludzkiego w regionach wrażliwych na delecję doprowadziło do odkrycia wielu genów istotnych

dla inicjacji i rozwoju procesu nowotworzenia. W miejscu łamliwym chromosomu 3 (3p14.2) zidentyfikowano ludzki gen supresorowy *FHIT* (fragile histidine triad). Inaktywacja tego genu i związany z tym brak lub obniżony poziom ekspresji białka Fhit, jest obserwowany w większości ludzkich nowotworów (w guzach szyi, płuc, piersi, przełyku, żołądka, jelita grubego, nerek, jajnika, macicy, chłoniaku) oraz w wielu stanach przedrakowych. Sądzi się, iż działanie przeciwnowotworowe tego białka polega na indukcji apoptozy. Badania nad nieprawidłowościami w genie *FHIT* w raku szyjki macicy wykazały, iż nie jest on dobrym kandydatem na markera wczesnej diagnostyki raka szyjki macicy ze względu na niską czułość i swoistość [5,25,49].

Hiper- lub hipometylacja DNA

Potencjalna rola zaburzeń metylacji DNA w karcynogenezie jako swoistego biomarkera nowotworowego została zbadana [29,43]. Poziom metylacji przebadano jednak tylko dla kilku genów w raku szyjki macicy. P16 i E6-kahedryny, które wykazały hipermetylację [7], natomiast regiony LCR i E6 dla HPV 16 – hipometylację w zależności od stadium zaawansowania od 78% przypadków z CIN, do 94% przypadków z rakiem szyjki macicy [3].

PODSUMOWANIE

Wysoka śmiertelność wśród kobiet, spowodowana występowaniem raka szyjki macicy, jest przyczyną poszukiwania nowych bardziej czułych i swoistych metod diagnostycznych umożliwiających wcześniejsze wykrycie zmiany nowotworowej oraz bardziej efektywne monitorowanie pacjentek w trakcie leczenia. Nowym polem badań budzącym nadzieje na przyszłość jest biologia molekularna i molekularne markery karcynogenezy, które pozwalają na rozszerzenie działań diagnostycznych poza wcześniejsze i uznane powszechnie klasyczne markery nowotworowe raka szyjki macicy (SCC-Ag, TPA), oraz niektóre z cytokin, których przydatność została już wstępnie potwierdzona pozostaje jednak w fazie dalszych badań (VEGF, EGF, G-CSF, M-CSF, SCF). Mutacje DNA będące jedną z przyczyn zainicjowania procesu nowotworowego prowadzą do powstawania zaburzeń i nieprawidłowości w cyklu komórkowym. Zidentyfikowano około 150 genów związanych z karcynogenezą. Wyniki, zamieszczone w tej pracy badań, wskazują na możliwość wykorzystania niektórych z nich w poszczególnych etapach procesu diagnostycznego raka szyjki macicy: telomerazy i białka Brn-3a w badaniach przesiewowych (korelacja ze stopniem zaawansowania nowotworu), białka P53 w monitorowaniu leczenia pacjentek, białek z rodziny Bcl-2 jako czynników prognostycznych przeżywalności pacjentek z tym nowotworem. Wykorzystanie molekularnych markerów karcynogenezy w diagnostyce nowotworowej niesie ze sobą duże nadzieje, wymaga to jednak pogłębienia badań w tym kierunku.

PIŚMIENICTWO

[1] Aderka D., Engelmann H., Hornik V., Skornick Y., Levo Y., Wallach D., Kushtai G.: Increased serum levels of soluble receptors for tumor necrosis factor in cancer patients. *Cancer Res.*, 1991; 51: 5602–5607

[2] Bachtary B., Selzer E., Knocke T.H., Potter R., Obermair A.: Serum VEGF levels in patients undergoing primary radiotherapy for cervical cancer: impact on progression-free survival. *Cancer Lett.*, 2002; 179: 197–203

- [3] Badal V., Chuang L.S., Tan E.H., Badal S., Willa L.L., Wheeler C.M., Li B.F., Bernard H. U.: CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *J. Virol.*, 2003; 77: 6227–6234
- [4] Brake T., Connor J.P., Petereit D.G., Lambert P.F.: Comparative analysis of cervical cancer in women and in a human papillomavirus-transgenic mouse model: identification of minichromosome maintenance protein 7 as an informative biomarker for human cervical cancer. *Cancer Res.*, 2003; 63: 8173–8180
- [5] Butler D., Collins C., Mabruk M., Leader M.B., Kay E.W.: Loss of Fith expression as a potential marker of malignant progression in preinvasive squamous cervical cancer. *Gynecol. Oncol.*, 2002; 86: 144–149
- [6] Chan Y.M., Ng T.Y., Ngan H.Y., Wong L.C.: Monitoring of serum squamous cell carcinoma antigen levels in invasive cervical cancer: is it cost-effective? *Gynecol. Oncol.*, 2002; 84: 7–11
- [7] Chen C.L., Liu S.S., Ip S.M., Wong L.C., Ng T.Y., Ngan H.Y.: E-cadherin expression is silenced by DNA methylation in cervical cancer cell lines and tumours. *Eur. J. Cancer.*, 2003; 39: 517–523
- [8] Chung T.K., Cheung T.H., Lo W.K., Yim S.F., Yu M.Y., Krajewski S., Reed J.C., Wong Y.F.: Expression of apoptotic regulators and their significance in cervical cancer. *Cancer Lett.*, 2002; 180: 63–68
- [9] Crook T., Wrede D., Voudsen K.H.: p53 point mutation in HPV negative human cervical carcinoma cell line. *Oncogene*, 1991; 6: 873–875
- [10] El Deiry W.S., Harper J.W., O'Connor P.M., Velculescu V.E., Camman C.E., Jackman J., Pietenpol J.A., Burrell M., Hill D.E., Wang Y., Wiman K.G., Mercer W.E., Kastan M.B., Kohn K.W., Elledge S.J., Kinzler K.W., Vogelstein B.: WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.*, 1994; 54: 1169–1174
- [11] Freeman A., Morris L.S., Mills A.D., Stoerber K., Laskey R.A., Williams G.H., Coleman M.: Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin. Cancer Res.*, 1999; 5: 2121–2132
- [12] Funk J.O., Waga S., Harry J.B., Espling E., Stillman B., Galloway D.A.: Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes. Dev.*, 1997; 11: 2090–2100
- [13] Hashimoto I., Kodama J., Seki N., Hongo A., Yoschinouchi M., Okuda H., Kudo T.: Vascular endothelial growth factor-C expression and its relationship to pelvic lymph node status in invasive cervical cancer. *Br. J. Cancer*, 2001; 85: 93–97
- [14] Hausen H.: Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2: 342–350
- [15] Herrington C.S.: Do HPV-negative cervical carcinoma exist? – Revisited. *J. Pathol.*, 1999; 189: 1–3
- [16] Horn L.H., Fischer U., Hänel C., Kuhn H., Raptis G., Bilek K.: p53 in surgically treated and pathologically staged cervical cancer: Correlation with local tumor progression, but not with lymphatic spread. *Pathol. Res. Pract.*, 2001; 197: 605–609
- [17] Jarboe E.A., Liaw K.L., Thompson L.C., Heinz D.E., Baker P.L., McGregor J.A., Dunn T., Woods J.E., Shroyer K.R.: Analysis of telomerase as a diagnostic biomarker of cervical dysplasia and carcinoma. *Oncogene*, 2002; 21: 664–673
- [18] Jemal A., Thomas A., Murray T., Thun M.: Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.*, 2002; 52: 23–47
- [19] Juang C.M., Wang P.H., Yen M.S., Lai C.R., Ng H.T., Yuan C.C.: Application of tumor markers CEA, TPA, and SCC-Ag in patients with low-risk FIGO stage IB and IIA squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol. Oncol.*, 2000; 76: 103–106
- [20] Keesee S.K., Domanik R., Patterson B.: Fully automated proteomic detection of cervical dysplasia. *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, 2002; 24: 137–146
- [21] Kozakiewicz B.: Nowotwory złośliwe narządu rodnego. *Nowa Medycyna*, 2003; 122: 111–127
- [22] Kyo S., Kanaya T., Takakura M., Inoue M.: A case of cervical cancer with aggressive tumor growth: possible autocrine growth stimulation by G-CSF and IL-6. *Gynecol. Oncol.*, 2000; 78: 383–387
- [23] Lee C. M., Lee R.J., Hammond E., Tsodikov A., Dodson M., Zempolich K., Gaffney D.K.: Expression of HER2neu (c-erbB-2) and epidermal growth factor receptor in cervical cancer: prognostic correlation with clinical characteristics, and comparison of manual and automated imaging analysis. *Gynecol. Oncol.*, 2004; 93: 209–214
- [24] Lindblom A., Liljegren A.: Tumour markers in malignancies. *Br. Med. J.*, 2000; 320: 424–427
- [25] Liu F.S., Hsieh Y.T., Chen J.T., Ho E.S., Hung M.J., Lin A.J.: FHIT (fragile histidine triad) gene analysis in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol. Oncol.*, 2001; 82: 283–290
- [26] Ławicki S., Bękowska E., Gacuta-Szumarska E., Knapp P., Szmikowski M.: Ocena stężenia i przydatności diagnostycznej czynnika wzrostu komórek pnia (SCF) oraz czynnika stymulującego kolonie makrofagowe (M-CSF) w osoczu chorych na raka szyjki macicy. *Pol. Merk. Lek.*, 2008; 145: 38–42
- [27] Nasu K., Inoue C., Takai N., Kashima K., Miyakawa I.: Squamous cell carcinoma of the cervix producing granulocyte colony-stimulating factor. *Obstet. Gynecol.*, 2004; 104: 1086–1088
- [28] Oh M.J., Choi J.H., Lee Y.H., Lee J.K., Hur J.Y., Park Y.K., Lee K.W., Chough S.Y., Saw H.S.: Mutant p53 protein in the serum of patients with cervical carcinoma: correlation with the level of serum epidermal growth factor receptor and prognostic significance. *Cancer Lett.*, 2004; 203: 107–112
- [29] Patel A., Groopman J.D., Umar A.: DNA methylation as a cancer-specific biomarker: from molecules to populations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2003; 983: 286–297
- [30] Prives C., Hall P.A.: The p53 pathway. *J. Pathol.*, 1999; 187: 112–126
- [31] Reed J. C.: Mechanism of apoptosis. *Am. J. Pathol.*, 2000; 157: 1415–1430
- [32] Reesink-Peters N., Helder M.N., Wisman G.B., Knol A.J., Koopmans S., Boezen H.M., Schuurung E., Hollema H., de Vires E.G., de Jong S., van der Zee A.G.: Detection of telomerase, its components, and human papillomavirus in cervical scrapings as a tool for triage in women with cervical dysplasia. *J. Clin. Pathol.*, 2003; 56: 31–35
- [33] Rocco J.W., Sidransky D.: p16 (MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp. Cell Res.*, 2001; 264: 42–55
- [34] Rudlowski C., Becker A. J., Schroder W., Rath W., Buttner R., Moser M.: GLUT1 messenger RNA and protein induction relates to the malignant transformation of cervical cancer. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2003; 120: 691–698
- [35] Sgambato A., Cittadini A., Faraglia B., Weinstein I.B.: Multiple functions of p27 (Kip1) and its alterations in tumor cells: a review. *J. Cell Physiol.*, 2000; 183: 18–27
- [36] Sindos M., Ndisang D., Pisal N., Chow C., Singer A., Latchman D.S.: Measurement of Brn-3a levels in Pap smears provides a novel diagnostic marker for the detection cervical neoplasia. *Gynecol. Oncol.*, 2003; 90: 366–371
- [37] Strauss H.G., Laban C., Lautenschlager C., Buchmann J., Schneider I., Koelbl H.: SCC antigen in the serum as an independent prognostic factor in operable squamous cell carcinoma of the cervix. *Eur. J. Cancer*, 2002; 38: 1987–1991
- [38] Suzuki Y., Nakano T., Ohno T., Abe A., Morita S., Tsujii H.: Serum CYFRA 21-1 in cervical cancer patients treated with radiation therapy. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2000; 126: 332–336
- [39] Szymendera J.J., Góźdz S.S.: Rola krążących markerów nowotworowych w diagnostyce i monitorowaniu leczenia chorych na nowotwory. *Nowotwory*, 1995; 45: 369–389
- [40] Takeshima N., Hirai Y., Katase Y., Yano K., Yamauchi K., Hasumi K.: The value of squamous cell carcinoma antigen as a predictor of nodal metastasis in cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 1998; 68: 263–266
- [41] Tjamla W.A., Weyler J.J., Bogers J.J., Pollefliet C., Baay M., Goovaerts G.C., Vermorken J.B., van Dam P.A., Marck E.A., Buytaert P.M.: The importance of biological factors (bcl-2, bax, p53, PCNA, MI, HPV and angiogenesis) in invasive cervical cancer. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Rep. Biol.*, 2001; 97: 223–230
- [42] Van de Putte G., Holm R., Lie K., Trope C.G., Kristensen G.B.: Expression of p27, p21, and p16 protein in early squamous cervical cancer and its relation to prognosis. *Gynecol. Oncol.*, 2003; 89: 140–147
- [43] Verma M.: Viral genes and methylation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2003; 983: 170–180
- [44] Vieira S.C., Silva B.B., Pinto G.A., Vassallo J., Moraes N.G., Santana J.O., Santos L.G., Carvasan G.A., Zeferino L.C.: CD34 as a marker for evaluating angiogenesis in cervical cancer. *Pathol. Res. Pract.*, 2005; 201: 313–318
- [45] Waggoner S.E.: Cervical cancer. *Lancet*, 2003; 361: 2217–2225
- [46] Watanabe A., Wachi T., Omi H., Nishii H., Ochiai K., Tanaka T., Endo Y.: Granulocyte colony-stimulating factor-producing small-cell carcinoma of the uterine cervix: report of a case. *Diagn. Cytopathol.*, 2000; 23: 269–274
- [47] Whicher T., Banks R.E.: Cytokines as a tumour markers. *Scand. J. Lab. Invest. Suppl.*, 1995; 221: 122–144



- [48] Williams G.H., Romanowski P., Morris L., Madine M., Mills A.D., Stoeber K., Marr J., Laskey R.A., Coleman N.: Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 14932–14937
- [49] Yoshino K., Enomoto T., Nakamura T., Sun H., Ozaki K., Nakashima R., Wada H., Saitoh J., Watanabe Y., Noda K., Murata Y.: FHIT alterations in cancerous and non-cancerous cervical epithelium. *Int. J. Cancer*, 2000; 85: 6–13
- [50] Zatoński W.A., Didkowska I.: *Epidemiologia nowotworów złośliwych*. W: *Onkologia kliniczna*, t. I. (Krzakowski M.), Wyd. Med. Borgis, Warszawa, 2001, 22–50
- [51] Zehbe I., Ratsch A., Alunni-Fabbroni M., Burzlaff A., Bakos E., Durst M., Wilander E., Tommasino M.: Overriding of cyclin-dependent kinase inhibitors by high and low risk human papillomavirus types: evidence for an *in vivo* role in cervical lesions. *Oncogene*, 1999; 18: 2201–2211
- [52] Zieliński J.: Rak szyjki macicy. *Nowa Medycyna*, 2001; 113: 24–28

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.