

Lana Vodnik¹

Rak jajčnikov: rezistenca na zdravljenje

Ovarian Cancer: Resistance to Treatment

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: rak jajčnikov, zdravljenje, rezistenca, mikrookolje, epitelijska celična adhezijska molekula

Rak jajčnikov je kljub napredku operativnih tehnik in kemoterapije, vodilni z ginekološkimi raki povezan vzrok smrti. Poleg poznega odkrivanja bolezni je glavni razlog za slabo prognozo kemorezistenca na platinove spojine, ki so zdravilo prvega izbora. V prispevku opisujemo mehanizme nastanka rezistence in vlogo mikrookolja ter epitelijske celične adhezijske molekule. Slednja bi lahko bila možen označevalec, ki bi napovedal pojav rezistence na karboplatin.

ABSTRACT

KEY WORDS: ovarian cancer, treatment, resistance, microenvironment, epithelial cell adhesion molecule

Despite advances in surgical techniques and chemotherapy, ovarian cancer is still a leading cause of death among gynecological cancers. In addition to the late detection of the disease, the main reason for poor prognosis is resistance to platinum compounds. In this paper, we describe the mechanisms behind the resistance, and the role of microenvironment and the epithelial cell adhesion molecule. The latter could be a potential marker for the occurrence of carboplatin resistance.

¹ Lana Vodnik, dr. med., Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana; vodniklana@gmail.com

UVOD

Rak jajčnikov je maligna novotvorba enega ali obeh jajčnikov. Spada med pogostejše ginekološke malignosti in ima med njimi najvišjo umrljivost. V svetu je bilo leta 2018 na novo diagnosticiranih 295.414 primerov raka jajčnikov, umrlo je 184.799 bolnic (1). V povprečju se petletno preživetje giba med 30–40 % (2). Slaba prognoza je posledica asimptomatičnosti oz. poznega pojava simptomov in pomanjkanja učinkovite presejalne metode. Posledično se diagnoza postavi v napreduvalih fazah, ko je zdravljenje manj učinkovito (3). Razširjenost bolezni se ocenjuje s pomočjo klasifikacije FIGO (Federation Internationale de Gynecologie Obstetrique), po kateri se ga uvrsti v enega od štirih stadijev (I–IV), pri čemer višji stadiji pomenijo bolj razširjeno bolezen in posledično slabšo prognozo (4).

HISTOLOŠKA RAZDELITEV

Rak jajčnikov lahko nastane iz katerekoli vrste celic, ki sestavljajo jajčnik. Poznamo epitelijski, germinalni in stromalni tip. Epitelijski tip je najpogostejši in predstavlja kar 90 % malignih tumorjev jajčnikov. Glede na histopatološko sliko epitelijski tip delimo na podtipa, ki jih uvrščamo v dve skupini. V prvi skupini so endometrioidni karcinom, svetlocelični karcinom, mucinozni karcinom in serozni karcinom nizkega gradusa (angl. *low-grade serous carcinoma*, LGSC). V drugo skupino uvrščamo serozni karcinom visokega gradusa (angl. *high-grade serous carcinoma*, HGSC), ki je najpogostejši podtip (75 %) epitelijskega raka jajčnikov (5). Določitev podtipa je pomembna, saj med njimi obstajajo razlike v izvoru, dejavnih tveganja, načinu širjenja, zdravljenju ter odzivu na zdravljenje (6).

Podtipi iz prve skupine imajo običajno klinično indolenten potek in so genetsko stabilnejši. Pogosto jih opredeljujejo mutacije regulatornih genov MAPK (angl. *mitogen activated protein kinase*) poti kot sta *BRAF* (angl. *v-Raf murine sarcoma viral oncogene*

homolog B) in *KRAS* (angl. *kirsten rat sarcoma*), genov β -katenina, *CDKN2A* (angl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) in *PIK3CA* (angl. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic, alpha*). Mutacije tumor supresorskega gena *TP53* (tumorski protein 53) so redke, z izjemo mukoznega podtipa. Za svetlocelični karcinom je značilna mutacija in s tem inaktivacija *ARID1A* (angl. *AT-rich interaction domain 1A*) tumor supresorskega gena. Pri mukoznem in svetloceličnem karcinomu se pogosteje pojavi tudi podvojevanje gena *ERBB2*, ki kodira *HER2* (angl. *human epidermal growth factor receptor 2*) (7).

HGSC iz druge skupine ima klinično agresivnejši potek in je genetsko manj stabilen. Običajno ga diagnosticiramo šele v napreduvalih fazah in ima slabo prognozo. Značilne so mutacije *TP53*, ki so prisotne v 96 %. Pogoste so tudi napake homolognih rekombinantnih DNA popraviljalnih mehanizmov (50 %) (8). Ponavljajoče se mutacije drugih genov so redke, z izjemo mutacije genov *BRCA* (angl. *breast cancer*) genov 1 in 2, ki se kažejo predvsem kot HGSC (5). Pogostejše so tudi amplifikacije genov *CCNE1* (angl. *cyclin E1*), *MYC* (angl. *myelocytomatosis oncogene*) in *TPX2* (angl. *targeting protein X2*) (7).

Tumorska heterogenost

Rak jajčnikov je klinično, histološko in molekularno zelo raznolika bolezen. Vse več raziskav kaže, da obstajajo tako razlike med posameznimi tipi in podtipi raka jajčnikov kot tudi znotraj teh. Pri posamezni bolnici z rakom jajčnika je namreč prisotna tumorska heterogenost, ki je lahko prostorska (angl. *spatial*) ali časovna (angl. *temporal*). Prostorska heterogenost vključuje intertumorsko heterogenost, zaradi razlik med tumorjem na primarnem mestu in njegovimi zasevki, in intratumorsko heterogenost, ki je najverjetneje posledica razvoja subklonalnega tumorja. Časovna heterogenost pa opisuje raznolikosti, ki se pojavijo s časom,

ob napredovanju tumorja (primarna bolezen – ponovitev) (7). Z uporabo sekvenciranja naslednje generacije so ugotovili, da so intratumorske razlike prisotne že pred zdravljenjem in niso omejene samo na tumorje visokih stadijev. Večina značilnosti ponovitve tumorja oz. metastaz je prisotnih kot subklonska populacija že znotraj primarnega tumorja (9).

ŠIRJENJE RAKA JAJČNIKOV

V načinu razsoja se rak jajčnikov razlikuje od večine drugih rakavih obolenj, saj se redko širi hematogeno. V osnovi gre za pasivni mehanizem, rakave celice oz. njihovi skupki se odcepijo od površine primarnega tumorja in zaradi fiziološkega premikanja peritonealne tekočine, metastazirajo po peritoneju in omentumu (t. i. transcelomsko širjenje) (10). Pri tem se rakave celice preobrazijo iz epitelijske v mezenhimsko obliko (angl. *epithelial to mesenchymal transition*, EMT), kar jim omogoči odlepljanje od sestrskih celic in pripenjanje na bazalno membrano ter vrašcanje (11). Patološko kopičenje peritonealne tekočine oz. nastanek ascitesa olajša širjenje rakavim celicam. Vzrok za nastanek ascitesa je ne-uravnoteženost med nastajanjem in reabsorpcijo peritonealne tekočine. Rakave celice naj bi preprečevale reabsorpcijo tekočine prek subperitonealnih limfatičnih kanalov. V zgodnjih fazah gre za neobstruktivne mehanizme zapore, tj. konstrikcijo limfnih žil prek sekretornih produktov rakavih celic, kasneje pa tudi za samo obstrukcijo limfnih vodov (12). Poleg tega rakave celice izločajo številne dejavnike, ki vplivajo na povečano nastajanje peritonealne tekočine. Med njimi je najbolj raziskan vpliv žilnega endotelijskega rastnega dejavnika (angl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), ki poveča žilno prepustnost in s tem tvorbo ascitesa (10, 12).

ZDRAVLJENJE

Zdravljenje raka jajčnikov je sestavljeno iz kirurške odstranitve tumorja in sistemske-

ga zdravljenja s kemoterapevtiki. Osnovo kemoterapije že od sredine 70. let prejšnjega stoletja predstavljajo platinove spojine. Sprva je bil to cisplatin, ki pa je bil povezan s številnimi stranskimi učinki kot so nefrotoksičnost, nevrotoksičnost, gastrointestinalna toksičnost, ototoksičnost in mielosupresija. Zato so kmalu začeli z razvojem druge generacije platinovih spojin in leta 1989 je na trg prišel karboplatin, ki je enako učinkovit kot cisplatin, a ima manj stranskih učinkov (13).

Po smernicah operativnemu citoreduktivnemu posegu sledi pooperativna (adjuvantna) kemoterapija s paklitakselom (175 mg/m^2 , triurna infuzija) in karboplatinom (površina pod krivuljo (angl. *area under the curve*, AUC) je 5–7). Običajno bolnice prejmejo zdravljenje po shemi od šest do osem ciklusov z aplikacijo ciklusa na 21 dni (14). V nekaterih primerih se zdravljenje začne s predoperativno (neoadjuvantno) kemoterapijo, ki ji sledi kirurško zdravljenje. Ta način pride v poštev pri bolnicah z napredovalim rakom jajčnika (stadij III–IV), pri katerih kirurg presodi, da radikalna odstranitev ni možna, ali v primeru, da bolnica zaradi spremljajočih bolezni ni sposobna za kirurško zdravljenje (15). Pri tem se prav tako uporabi enaka kombinacija zdravil v treh do šestih ciklih, nato sledi intervalna operacija z maksimalno citoredukcijo in tremi do štirimi cikli pooperativnega sistemskega zdravljenja (14).

Ob kontraindiciranem paklitakselu se lahko uporabi kombinacija pegiliranega liposomalnega doksorubicina (PLD) in karboplatina v petih do šestih ciklih na 28 dni (16). Pri napredovalih stadijih se doda še bevacizumab, ki je zaviralec VEGF. Razi-skave so pokazale, da dodatek bevacizumaba k standardni terapiji podaljša obdobje brez napredovanja bolezni za od dva do štiri mesece (17, 18). Pri bolnicah z mutacijo BRCA se je kot učinkovit izkazal zaviralec PARP (angl. *poly-ADP-ribose polymerase*) pod imenom olaparib (19).

PONOVITEV BOLEZNI

Kljub dobremu odgovoru na osnovno zdravljenje pride do ponovitve bolezni pri 70–80 % obolelih v dveh letih po zaključku zdravljenja. O ponovitvi govorimo, ko se bolezen ponovno pojavi po obdobju, v katerem ni bilo prisotnih znakov bolezni (t. i. popolna remisija). Strategija zdravljenja in prognoza ob ponovitvi bolezni je odvisna predvsem od časa, ki je minil od zaključka zdravljenja do ponovitve. Temelj zdravljenja ponovitve bolezni je sistemsko zdravljenje (20). V nekaterih primerih je smiselno tudi kirurško zdravljenje oz. sekundarna citoredukcija, ki pride v poštev, če je od primarne bolezni minilo več kot 12 mesecev, če se tumor oceni kot operabilen in če je bolničin splošni status dober (21). Če se rak jajčnikov ponovi po preteku več kot 12 mesecev od zaključka primarnega zdravljenja, govorimo o na platino občutljivi bolezni. Za zdravljenje se uporabi kombinacijo PLD in karboplatina. Ob ponovitvi v 6–12 mesecih po zaključku zdravljenja govorimo o bolezni delno občutljivi na platino, za zdravljenje se priporoča kombinacija PLD in trabectedina. S tem se podaljša obdobje brez karboplatina in poveča verjetnost dobrega odgovora nanj ob naslednji ponovitvi oz. napredovanju bolezni. Kadar se bolezen ponovi v manj kot šestih mesecih od primarnega zdravljenja, govorimo o bolezni, rezistentni na platino. Priporoča se zdravljenje s citostatiki v monoterapiji, brez karboplatina. Doda se bevacizumab, če ga bolnica še ni prejela v času primarnega sistemskega zdravljenja. Pričakovano preživetje je manj kot 12 mesecev in cilj zdravljenja je v takih primerih predvsem lajšanje simptomov. O refraktarni bolezni govorimo, ko se pojavi poslabšanje bolezni že med samim primarnim zdravljenjem oz. v manj kot enem mesecu od njegovega zaključka. Obravnava se jo kot bolezen, rezistentno na platino (22).

REZISTENCA NA ZDRAVLJENJE

Rezistenca na karboplatin je glavni razlog neuspešnega zdravljenja in slabe progno-

ze raka jajčnika. V času primarnega zdravljenja se pojavi pri 20–30 % bolnic (23). Preostanek bolnic na zdravljenje sicer dobro odgovori, a se pri 80 % teh bolezni ponovi v povprečnem obdobju 18 mesecev od zaključka zdravljenja. Ob ponovnem zdravljenju le 50 % bolnic, pri katerih se je bolezen ponovila po več kot 12 mesecih, odgovori na zdravljenje. Številka je še manjša (10–20 %) pri bolnicah, ki se jim bolezen ponovi v manj kot šestih mesecih od zaključka zdravljenja. Z vsako novo ponovitvijo bolezni je navadno čas do naslednje ponovitve krajši in s tem verjetnost rezistentne bolezni večja (24).

Problem pojava rezistence na platino je aktualen pri bolnicah, ki prejmejo neoadjuvantno terapijo s karboplatinom pred kirurškim posegom. Matsuo in sodelavci so v svoji raziskavi *in vitro* ugotavljali večjo pojavnost rezistence na karboplatin pri bolnicah, ki so prejele neoadjuvantno terapijo (33,3 %), v primerjavi z bolnicami, ki so primarno zdravljenje začele s citoreduktivno operacijo (9,2 %) (25). Rauh-Hain in sodelavci so v svoji raziskavi prav tako ugotovili pogostejši pojav rezistence na karboplatin ob ponovitvi bolezni pri bolnicah, ki so prejele neoadjuvantno terapijo (88,8 %), v primerjavi z bolnicami, ki so primarno zdravljenje začele s citoreduktivno operacijo (55,3 %) (26). Vendar so mnenja glede primernejšega načina začetnega zdravljenja deljena. Nekatere raziskave spodbijajo superiornost primarne citoreduktivne operacije nad neoadjuvantno kemoterapijo. Randomizirana raziskava CHORUS, ki je vključevala 550 bolnic, je primerjala rezultate obeh načinov zdravljenja. Standardno zdravljenje s primarno citoredukcijo in nato adjuvantno kemoterapijo s platino je prejelo 276 bolnic, 274 bolnic pa je najprej prejelo neoadjuvantno terapijo s platino, ki ji je sledila intervalna citoredukcija. Slednji način zdravljenja je bil povezan z obsežnejšo citoredukcijo, manjšo zgodnjo umrljivostjo in enakim preživetjem kot standardno zdravljenje (27).

Mehanizmi nastanka rezistence

V literaturi najpogosteje opisujejo dva tipa rezistence, katerih mehanizmi nastanka naj bi se razlikovali, a je točno ločevanje med njima težko. To sta intrinzični tip rezistence in pridobljeni (ekstrinzični) tip rezistence (28).

Pri intrinzični rezistenci so rakave celice že same po sebi rezistentne zaradi svojih obstoječih lastnosti, ki so bile prisotne že pred začetkom zdravljenja. Podskupino tumorskih celic, ki ima takšne rezistentne lastnosti, so poimenovali rakave zarodne celice (angl. *cancer stem cells*, CSC). Te naj bi bile sposobne samoobnove, vztrajnega vzdrževanja rasti tumorja in dolgotrajnega mirovanja. Med lastnosti intrinzično kemo-rezistentnih celic spadajo zmožnosti zmanjšane prevzema zdravila v celico, povečane izločanja tega iz celice in večja aktivnost encimov za razstrupljanje, kot so citokrom p450 ali glutathion transferaze (29).

Najbolj raziskani mehanizmi rezistence so ravno ti, ki vključujejo farmakokinetiko zdravila, tj. privzem, presnovo in izločanje. Holzer in sodelavci so v rezistentnih celičnih linijah raka jajčnikov *in vitro* dokazali zmanjšano izražanje transporterja CTR1 (angl. *copper transporter 1*), ki ima vlogo pri vstopu platine v celico, ob izpostavljanju kultur platini (30). Samimi in sodelavci so v svoji raziskavi ugotovili, da so imele bolnice z rakom jajčnikov z večjim izražanjem transporterja ATP7A za izstop platine iz celice, slabši izid zdravljenja (31). Godwin in sodelavci pa so v svoji raziskavi ugotovili, da rezistentne celice izražajo 13–50-krat večjo količino glutathiona, ki inaktivira znotrajcelične toksine, v primerjavi z občutljivimi celicami istega izvora (32).

Drugi tip je pridobljena rezistenca, v sklopu katere naj bi rakave celice rezistenco pridobile postopoma skozi obdobje zdravljenja z nastankom genetskih sprememb in epigenetskih sprememb ključnih genov, ki jim omogočijo prilagoditev na učinke kemoterapevtikov. Gre za mikroevolucijo, pri kateri

celica s pridobljeno spremembo dobi prednost pred ostalimi, preživi in je zato klonsko izbrana za razmnoževanje. Med genetskimi spremembami so mutacije, delecije, amplifikacije, translokacije idr. Pri njihovem nastanku imajo lahko vlogo tudi kemoterapevtiki sami (tudi karboplatin), saj je njihov mehanizem citotoksičnosti povezan ravno z delovanjem na DNA. Pomembne so tudi epigenetske spremembe, kot so metilacija DNA, histonska modifikacija ali regulacija mikroRNA (miRNA), ki imajo vlogo v izražanju genov, ključnih za razvoj rezistence (28, 29).

Vloga mikrookolja

Tumor pa ni samo klonska ekspanzija mutantskih celic, nanj je treba gledati kot na organu podobno strukturo, ki z okoljem, v katerem živi, tudi komunicira. Verjetno je, da tumorska heterogenost, napredovanje bolezni in nastanek rezistence na zdravljenje niso samo posledica (znotraj)celičnih lastnosti tumorja, ampak tudi zunajceličnega okolja oz. mikrookolja (33). Tega sestavljajo levkociti, endotelijske celice in stromalni miofibroblasti. Slednji proizvajajo angiogene dejavnike, proteaze, rastne dejavnike, imunomodilirajoče beljakovine, antiapoptotske beljakovine, signalne molekule ter zunajcelični matriks. Imenujejo jih tudi z rakom povezani fibroblasti (angl. *cancer associated fibroblasts*, CAF), saj se odzivajo na dražljaje rakavih celic ter z dvo-smerno komunikacijo omogočajo lažjo invazijo slednjih. Tumorsko napredovanje je povezano z moteno arhitekturo in organizacijo okolnih tkiv, tumor nadvlada homeostatske procese in okolje priredi svojim potrebam ter si na ta način zagotovi preživetje (34).

Eden od načinov komunikacije tako normalnih kot rakavih celic med seboj in z okolico so zunajcelični vezikli (ZV). Gre za heterogeno skupino z membrano obdanih struktur, ki se sproščajo iz celic in lahko prenašajo proteine, lipide in nukleinske

kisline (DNA, mRNA (angl. *messenger ribonucleic acid*), miRNA (angl. *micro ribonucleic acid*)). Izolirali so jih iz veliko različnih telesnih tekočin kot so plazma, ascites, možgansko-hrbtenjačna tekočina, urin, amnijska tekočina idr. Med ZV spadajo eksosomi, velikosti 30–100 nm, in mikrovezikli, velikosti 100–1.000 nm. Rakave celice izločajo tudi onkosome, ki so velikosti 1–10 µm (35). Mikrovezikli se tvorijo in sprostijo z brstenjem iz celične membrane navzven v okolico. Eksosomi pa so sprva multivezikularna telesa oz. endosomi (znotrajcelični vezikli), ki lahko potujejo prek membrane navzven in postanejo eksosomi. Tvorba in sproščanje ZV je pod vplivom številnih endo- in eksogenih dejavnikov, ki lahko spremenijo tako število kot tip in vsebino vezikla. Vsi ZV imajo na zunanji površini molekule, ki jim omogočijo prepoznavo tarčne celice. Ob tem lahko ZV sproži signalizacijo preko povezave receptor–ligand ali pa se prične endocitoza oz. fagocitoza ZV, lahko pride tudi do njegovega zlitja z membrano celice ter neposredne sprostitve njegove vsebine v notranjost celice (36).

Pri rakavih celicah se spremeni količina sproščenih ZV, njihova velikost in tudi vrsta molekul, ki jih prenašajo. S prenašanjem bioaktivnih snovi vplivajo na mikrookolje tumorja ter pomagajo pri njegovem širjenju in nastanku kemorezistence. V povezavi s slednjo opisujejo tri mehanizme (37). Eden izmed njih je povečano izločanje zdravil iz celic s pomočjo ZV, kar so pokazali Safaei in sodelavci. V svoji raziskavi so, ko so primerjali koncentracijo platine v ZV rezistentne linije z ZV občutljive linije, ugotovili, da so ZV prve vsebovali 2,6-krat višjo koncentracijo platine. ZV rezistentne linije so imeli tudi večje količine transporterjev za prenos platine kot ZV občutljive linije (38). Kot mehanizem rezistence na zdravljenje se omenja tudi prenos miRNA z ZV. Predpostavljajo, da imajo ZV funkcijo izmenjevalca genetskih vektorjev v tumorskem okolju. miRNA je namreč

majhna nekodirajoča RNA molekula, ki se veže na mRNA in ima funkcijo posttranskripcijske genske modifikacije. Pink in sodelavci so v svoji raziskavi primerjali izraženost številnih miRNA in prepoznali miR-21-3p kot možen vzrok za pojav rezistence. Pokazali so tudi možnost prenosa rezistence iz rezistentne na občutljivo linijo preko ZV prve (39). Zanimiv je tudi mehanizem rezistence na zdravljenje prek nevtralizacije zdravil, ki temeljijo na protitelesih (imunoterapija). Tumor namreč tudi na ZV sprošča beljakovine, ki so tarča zdravil. Ti se vežejo na zdravilo, preden se to uspe vezati na rakave celice, in ga s tem nevtralizirajo (37).

Epitelijska celična adhezijska molekula kot označevalec pojava kemorezistence

Epitelijska celična adhezijska molekula (EpCAM) ali CD36 (angl. *cluster of differentiation 36*) je transmembranski glikoprotein, sestavljen iz 314 aminokislin, od tega je najobsežnejši zunajcelični del z 242 aminokisljinami. Kodirajoči gen leži na kromosomu 2 (2p21). Prvič je bila kot tumorski označevalec predstavljena leta 1979 zaradi visokega izražanja na karcinomih epitelijskega izvora. Poznane so še druge celične adhezijske molekule (CAM, molekule, ki jih delimo v štiri skupine: kadherini, selektini, integrini in CAM–imunoglobulini). Kljub podobnosti v imenu si EpCAM z njimi ne deli strukturnih značilnosti in ga zato ne moremo uvrstiti mednje (38). EpCAM izražajo epitelijske celice z izjemo skvamoznega epitelijskega, epidermalnih keratocitov, mioepitelijskih celic, parietalnih celic želodca, kortikalnega epitelijskega priželjca in hepatocitov. Sprva so mu pripisovali vlogo medcelične adhezije, sedaj pa je znano, da je njegova vloga obsežnejša, saj sodeluje tudi v celični signalizaciji, celičnem ciklu, proliferaciji, diferenciaciji, migraciji, invaziji in morfogenezi (39).

EpCAM izražajo tako zdrave kot tudi rakave celice epitelijskega izvora, a obsta-

jajo med njimi razlike – tako v njegovi izraženosti kot tudi v funkciji. V zdravem tkivu se EpCAM izraža na bazalni oz. bazolateralni membrani, rakave celice pa ga izražajo na različnih mestih (na membrani, v citoplazmi in luminalno), odvisno od njihovega tipa. Kljub njegovi adhezijski vlogi v zdravih tkivih raziskave kažejo, da ima v rakavem tkivu ravno nasprotno vlogo in sicer naj bi omogočil prekinitve medcelične adhezije ter s tem celično migracijo ter metastaziranje. Po drugi strani pa se pri EMT rakavih celic izražanje EpCAM zmanjša (38). Med različnimi epitelijskimi karcinomi povečano izražanje ne pomeni enake prognoze. Pri nekaterih rakavih obolenjih so se namreč povišane vrednosti EpCAM izkazale kot prognostično dober znak (npr. svetlocelični karcinom ledvic), medtem ko so pri drugih imele povišane vrednosti negativno napoved (npr. rak sečnega mehurja). Pri nekaterih karcinomih (npr. rak dojke) pa daje izražanje EpCAM različne napovedi. Predvideva se, da je za uporabo izražanja EpCAM kot napovednega dejavnika nujno ločevanje tudi med podtipi epitelijskega raka (40).

Rak jajčnikov je v 90 % epitelijskega tipa, zato je tudi zanj značilno izražanje EpCAM. Povečano izražanje EpCAM je povezano z diferenciacijo in celično proliferacijo. V *in vitro* pogojih je bilo povečano izražanje neposredno povezano s stimulacijo celičnega cikla in proliferacijo prek vpliva na izražanje protoonkogenega c-myc in ciklina A/E (41). Zaradi slednjega je pričakovan vpliv povečanega izražanja EpCAM na potek oz. prognozo epitelijskega raka. Predpostavlja se, da je vrednost izražanja EpCAM povezana z invazivnostjo raka in preživetjem bolnic. Spizzo in sodelavci so določili izraženost EpCAM na 199 vzorcih raka jajčnikov bolnic s stadijem III in IV ter ugotovili povezanost povečanega izražanja s krajšim preživetjem. Opazili so tudi povezanost višjega gradusa tumorja s povečano izraženostjo EpCAM (42). Povečano izražanje

EpCAM v primerjavi z benignim tkivom raka jajčnikov so potrdili tudi Bellone in sodelavci z analizo 168 vzorcev biopsij raka jajčnikov. Ugotavljali so večje izražanje EpCAM pri ponovitvah/metastatskih tumorjih v primerjavi s primarnimi in visoko izražanje EpCAM pri vseh kemorezistentnih vzorcih (43).

Tayama in sodelavci so s pretočnim citometrom preverili izražanje EpCAM na celični membrani različnih linij in dveh izmed njih sta pokazali prisotnost dve subpopulaciji – ene, ki je izražala EpCAM (EpCAM+), in druge, ki molekule ni izražala (EpCAM-). Želeli so videti ali ima obstoj subpopulacije EpCAM+ *in vitro* vlogo pri nastanku kemorezistence. Liniji so zato tretirali s cisplatinom in ugotovili, da je imel ta vpliv samo na viabilnost EpCAM-subpopulacije, ki se je vztrajno manjšala. Po tretiranju s cisplatinom se je izražanje EpCAM na membrani pri preostalih celicah še povečalo. V isti raziskavi so primerjali izraženost EpCAM na celični membrani pri bolnicah, ki so prejele kemoterapijo s platino in pri bolnicah, ki je niso, in ugotovili povišane vrednosti izraženosti pri prvih. Poleg tega so spremljali bolnice, ki so prejele kemoterapijo s platino, in ugotovili slabšo prognozo tistih s primarno višjo izraženostjo EpCAM. Petletno preživetje bolnic z višjo izraženostjo EpCAM je bilo 61,7 %, pri bolnicah z manjšo izraženostjo pa 84,4 % (44).

Zaradi svoje specifičnosti za epitelijsko vrsto celic je EpCAM primeren označevalec krožečih tumorskih celic (angl. *circulating tumor cells*, CTC) in omogoča njihovo prepoznavo med krvnimi celicami mezenhimskega izvora. V sklopu tekočinske biopsije bi lahko z izolacijo CTC prepoznali raka v zgodnjih stadijih, napovedali njegovo agresivnost in v realnem času spremljali potek bolezni. Žal raziskave kažejo, da so v krvi tudi CTC, ki ne izražajo EpCAM, kar je verjetno posledica EMT. Ravno te celice pa so ključne za razsoj raka (45).

Modeli za preučevanje rezistence

Rak jajčnikov je heterogena bolezen, večina epitelijskega izvora, s petimi podtipi, ki imajo med seboj ključne razlike, zaradi katerih bi jih bilo nujno obravnavati kot samostojne bolezni. Poznavanje njihovih značilnosti in prepoznavanje možnih označevalcev bi lahko vodilo k razvoju novih tarčnih zdravil. Za predklinične raziskave so zato nujni dobro definirani modeli celičnih linij za preučevanje, ki se skladajo z znanimi kliničnimi fenotipi. Od leta 1990 je bilo objavljenih okoli 100 člankov letno, ki so temeljili na komercialno pridobljenih celičnih linijah. Problem slednjih je, da sta v veliki meri njihov izvor in histologija slabo opredeljena, s tem pa je težko uvrstiti rezultate v določen histološko-molekularni podtip, ki bi bil resnično reprezentativen. Analize do sedaj najbolj uporabljenih celičnih linij za raziskovanje HGSC so pokazale, da te v resnici slabo povzemajo genetske lastnosti, značilne zanj (46). Beauford in sodelavci so temeljito analizirali 39 celičnih linij raka jajčnikov in s tem osvetlili njihovo ozadje. S tem so pripravili osnovo za izbiro modelov različnih histoloških in molekularnih tipov raka jajčnikov (47). V izboru celičnih linij je dodatno pomanjkanje tistih, ki bi služile kot dober model za preučevanje kemorezistence. Le za redke je namreč znano, da izvirajo iz bolnic s prisotno klinično rezistenco na karboplatin. Večina raziskav *in vitro* je narejena na linijah, katerih rezistenca je bila vzpostavljena z dolgotrajnim izpostavljanjem celične linije platinu, njihova podobnost z realno klinično sliko pa je vprašljiva. Dobri modeli za preučevanje kemorezistence bi bile številne linije odvzete isti bolnici tekom njene bolezni do nastanka kemorezistence, da bi bila možna identifikacija genetskih in molekularnih sprememb, ki so pripomogle k njenemu nastanku (48).

ZAKLJUČEK

Rak jajčnikov je najpogostejša maligna ginekološka bolezen s smrtnim izidom. V 90 % se pojavlja epitelijski tip, v sklopu tega pa HGSC-podtip, ki ima med vsemi najbolj agresiven potek. Posledično se raziskave osredotočajo predvsem nanj, a se je žal izkazalo, da celične linije, ki so jih do danes največ preučevali, niso reprezentativne zanj. Zaradi velike heterogenosti bolezni so za raziskovanje *in vitro* ključnega pomena dobro opredeljeni modeli, da so pridobljena spoznanja primerljiva in prenosljiva v klinično okolje.

Glavni razlog za slabo prognozo in neuspešno zdravljenje raka jajčnikov je pojav kemorezistence na karboplatin. Ta je zaradi manj stranskih učinkov ob enaki učinkovitosti zamenjal cisplatin. Kljub dobremu odgovoru na primarno zdravljenje se bolezen v 80 % primerov ponovi in je takrat v večini rezistentna na karboplatin. Pri načrtovanju zdravljenja obstajata dve možnosti, in sicer citoreduktivna operacija, ki ji sledi adjuvantna kemoterapija ali pa neoadjuvantna kemoterapija in šele nato kirurški poseg. V literaturi so mnenja glede primernejše izbire deljena in v veliko pomoč bi bilo poznavanje označevalcev, s katerimi bi lahko napovedali, ali bo pri bolnici prišlo do razvoja kemorezistence na karboplatin ali ne, tako pa bi se lažje odločali glede zdravljenja. Eden izmed možnih označevalcev je molekula EpCAM, katere izražanje je povišano pri epitelijskih karcinomih, tudi raku jajčnika.

Pri možnih mehanizmih razvoja kemorezistence ugotavljajo veliko vlogo mikrookolja tumorja ter ZV v njem. Z njimi rakave celice komunicirajo med seboj in z okolico. Pri rakavih bolnikih se raven, število in vsebina ZV spremeni, a so težavni za analizo predvsem zaradi svoje velikosti (30–1.000 nm) ter manj znanih oz. slabo standardiziranih metod za delo z njimi.

LITERATURA

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68 (6): 394–424.
2. Reid BM, Permuth JB, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med.* 2017; 14 (1): 9–32.
3. Momenimovahed Z, Tiznobaik A, Taheri S, et al. Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. *Int J Womens Health.* 2019; 11: 287–99.
4. Berek JS, Kehoe ST, Kumar L, et al. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynaecol Obstet.* 2018; 143 Suppl 2: 59–78.
5. Kroeger PT Jr, Drapkin R. Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2017; 29 (1): 26–34.
6. Prat J. Pathology of cancers of the female genital tract. *Int J Gynaecol Obstet.* 2015; 131 Suppl 2: S132–45.
7. Rojas V, Hirshfield KM, Ganesan S, et al. Molecular Characterization of Epithelial Ovarian Cancer: Implications for Diagnosis and Treatment. *Int J Mol Sci.* 2016; 17 (12): 2113.
8. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature.* 2011; 474 (7353): 609–15.
9. Paracchini L, Mannarino L, Craparotta I, et al. Regional and temporal heterogeneity of epithelial ovarian cancer tumor biopsies: implications for therapeutic strategies. *Oncotarget* [internet]. 2016 [citirano 2019 Jul 26]. Dosegljivo na: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10505>
10. Yeung TL, Leung CS, Yip KP, et al. Cellular and molecular processes in ovarian cancer metastasis. A Review in the Theme: Cell and Molecular Processes in Cancer Metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2015; 309 (7): C444–56.
11. Moffitt L, Karimnia N, Stephens A, et al. Therapeutic Targeting of Collective Invasion in Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019; 20 (6): 1466.
12. Černe K, Kobal B. Ascites in Advanced Ovarian Cancer. In: Devaja O, Papadopoulos AJ, eds. *Ovarian Cancer.* London: IntechOpen. 2017; p. 1–20.
13. McGuire III WP, Markman M. Primary ovarian cancer chemotherapy: current standards of care. *British Journal of Cancer.* 2003; 89 (Suppl 3): S3–8.
14. Zobec Logar HB, Smrkolj Š, Merlo S. Smernice za obravnavo bolnic z rakom jajčnikov, jajcevodov in s primarnim peritonealnim seroznim rakom. Ljubljana: Združenje za radioterapijo in onkologijo; 2016.
15. Kobal B, Cvjetičanin B. Kirurško zdravljenje epitelnega raka jajčnikov (ERJ), ocena resektabilnosti. *Rak jajčnikov: Zbornik predavanj.* Ljubljana: Šola o ginekološkem raku; 2015. p. 47–53.
16. Santaballa A, Barretina P, Casado A, et al. SEOM Clinical Guideline in ovarian cancer (2016). *Clin Transl Oncol.* 2016; 18 (12): 1206–12.
17. Oza AM, Cook AD, Pfisterer J, et al. Standard chemotherapy with or without bevacizumab for women with newly diagnosed ovarian cancer (ICON7): overall survival results of a phase 3 randomized trial. *Lancet Oncol.* 2015; 16 (8): 928–36.
18. Aghajanian C, Blank SV, Goff BA, et al. OCEANS: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. *J Clin Oncol.* 2012; 30 (17): 2039–45.
19. Pujade-Lauraine E, Ledermann JA, Selle F, et al. Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomized, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017; 18 (9): 1274–84.
20. Ozga M, Aghajanian C, Myers-Virtue S, et al. A systematic review of ovarian cancer and fear of recurrence. *Palliat Support Care.* 2015; 13 (6): 1771–80.
21. Hauspy J, Covens A. Cytoreductive surgery for recurrent ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2007; 19 (1): 15–21.
22. Škof E, Cerar O. Epitelijski rak jajčnikov, rak jajcevodov, primarni peritonealni serozni karcinom (PPSC) – Priporočila za sistemsko zdravljenje. *Onkologija.* 2015; 19 (1): 17–21.
23. Zhang XY, Zhang PY. Recent perspectives of epithelial ovarian carcinoma. *Oncol Lett.* 2016; 12 (5): 3055–8.
24. Liu MX, Chan DW, Ngan HYS. Mechanisms of chemoresistance in human ovarian cancer at a glance. *Gynecol Obstet.* 2012; 2: 3.
25. Matsuo K, Eno ML, Im DD, et al. Chemotherapy time interval and development of platinum and taxane resistance in ovarian, fallopian, and peritoneal carcinomas. *Arch Gynecol Obstet.* 2010; 281 (2): 325–8.

26. Rauh-Hain JA, Nitschmann CC, Worley MJ Jr, et al. Platinum resistance after neoadjuvant chemotherapy compared to primary surgery in patients with advanced epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2013; 129 (1): 63–8.
27. Kehoe S, Hook J, Nankivell M, et al. Chemotherapy or upfront surgery for newly diagnosed advanced ovarian cancer: Results from the MRC CHORUS trial. *J Clin Oncol.* 2013; 15 Suppl: 5500.
28. Cornelison R, Llaneza DC, Landen CN. Emerging therapeutics to overcome chemoresistance in epithelial ovarian cancer: a mini-review. *Int J Mol Sci.* 2017; 18 (10): 2171.
29. Zahreddine H, Borden KL. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Front Pharmacol.* 2013; 4: 28.
30. Holzer AK, Katano K, Klomp LW, et al. Cisplatin rapidly down-regulates its own influx transporter hCTR1 in cultured human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 2004; 10 (19): 6744–9.
31. Samimi G, Varki NM, Wilczynski S, et al. Increase in expression of the copper transporter ATP7A during platinum drug-based treatment is associated with poor survival in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2003; 9 (16 Pt 1): 5853–9.
32. Godwin AK, Meister A, O'Dwyer PJ, et al. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89 (7): 3070–4.
33. Correia AL, Bissell MJ. The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance. *Drug Resist Updat.* 2012; 15 (1–2): 39.
34. Senthebane DA, Rowe A, Thomford NE, et al. The Role of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: To Survive, Keep Your Enemies Closer. *Int J Mol Sci.* 2017; 18 (7): 1586.
35. Cesi G, Walbreccq G, Margue C, et al. Transferring intercellular signals and traits between cancer cells: extracellular vesicles as »homing pigeons«. *Cell Commun Signal.* 2016; 14: 13.
36. Tkach M, Thery C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell.* 2016; 164 (6): P1226–32.
37. Giallombardo M, Taverna S, Alessandro R, et al. Exosome-mediated drug resistance in cancer: the near future is here. *Ther Adv Med Oncol.* 2016; 8 (5): 320–2.
38. Trzpis M, McLaughlin PM, de Leij LM, et al. Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol.* 2007; 171 (2): 386–95.
39. Schmelzer E, Reid LM. EpCAM expression in normal, non-pathological tissues. *Front Biosci.* 2008; 13: 3096–100.
40. Baeuerle PA, Gires O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer.* 2007; 96 (3): 417–23.
41. Münz M, Kieu C, Mack B, et al. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene.* 2004; 23 (34): 5748–58.
42. Spizzo G, Went P, Dirnhofer S, et al. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2006; 103 (2): 483–8.
43. Bellone S, Siegel ER, Cocco E, et al. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule in primary, metastatic, and recurrent/chemotherapy-resistant epithelial ovarian cancer: implications for epithelial cell adhesion molecule-specific immunotherapy. *Int J Gynecol Cancer.* 2009; 19 (5): 860–6.
44. Tayama S, Motohara T, Narantuya D, et al. The impact of EpCAM expression on response to chemotherapy and clinical outcomes in patients with epithelial ovarian cancer. *Oncotarget.* 2017; 8 (27): 44312–25.
45. Keller L, Werner S, Pantel K. Biology and clinical relevance of EpCAM cell stress. 2019; 3 (6): 165–80.
46. Domcke S, Sinha R, Levine DA, et al. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nat Commun.* 2013; 4: 2126.
47. Beaufort CM, Helmijr JC, Piskorz AM, et al. Ovarian cancer cell line panel (OCCP): clinical importance of *in vitro* morphological subtypes. 2015; 10 (3): e0122284.
48. Lisio MA, Fu L, Goyeneche A, et al. High-Grade Serous Ovarian Cancer: basic sciences, clinical and therapeutic standpoints. *Int J Mol Sci.* 2019; 20 (4): 952.