Kinga Hermanowicz – Szamatowicz

Ocena klinicznej przydatności techniki Powierzchniowego Rezonansu Plazmonów do oznaczania IL-6 oraz markerów CA125 i HE4 w raku jajnika i endometriozie

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

w zakresie medycyny

Promotor: prof. dr hab. n. med. Sławomir Wołczyński

Klinika Rozrodczości i Endokrynologii Ginekologicznej

Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Białystok 2023

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW UŻYTYCH W PRACY…….…..**5**

1. WSTĘP - ENDOMETRIOZA ……..……**7**

1.1 Wprowadzenie……..**7**

1.2 Rodzaje endometriozy……..**8**

1.3 Diagnostyka endometriozy……...**9**

1.3.1 Badania serologiczne……..**9**

1.3.2 Badania obrazowe…….……**11**

1.3.3 Badanie laparoskopowe……**12**

1.4 Koncepcje patogenezy endometriozy……...…….**12**

1.4.1 Teoria transplantacyjna……**13**

1.4.2 Teoria metaplazji……..**14**

1.4.3 Teoria indukcji……..**14**

1.4.4 Rola układu immunologicznego w endometriozie……...**14**

1.5 Leczenie endometriozy……**17**

1.5.1 Leczenie chirurgiczne……..**17**

1.5.2 Leczenie farmakologiczne……...……**18**

2. RAK JAJNIKA……..……**18**

2.1 Epidemiologia……...……..……..**18**

2.2 Etiologia……..……..**19**

2.3 Czynniki ryzyka……..……**20**

2.3.1 Wiek..……...……**20**

2.3.2 Wiek menarche i menopauzy, czynniki rozrodcze a ryzyko rozwoju raka jajnika……...**21**

2.3.3 Antykoncepcja, hormonalna terapia zastępcza (HTZ) a ryzyko rozwoju raka jajnika……..……**22**

2.3.4 Endometrioza……..…….**22**

2.3.5 Styl życia i nawyki żywieniowe…….…….**22**

2.4 Czynniki prognostyczne raka jajnika…..…….……**23**

2.4.1 Stopień zaawansowania klinicznego według FIGO…..……...…**23**

2.4.2 Stopień zróżnicowania histopatologicznego……..…..……**23**

2.4.3 Typ histologiczny nowotworu….……..……...……**24**

2.4.4 Stan pacjentki, zastosowane leczenie……..……...……..**25**

2.4.5 Inne czynniki prognostyczne……..…….……**25**

2.4.6 Pierwotna cytoredukcja……..……..**26**

2.4.7 Wodobrzusze……..……..**27**

2.5 Diagnostyka raka jajnika…….……**27**

2.5.1 Badania przesiewowe..…….……**27**

2.5.2 Badania obrazowe……..…….……**28**

3. MARKERY NOWOTWOROWE ORAZ ICH ZNACZENIE W DIAGNOSTYCE ENDOMETRIOZY I RAKA JAJNIKA…….……...**29**

3.1 Marker CA125 – antygen nowotworowy CA125……...**29**

3.2 HE4 - human epididymis protein 4…….…….....**32**

3.3 Interleukina 6……**34**

4. STANDARDOWE METODY OZNACZANIA MARKERÓW NOWOTWOROWYCH……...…..**35**

4.1 Testy ELISA…….…….**35**

4.1.1 Test ELISA bezpośredni…….……**36**

4.1.2 Test ELISA pośredni…….……..**37**

4.1.3 Test podwójnego wiązania „sandwich”…….....…**37**

4.1.4 TEST ELISA – metoda konkurencyjna (kompetytywna)…..……....**38**

4.2 Inne metody immunoemzymatyczne……..…...……..……**39**

4.2.1 Metoda chemiluminescencyjna (CLIA)…….……...**40**

4.2.2 Metoda elektrochemiluminescencyjna(ECLIA)…….……..…**40**

4.2.3 Metody immunofluorescencyjne…..…..…….….……..**41**

5. TYPY BIOSENSORÓW ……...**42**

6. UZASADNIENIE PODJĘCIA BADAŃ I CELE PRACY ……**45**

7. METODYKA BADAŃ……..……**46**

7.1 Odczynniki……**46**

7.2 Sprzęt……..**46**

7.3 Materiał i metody……..**47**

7.4 Statystyka ……..**51**

8. WYNIKI……...**52**

8.1 Ocena stężeń badanych markerów CA125, HE4 i IL-6 w badanych grupach……..…….……**53**

8.1.1 Oznaczanie stężenia markera CA125 w próbkach pacjentek z torbielą endometrialną i zdrowych dawczyń…….…**53**

8.1.2 Oznaczanie stężenia markera CA125 w próbkach pacjentek z rakiem jajnika i zdrowych dawczyń…….……**55**

8.1.3 Oznaczanie stężenia markera HE4 w próbkach pacjentek z torbielą

endometrialną i zdrowych dawczyń…….……58

8.1.4 Oznaczanie stężenia markera HE4 w próbkach pacjentek z rakiem jajnika i zdrowych dawczyń…..……..……...…….59

8.1.5 Oznaczanie stężenia L-6 w próbkach pacjentek z torbielą endometrialną i zdrowych dawczyń……...……61

8.1.6 Oznaczanie stężenia IL-6 w próbkach pacjentek z rakiem jajnika i zdrowych dawczyń……..…….……63

8.2 Ocena korelacji pomiędzy oznaczeniami CA125, HE4 i interleukiny 6 oznaczanych za pomocą biosensora SPRI a metodą standardową u pacjentek z rakiem jajnika i torbielą endometrialną…….….…65

9. DYSKUSJA……..……...……70

10. WNIOSKI……..……78

11. STRESZCZENIE…….…….79

12. SUMMARY……...82

13. PIŚMIENNICTWO……..85

14. SPIS RYCIN……..……..101

15. SPIS TABEL……..……..104

16. PODZIĘKOWANIA……..……105

WYKAZ SKRÓTÓW UŻYTYCH W PRACY

ANA - *antinuclear antibody* - przeciwciała przeciwjądrowe

CA125 - *carcinoma antigen 125* - antygen nowotworowy CA 125

CEA - *carcino-embryonic antygen* - antygen rakowo-płodowy

CLIA - *chemiluminescent immunoassay* chemiluminescencyjny test immunologiczny

CPP - *chronic pelvic pain* - przewlekły ból w miednicy mniejszej

ECLIA - *electro-chemiluminescence immunoassay* - elektrochemiluminescencja

ELISA - *enzyme-linked immunoabsorbent assay* - test immunoenzymatyczny ELISA

EIA - *enzyme immunoassay* - metody immunoenzymatyczne

FIA - *fluorescent immunoassay* - metody immunofluorescencyjne

FGF α - *fibroblast growth factor α* - czynnik wzrostu fibroblastów α

FGF ß - *fibroblast growth factor ß* - czynnik wzrostu fibroblastów ß

FIGO - *International Federation of Gynecology and Obstetrics* - Międzynarodowa Federacja Ginekologii i Położnictwa

HE4 - *human epididymis protein 4* - ludzkie białko komórek nabłonkowych najądrza 4

HTZ - hormonalna terapia zastępcza

IL-6 - *interleukin 6* - interleukina 6

IIFT - *indirect immunofluorescence technique* - technika immunofluorescencji pośredniej

MCSF - *macrophag stimulaiting factor* - czynnik stymulujący kolonie makrofagów (MCSF)

MMP-2 - *matrix metalloproteinases 2* - metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej 2

OS - *overall survival* - czas przeżycia całkowitego

PD-ECGF - *platelet growth factor* - płytkopochodny czynnik wzrostu

PFS - *progression - free survival* - czas do progresji choroby

PPV - *positive predictive value* - wartość predykcyjna dodatnia

ROMA - *Risk of Ovarian Malignancy Algorithm* - algorytm ryzyka złośliwości jajników

SPRI - *Surface Plasmon Resonance Imaging* - Powierzchniowy Rezonans Plazmonów w wersji obrazowej

TGF-α - *transforming growth factor α* - transformujące czynniki wzrostu α

TGF-ß - *transforming growth factor ß* - transformujące czynniki wzrostu ß

TNF α - *tumor necrosis factor alfa* - czynnik martwicy nowotworów alfa

USG TV - *transvaginal ultrasound* - ultrasonografia przezpochwowa

VEGF - *vascular endothelial growth factor* - czynnik wzrostu śródbłonka naczyń

1. WSTĘP - ENDOMETRIOZA

1.1 Wprowadzenie

Endometrioza, zwana też gruczolistością, jest chorobą przewlekłą, indukowaną przez proces zapalny i zależną od estrogenów. Definiowana jest jako obecność czynnych gruczołów i tkanki podścieliska występujących poza jej naturalnym środowiskiem, czyli jamą macicy.

Jest chorobą niezłośliwą, jednak ze względu na towarzyszące dolegliwości i przewlekły charakter jest ważnym problemem medycznym, społecznym i ekonomicznym. Wzrost tkanki endometrialnej jest zależny od estrogenów, dlatego choroba rozwija się przede wszystkim u kobiet w wieku rozrodczym i dotyka od 5 do 12% z nich.

Dostępne dane pokazują, że u kobiet diagnozujących się z powodu niepłodności, endometriozę stwierdza się nawet do 50% przypadków, co stanowi niezwykle ważny problem medyczny (1).

Jest również jedną z najczęstszych przyczyn dolegliwości bólowych miednicy mniejszej (chronic pelvic pain – CPP), których charakter może być zróżnicowany i często niespecyficzny (2). Ma najczęściej postać przewlekłego zespołu bólowego miednicy mniejszej, niezależnego od fazy cyklu miesiączkowego (3). Na podstawie analizy szacuje się, że endometrioza może dotyczyć nawet do ponad 80% pacjentek z przewlekłymi bólami w jamie brzusznej, trwającymi co najmniej trzy miesiące (4).

Do najczęściej zgłaszanych przez pacjentki objawów endometriozy należą: bolesne miesiączkowanie, bóle w podbrzuszu, bolesne stosunki (dyspareunia), związane

z naciekaniem więzadłeł krzyżowo – macicznych oraz bolesne oddawanie moczu i stolca, spowodowane zajęciem zatoki Douglasa lub ścian pochwy (5).

Lokalizacja zmian jest bardzo zróżnicowana. Może obejmować otrzewną miednicy, warstwę mięśniową macicy (adenomioza), inne narządy płciowe, a także odległe lokalizacje np. przeponę. Endometrioza może lokalizować się również w obrębie jajników, gdzie przybiera postać torbieli endometrialnych (6).

Ze względu na tak szerokie spektrum dolegliwości i trudności diagnostyczne, endometrioza jest jednostką chorobową wpływającą na zdrowie fizyczne, psychiczne, jakość życia seksualnego i relacje w życiu codziennym kobiety.

1.2 Rodzaje endometriozy

Podział klasyczny topograficzny (wg Martiusa) wyróżnia trzy rodzaje schorzenia w zależności od lokalizacji:

1. *Endometriosis genitalis interna* (macica, jajowód);
2. *Endometriosis genitalis externa* (pozostałe części układu rozrodczego);
3. *Endometriosis extragenitalis* (poza układem rozrodczym – np. w jamie otrzewnej).

Klasyfikacja histologiczna endometriozy (skala Brosensa) wyróżnia trzy podtypy:

1. *Typ śluzówkowy* (występuje w torbielach endometrialnych jajnika);
2. *Typ otrzewnowy* (wykazuje wieloogniskowość oraz różnorodność morfologiczną);
3. *Typ gruczołowaty* (głównym elementem jest tkanka gruczołowo - włóknisto-mięśniowa i dotyczy endometriozy głęboko naciekającej).

Obecnie powszechnie obowiązująca klasyfikacja stopnia zaawansowania endometriozy, to zmodyfikowana w 1996 roku przez Amerykańskie Towarzystwo Medycyny Rozrodu (American Society for Reproductive Medicine – ASRM) wcześniejsza klasyfikacja z 1985 r. (7):

- I^0 - minimalna (1-5 pkt)
- II^0 - łagodna (6-15 pkt)
- III^0 - umiarkowana (16-40 pkt)
- IV^0 - ciężka (>40 pkt)

1.3 Diagnostyka endometriozy

W praktyce klinicznej do diagnostyki endometriozy wykorzystywane są:

1. Badania serologiczne
2. Techniki obrazowe
3. Badania laparoskopowe połączone z badaniem histopatologicznym

1.3.1 Badania serologiczne

Od wielu lat prowadzi się szereg badań laboratoryjnych na pograniczu laboratorium i kliniki, w celu próby identyfikacji markerów we krwi, endometrium lub płynie otrzewnowym, które pozwalałyby na wczesną i nieinwazyjną diagnostykę endometriozy. Na dzień dzisiejszy nie udało się wyodrębnić specyficznych markerów endometriozy, które pozwoliłyby na czułe i swoiste rozpoznanie choroby z pominięciem technik inwazyjnych. Jednym z badanych dotychczas biomarkerów w endometriozie było białko CA125. Jest to substancja wielocząsteczkowa wytwarzana

przez nowotwór lub komórki gospodarza i uwalniana do płynów ustrojowych w odpowiedzi na obecność procesu chorobotwórczego.

Antygen CA125 nie jest specyficznym markerem dla tej jednostki chorobowej, jednak oznaczenie go pozwala uzupełnić podstawową diagnostykę różnicową endometriozy. Wiadomo, że podwyższone stężenia CA125 korelują z występowaniem endometriozy o średnim i ciężkim przebiegu i proponuje się rutynowe oznaczanie jego stężenia wśród pacjentek diagnozowanych z powodu niepłodności (8). Dodatkowo podkreśla się wartość oznaczania CA125 jako czynnika prognostycznego nawrotu gruczolistości, wskaźnika oceny skuteczności działań chirurgicznych oraz czynnika prognostycznego możliwości zajścia w ciążę wśród pacjentek cierpiących na niepłodność w przebiegu endometriozy (9).

Oznaczanie biomarkera HE4 może być pomocne przy diagnostyce różnicowej endometriozy. Wraz z białkiem CA125 pozwala na różnicowanie torbieli endometrialnych od nowotworów złośliwych jajnika (10). Zapardiel i wsp. w 2016 roku przeprowadzili wieloośrodkowe badanie, w którym udowodnili, że zastosowanie obu wyżej wymienionych markerów pozwala z dużym prawdopodobieństwem wykluczyć raka jajnika u pacjentek z endometriozą, ponieważ stężenie CA125 jest podwyższone zarówno u kobiet z endometriozą jak i rakiem jajnika, z kolei stężenie HE4 jest podwyższone tylko u kobiet z rakiem jajnika (11). Badanie Huhtinena i wsp. dowiodło, że biomarker HE4 ma potencjalną wartość w różnicowaniu nowotworów jajnika, endometrium i torbieli endometrialnych jajnika. Wykazano, że stężenie HE4 jest najwyższe u pacjentek z rakiem jajnika (1125,4 pmol/l), dużo niższe u chorych z rakiem endometrium (99,2 pmol/l), a najniższe, poniżej górnej granicy normy u kobiet

z torbielami endometrialnymi jajnika (46,0 pmol/l) lub endometriozą w innej lokacji (12).

Do biomarkerów endometriozy zaliczyć można również interleukinę 6 (IL-6), jednakże po wcześniejszym wykluczeniu objawów zakażenia.

1.3.2 Badania obrazowe

U pacjentek z przewlekłym bólem w obrębie miednicy mniejszej badaniem z wyboru nadal jest badanie ultrasonograficzne (USG), ponieważ umożliwia przeprowadzenie diagnostyki różnicowej w kierunku innych przyczyn bólu. Jest ono najbardziej dostępne i najmniej inwazyjne. Przezpochwowe badanie USG (transvaginal ultrasound – USG TV) charakteryzuje się najwyższą czułością i swoistością w diagnostyce i różnicowaniu torbieli endometrialnych jajników.

Cechami charakterystycznymi w badaniu USG TV pozwalającymi na ustalenie rozpoznania endometrioma są zmiany torbielowate (maksymalnie do 4 komór), o zwiększonej jednorodnej echogeniczności, bez unaczynionych struktur wewnątrz torbieli.

Ultrasonografia jest również czułą metodą wykrywającą endometriozę w ścianie odbytnicy. Bardzo ważnym ograniczeniem USG TV jest doświadczenie badającego. USG nie jest wystarczająco czułym badaniem do wykluczenia endometriozy.

Badanie rezonansu magnetycznego umożliwia jednoczesną ocenę przedniego i tylnego kompartmentu miednicy, rozpoznanie naciekania więzadeł krzyżowo - macicznych oraz moczowodów. Wykazuje jednak mniejszą czułość w diagnostyce endometriozy pęcherza moczowego w porównaniu z ultrasonografią przezpochwową.

Należy podkreślić, że ocena obecności i głębokości nacieku jest bardzo trudna, wymaga doodbytniczego podania środka cieniującego i bardzo dużego doświadczenia osoby oceniającej wynik badania. Pomimo czułości rezonansu magnetycznego 71% i swoistości 82% nie pozwala on na ocenę pełnego stopnia zaawansowania choroby.

1.3.3 Badanie laparoskopowe

Do 2021 r. złotym standardem, który pozwalał na jednoznaczne rozpoznanie endometriozy, było uzyskanie dodatniego wyniku badania histopatologicznego materiału pobranego w trakcie laparoskopii.

Podczas operacji można ustalić jeden z 3 fenotypów endometriozy: torbiele endometrialne (jajników), powierzchowne wszczepy endometriozy (głównie w otrzewnej) i endometrioza głęboko naciekająca, na którą wskazuje guzek penetrujący otrzewną na głębokość przekraczającą 5 mm.

W obrębie jajników choroba może występować powierzchownie lub w warstwie korowej, powodując stan zapalny i zwłóknienie.

Opublikowane w 2022 r. rekomendacje Europejskiego Towarzystwa Rozrodu i Embriologii przestały rozpoznawać laparoskopię jako złoty standard w rozpoznaniu endometriozy. Badanie to jest rekomendowane jedynie w przypadku negatywnych wyników innych technik obrazowych i nieskutecznej terapii empirycznej (13).

1.4 Koncepcje patogenezy endometriozy

Pomimo wielu przeprowadzonych badań dotyczących mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój choroby, etiopatogeneza tej jednostki chorobowej nadal

jest niejasna. Do dnia dzisiejszego nie można postawić jednoznacznego poglądu na temat jej patogenezy.

W historii badań nad endometriozą autorstwa Kanigowskiej i wsp. (14) widzimy jak rozwijała się wiedza na temat endometriozy. Została ona po raz pierwszy opisana w 1860 roku przez Karla Rokitanskiego i Hansa Chiarie między warstwami tkanki mięśniowej ścian macicy (14,15). W 1908 roku Cullen napisał monografię na temat adenomyosis (16). Russel w 1899 roku opisał endometriozę jajników u kobiety operowanej z powodu raka jajnika. W badaniu histopatologicznym w drugim jajniku stwierdzono strukturę odpowiadającą gruczołom i podścielisku endometrium (17).

Wśród najczęściej stawianych hipotez przyczyn endometriozy podawane są trzy teorie:

1. Teoria transplantacyjna
2. Teoria rozwoju metaplazji („*in situ*”)
3. Teoria indukcyjna

1.4.1 Teoria transplantacyjna

Sampson na początku XX wieku opublikował teorię wstecznego transportu krwi miesiączkowej, tzw. teoria „wstecznego miesiączkowania”. Zgodnie z tą teorią dochodzi do implantacji złuszczonych komórek błony śluzowej endometrium w obrębie jamy otrzewnej (18). Możliwe jest to dzięki zachodzeniu dwóch procesów:

- wstecznego odpływu krwi miesiączkowej, w której znajduja się komórki endometrium, przez jajowody do jamy otrzewnowej oraz
- adhezji, implantacji i proliferacji tych komórek w zmiany endometrialne.

Początkowo ta teoria wydawała się spójna i logiczna w wyjaśnieniu zjawiska endometriozy, jednak z czasem zaczęła budzić wiele pytań i wątpliwości. Nie potrafiono znaleźć wyjaśnienia, dlaczego pomimo teorii wstecznego odpływu krwi miesiączkowej u blisko 90% kobiet, tylko w wąskiej grupie dochodzi do przetrwania komórek endometrium poza macicą. Późniejsze badania potwierdziły, że komórki złuszczonego nabłonka endometrium znajdowane są poza jamą macicy u większości zdrowych kobiet. Natomiast do implantacji dochodzi tylko u 10-15% z nich (19). Spowodowało to rozwój dalszych badań i poszukiwań przyczyn endometriozy.

1.4.2 Teoria metaplazji

Prekursorem teorii metaplazji (rozwoju „*in situ*”) był Robert Meyer, który udowodnił, iż źródłem komórek endometrialnych w miejscach ektopowych są multipotencjalne komórki nabłonka otrzewnej, nabłonka płciowego lub pozostałości przewodów Mullera i Wolffa.

Wydzielina miesiączkowa może być dodatkowo bodźcem, który bezpośrednio lub pośrednio wpływa na niezróżnicowane komórki mezenchymy, powodując przekształcenie ich w komórki zrębu.

1.4.3 Teoria indukcji

Obydwie teorie scala trzecia - teoria indukcyjna - oparta na hipotezie, że nieokreślony endogenny czynnik może wywołać przekształcanie niezróżnicowanych komórek otrzewnowych w tkankę endometrialną (19).

1.4.4 Rola układu immunologicznego w endometriozie

Aby doszło do rozwoju i „progresji” ognisk endometriozy musi współistnieć wiele czynników i zachodzących równolegle procesów genetycznych, środowiskowych

czy immunologicznych. W ostatnich latach wielu badaczy potwierdza, że jednym z głównych warunków utrzymania i rozwoju komórek endometrium, niezależnie od sposobu ich pojawienia się w jamie otrzewnowej, są zaburzenia w układzie odpornościowym (20). W warunkach fizjologicznych komórki endometrialne, które dostają się do jamy otrzewnowej, eliminowane są przez mechanizmy odpowiedzi immunologicznej. Mechanizmy obronne swoiste i nieswoiste organizmu chronią w ten sposób przed rozwojem choroby.

W większości doniesień endometriozę traktuje się jako miejscowy jałowy stan zapalny otrzewnej. U pacjentek z endometriozą otrzewnową wzrasta objętość płynu otrzewnowego w którym gromadzą się leukocyty i wzrasta stężenie cytokin (21). Do pojawienia się lokalnych zmian zapalnych dochodzi w czasie krwawienia miesiączkowego. Rozwijający się miejscowy stan zapalny doprowadza do napływu monocytów które przechodzą w makrofagi, których podwyższoną zawartość wykazano w płynie otrzewnowym u pacjentek z endometriozą w porównaniu do zdrowych kobiet (21). Podczas oceny funkcji makrofagów zaobserwowano zmiany czynnościowe tych komórek. Pomimo tego, że ilość ich w płynie otrzewnowym jest podwyższona, produkowane przez nie cytokiny i czynniki wzrostu nie niszczą komórek endometrium, a wręcz stymulują do wzrostu ektopowe komórki (22). Makrofagi znajdujące się w płynie otrzewnowym mają obniżoną zdolność do cytolizy, fagocytozy oraz obniżoną adhezję do otrzewnej (23,24). Właśnie tymi zaburzeniami tłumaczy się przeżywalność, inwazję i rozrost komórek z następowym rozrostem ognisk endometriozy (25).

Wykazano, że u kobiet z endometriozą obniżona jest również odporność cytotoksyczna limfocytów NK, limfocytów T i B, odpowiedzialnych za produkcję przeciwciał (26) oraz neutrofili (27).

U pacjentek z endometriozą wykazano obecność autoprzeciwciał skierowanych przeciwko antygenom i komórkom endometrialnym, antygenom wewnątrzkomórkowym (antyfosfolipidowe, przeciwhistonowe, przeciwjądrowe), tkankom (antyendotelialne) i narządom (przeciwjajnikowe, przeciwtarczycowe). Obecność wspomnianych przeciwciał jest typowa dla nieprawidłowej poliklonalnej aktywacji limfocytów B. Nadal brakuje jednak dowodów by postawić tezę, iż jest to choroba wynikająca z autoagresji (28,29).

Obecność i jednocześnie brak eliminacji komórek endometrium, dostających się do płynu otrzewnowego podczas „wstecznego miesiączkowania", nie są wystarczającymi warunkami rozwinięcia się endometriozy. Kolejnym niezbędnym elementem rozwoju choroby jest implantacja żywych komórek endometrium do miejsc „docelowych". W pewien sposób przypomina to zjawisko powstawania przerzutów nowotworowych. Komórki endometrialne mają na swojej powierzchni szereg cząstek adhezyjnych. Cząstki te, np. integryna i kadheryna E ułatwiają przyleganie tych komórek do nabłonka otrzewnej i ich implantację.

Adhezji komórek błony śluzowej macicy do otrzewnej sprzyjają: czynnik martwicy nowotworów (TNF alfa – tumor necrosis factor), tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA – tissue plasminogen activator) oraz metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (MMP - matrix metalloproteinases) (30,31,32,33). Umożliwiają one degradację macierzy pozakomórkowej. Wykazano wyższą ekspresję MMP-2 oraz zmniejszoną ekspresję mRNA dla jej inhibitora u kobiet z endometriozą (34).

Kolejnym etapem w procesie implantacji endometriozy jest indukcja unaczynienia ektopowych ognisk endometrium, gdyż bez tego procesu niemożliwy były dalszy rozwój ognisk endometriozy. Rozwój unaczynienia reguluje grupa białek

angiogennych VEGF (VEGF, vascular endothelial growth factor) (35), czynnik wzrostu fibroblastów α i ß (FGF-α, FGF-ß, fibroblast growth factor), płytkopochodny czynnik wzrostu śródbłonka (PD-ECGF, platelet growth factor), czynnik martwicy nowotworów α (TNF-α, tumor necrosis factor) oraz transformujące czynniki wzrostu α i ß (TGF-α i TGF-ß, transforming growth factor) (36,37,38). VEGF jest wydzielany do płynu otrzewnowego przez aktywowane makrofagi.

1.5 Leczenie endometriozy

Skuteczne wyleczenie endometriozy wymagałoby leczenia przyczynowego a nie znamy przyczyny jej wystąpienia. W leczeniu endometriozy możemy zatem stosować tylko leczenie objawowe w celu redukcji bólu, zwiększenia szansy na zajście w ciążę oraz w miarę możliwości maksymalne opóźnienie wystąpienia wznowy choroby (39). Nie udało się znaleźć w pełni skutecznego leczenia choroby, umożliwiającego eliminację wszystkich związanych z nią objawów.

1.5.1 Leczenie chirurgiczne

Leczenie operacyjne dzieli się na zachowawcze (stosowane głównie u pacjentek w wieku rozrodczym, które nie zrealizowały jeszcze swoich planów macierzyńskich) i radykalne (u pacjentek bez planów macierzyńskich). Operacja zachowawcza polega na zniszczeniu lub wycięciu ognisk endometriozy z otrzewnej lub narządów sąsiadujących, uwolnieniu zrostów, wyłuszczeniu torbieli endometrioidalnych lub odnerwieniu miednicy mniejszej. Operacja radykalna polega na obustronnym wycięciu przydatków wraz z jajowodami i macicą oraz usunięciu wszystkich widocznych makroskopowo

ognisk endometriozy (40). Niestety pomimo zastosowanych chirurgicznych metod leczenia u 20–40% pacjentek leczenie nie przynosi zadowalającego efektu (41).

1.5.2 Leczenie farmakologiczne

Farmakoterapia ma na celu stworzenie środowiska hypoestrogennego i atrofii ognisk endometriozy lub polega na podaniu gestagenów i wywołaniu zmian pseudodoczesnowych. Do leków stosowanych w leczeniu endometriozy zaliczamy:

- danazol - lek o działaniu antygonadotropowym i androgennym,
- analogi gonadoliberyny,
- leki gestagenne (42)

Pomimo obiecujących wstępnych badań na zwierzętach inhibitory aromatazy (43) i inhibitory TNF-α (44) nie weszły do codziennej praktyki lekarskiej.

2. RAK JAJNIKA

2.1 Epidemiologia

Nowotwory jajnika są jednym z kluczowych problemów w ginekologii onkologicznej. Rak jajnika jest drugim, po raku trzonu macicy, najczęstszym nowotworem żeńskich narządów rodnych.

Ryzyko zachorowania na ten nowotwór szacuje się na 1,5% w ciągu całego życia kobiety, przy ryzyku zgonu ok. 1%. Według GLOBOCAN roczną liczbę zachorowań w 2020 r. na raka jajnika na świecie szacuje się na ok. 314 000 nowych przypadków i ok. 207 000 zgonów (45).

Zachorowalność na nowotwory złośliwe jajnika wzrastała do połowy lat 90 XX wieku (12,2/10^5 w 1996 roku), po czym nastąpił spadek i stabilizacja zachorowalności na poziomie około 11/$10^{5.}$. Polska należy do krajów o średniej zachorowalności na raka jajnika. W 2019 roku w Polsce zachorowało na raka jajnika 3 710 kobiet, a zmarło 2 777 (współczynnik standaryzowany odpowiednio - 10,8 i 6,42). Umiejscawia to ten nowotwór na piątym miejscu pod względem zachorowalności wśród raków u kobiet i na 4 miejscu pod względem struktury zgonów, po nowotworze płuc, piersi i jelita grubego (46).

2.2 Etiologia

W ciągu ostatnich kilkunastu zmieniła się wiedza na temat pochodzenia raka jajnika. Do niedawna przyjmowano, iż wywodzi się on z komórek nabłonka pokrywającego jajnik – klasyczna teoria przedstawiona przez Thomasa Spencera Wellsa w 1872 r. (47).

W świetle nowych dowodów należy uznać że, większość raków jajnika pochodzi z innych struktur niż komórki nabłonka pokrywającego jajnik (NPJ), tj. min. z jajowodu i endometriozy (48). Zagadnienie histiogenezy raka jajnika zostało omówione w pracy Ewy Nowak - Markwitz i Marka Spaczyńskiego zatytułowanej: *„Rak jajnika – nowe spojrzenie na pochodzenie i histiogenezę”*, gdzie przedstawiony jest tzw. „dualistyczny model kancerogenezy” (49). Heterogenne pochodzenie raka jajnika wskazuje, że nie jest to pojedyncza jednostka chorobowa. Obecnie uznaje się, iż większość niskozróżnicowanych raków surowiczych jajnika (HG-SOC) wywodzi się z dystalnej części jajowodu. Natomiast surowicze raki o granicznej złośliwości (borderline tumors) nie są zmianami prekursorowymi dla większości HG-SOC, co potwierdza inne

spektrum zmian molekularnych w guzach o granicznej złośliwości. Raki jasnokomórkowe oraz endometrioidalne mogą wywodzić się z nabłonka müllerowskiego lub z ognisk endometriozy.

Około 5-10% wszystkich raków jajnika rozwija się na podłożu genetycznym Wyróżniamy wśród nich:

- zespół dziedzicznego występowania raka piersi i raka jajnika (HBOC - Hereditary Breast Ovarian Cancer). Związany jest z mutacjami w obrębie genów BRCA 1 i 2,
- swoisty miejscowo zespół dziedzicznego występowania raka jajnika (HOC - Herediatary Ovarian Cancer), tzw. miejscowospecyficzny rak jajnika, *TP53*, in the Li-Fraumeni syndrome, *CHEK2, RAD51, BRIP1*, and *PALB2*.
- dziedziczny zespól niepolipowatego raka okrężnicy i odbytnicy - zespół Lynch (Lynch Syndrom, HNPCC - Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer), związany z mutacjami w genach MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM (50).

Przypadki o nieustalonej etiologii zostały sklasyfikowane jako „sporadyczne" raki jajnika i stanowią 90-95% przypadków (51).

2.3 Czynniki ryzyka

2.3.1 Wiek

Rak jajnika jest chorobą występującą głównie w wieku około i pomenopauzalnym. Ryzyko zachorowania na raka jajnika wzrasta z wiekiem aż do połowy siódmej dekady życia (ponad $45/10^5$), po czym zmniejsza się.

Wiek jest zarówno czynnikiem ryzyka zachorowania jak i czynnikiem prognostycznym raka jajnika. Na świecie najczęściej chorują kobiety po 65 r.ż. W Europie 80% raków jajnika rozwija się po 50 r.ż. (52). Nowotwory związane z ryzkiem genetycznym rozwijają się około 5 lat wcześniej niż raki sporadyczne. U pacjentek przed 40 rokiem życia częściej rozpoznaje się nowotwory o granicznej złośliwości oraz raki wysoko zróżnicowane. U starszych pacjentek gorsze rokowanie wiąże się z różnicami w biologii nowotworu oraz w wydolności organizmu. U starszych kobiet rzadziej stosuje się „agresywne" leczenie systemowe i operacyjne co przekłada się na gorsze wyniki leczenia (53).

2.3.2 Wiek menarche i menopauzy, czynniki rozrodcze a ryzyko rozwoju raka jajnika

Wiek pierwszej miesiączki <12 i >15 r.ż. nie ma wpływu na ryzyko wystąpienia nowotworu, natomiast im późniejszy wiek wystąpienia menopauzy, tym większe ryzyko zachorowania na raka jajnika.

Niska rodność lub brak potomstwa zwiększa ryzyko wystąpienia raka jajnika. Przebycie czterech i więcej porodów redukuje ryzyko choroby o 40% (54). Niepłodność zwiększa ryzyko raka jajnika. U kobiet u których stymulowano owulację ryzyko wynosi RR = 1,45, natomiast u kobiet po nieudanym zapłodnieniu zewnątrzustrojowym ryzyko to wzrasta do RR=19 (55).

2.3.3 Antykoncepcja, hormonalna terapia zastępcza (HTZ) a ryzyko raka jajnika

Doustna antykoncepcja obniża ryzyko wystąpienia raka jajnika, jest to jedyna udowodniona metoda chemoprewencji. Po 5 latach stosowania antykoncepcji ryzyko zachorowania zmniejsza się o ok. 50% (56).

HTZ nieznacznie zwiększa ryzyko wystąpienia raka jajnika, jest ono większe przy stosowaniu terapii tylko estrogenowej (RR 1,53) w porównaniu do terapii łączonej (RR 1,17) (57).

2.3.4 Endometrioza

Rak jajnika może rozwinąć się na podłożu endometriozy a występowanie endometriozy zwiększa ryzyko wystąpienia raka jajnika (58,59). Istnieją wspólne szlaki łączące endometriozę z rakiem jajnika związane ze stresem oksydacyjnym, zapaleniem i hiperestrogenizmem (60). Transformacja złośliwa dotyczy szczególnie raków endometrioidalnych i jasnokomórkowych.

2.3.5 Styl życia i nawyki żywieniowe

Kobiety otyłe wykazują większe ryzyko wystąpienia raka jajnika (61). Tkanka tłuszczowa jest nie tylko rezerwuarem energii ale także narządem wytwarzającym czynniki prozapalne i regulującym podziały komórkowe. Jest infiltrowana przez makrofagi, które stymulują adipocyty do produkcji TNF alfa, interleukin, leptyny czy białka C-reaktywnego.

2.4 Czynniki prognostyczne raka jajnika

Czynniki prognostyczne to cechy wskazujące na przewidywany przebieg naturalny choroby i rokowanie w chorobie nowotworowej i pozwalają określić przewidywany czasokres do progresji oraz czasokres całkowitego przeżycia (PFS, progression-free survival i OS, overall survival).

Do podstawowych czynników prognostycznych w raku jajnika należy:

2.4.1 Stopień zaawansowania klinicznego według FIGO (staging)

Stopień zaawansowania klinicznego raka jajnika wg FIGO (Międzynarodowej Federacji Ginekologii i Położnictwa) uważany jest za najważniejszy czynnik rokowniczy (62). Odsetek pięcioletnich przeżyć w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego w latach 1999-2001 wynosił na świecie:

- Ia - 92,1%, Ib - 84,9%, Ic - 84,7%,
- IIa - 74,5%, IIb - 67,4%, IIc - 69,8%,
- IIIa - 49,7%, IIIb - 42,5%, IIIc - 32,6%,
- IV - 17,9% (62).

2.4.2 Stopień zróżnicowania histopatologicznego (grading)

Stopień złośliwości histologicznej nowotworu charakteryzuje nowotwór poprzez wygląd jego komórek i tkanek pod mikroskopem oraz na podstawie ich podobieństwa do zdrowych, niezmienionych nowotworowo struktur. W klasyfikacji wróżniono następujące stopnie zróżnicowania histopatologicznego, oznaczono je literą G:

- GX - stopień zróżnicowania niemożliwy do określenia

- G1 - nowotwory o wysokim stopniu zróżnicowania (komórki niezróżnicowane nie przekraczają 5% wszystkich komórek)
- G2 - nowotwory zawierające do 50% komórek niezróżnicowanych
- G3 - nowotwory, w których utkanie niezróżnicowane przekracza 50%.

W wysoko zróżnicowanych typach nowotworu wykazano dłuższe przeżycia chorych z rakiem jajnika. Odsetek pięcioletnich przeżyć wynosi: dla G1 - 77%, G2 - 30%, G3 - 17% (63).

2.4.3 Typ histologiczny nowotworu

Nowotwory wywodzące się z nabłonka pokrywającego jajnik, pochodzenia jajowodowego i z podścieliska stanowią około 60% wszystkich nowotworów jajnika i około 80-90% nowotworów złośliwych jajnika. Raki jajnika (nowotwory nabłonkowe) dzieli się na następujące typy:

1. Nowotwory z nabłonka powierzchniowego i podścieliska (surface-epithelial stromal tumors):
    - surowicze,
    - endometrioidalne,
    - śluzowe,
    - jasnokomórkowe,
    - z komórek nabłonka przejściowego,
    - płaskonabłonkowe,
    - mieszane,
    - niezróżnicowane,
    - niesklasyfikowane.

2. Nowotwory ze sznurów płciowych i zrębu jajnika (sex-cord stromal tumors)
3. Nowotwory z komórek rozrodczych (germ cel tumor)

Ze względu na częstość występowania największe znaczenie praktyczne mają nowotwory nabłonkowe surowicze (60-80%), śluzowe (5-15%) i endometrioidalne (10-25%) (64).

Nowotwory nabłonkowe mogą mieć charakter łagodny, złośliwy lub nowotwory o tzw. złośliwości granicznej. Dla klinicysty bardzo ważne jest odróżnienie nowotworów granicznych (o małym potencjale złośliwości), gdyż wymagają one mniej inwazyjnego postępowania chirurgicznego i uzupełniającego, od nowotworów o wyższym potencjale złośliwości wymagających bardziej agresywnego postępowania.

2.4.4 Stan pacjentki, zastosowane leczenie

Wiek chorej w chwili rozpoznania nowotworu, stan ogólny wg WHO, doświadczenie zespołu leczącego, masa pozostawionych tkanek nowotworowych po pierwotnej operacji cytoredukcyjnej mają kluczowe znaczenie prognostyczne, tuż po stopniu zaawansowania choroby (65).

2.4.5 Inne czynniki prognostyczne

Do innych czynników prognostycznych zaliczamy:

- ploidię DNA,
- wartość stężenia markera CA125,
- obecność mutacji w obrębie genu BRCA1 i BRCA2,
- zwiększoną ekspresję takich czynników molekularnych jak: białko p53, interleukina 6 (IL-6), protoonkogen c-erbB2, receptor czynnika

wzrostu naskórka (EGF-R), płytkopodobny czynnik wzrostu (PDGF), rozpuszczalna postać urokinazowego receptora aktywatora plazminogenu (u-PA), naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF), czynnik stymulujący kolonie makrofagów (MCSF) (64,65).

2.4.6 Pierwotna cytoredukcja

Zakres pierwotnej cytoredukcji i pozostała po operacji masa nowotworu ma wpływ na 5-cio letnie przeżycie chorych. Za optymalną cytoredukcję uważa się taką, po której wielkość pozostawionych mas nowotworu nie przekracza 1 cm (66). W badaniu przeprowadzonym przez Gynecologic Oncology Group wykazano, że u pacjentek u których zastosowano chemioterapię z paklitakselem i cisplatyną, po zabiegu cytoredukcyjnym, u których choroba resztkowa była nie większa niż 1 cm, średni czas do wznowy procesu nowotworowego wyniósł 22 miesiące, a średnie całkowite przeżycie (OS - overall survival, średnie całkowite przeżycie) wyniosło 52 miesiące. U pacjentek, u których podczas pierwotnego zabiegu chirurgicznego pozostawiono resztki guza > 1 cm, średni czas do wznowy wyniósł 14 miesięcy, a średnie OS wyniosło 26 miesięcy (67).

Ważnym czynnikiem rokowniczym podczas pierwotnego zabiegu operacyjnego jest stan torebki guza nowotworowego. Wykazano, że pęknięcie torebki guza jajnika podczas zabiegu jest czynnikiem prognostycznym co do czasu wystąpienia wznowy procesu nowotworowego.Vergote i wsp. wykazali, że u pacjentek u których nie doszło do pęknięcia torebki guza odsetek pacjentek z pięcioletnim przeżyciem, był znacząco większy (83,3%) niż pacjentek, u których doszło do przerwania ciągłości torebki (70,2%) (68).

2.4.7 Wodobrzusze

Niezależnym czynnikiem prognostycznym jest obecność wysięku otrzewnowego podczas rozpoznania raka jajnika. Średnie przeżycia u pacjentek z wodobrzuszem wynoszą:

- chore bez wysięku – 56% przeżywa 5 lat
- chore z wysiękiem – 22% przeżywa 5 lat

U pacjentek z wodobrzuszem w III i IV stopniu zaawansowania klinicznego wg FIGO, odsetek pięcioletnich przeżyć wynosi 5%, a u pacjentek bez wodobrzusza w tych samych stopniach zaawansowania, odsetek wynosi 14-45%. Obecność płynu w jamie otrzewnej zmniejsza również skuteczność stosowanej chemioterapii (69).

2.5 Diagnostyka raka jajnika

2.5.1 Badania przesiewowe

Największą przeszkodą we wczesnym wykrywaniu raka jajnika jest brak skutecznej metody screeningowej. Pomimo, że USG przezpochwowe (USG TV) charakteryzuje wysoka czułość w wykrywaniu guzów jajnika to wartość predykcyjna w wykrywaniu wczesnych raków jajnika (PPV – positive predictive value, wartość predykcyjna) jest niska (70). Rutynowe coroczne badanie USG TV oraz oznaczanie stężenia markera CA125 nie zmniejszają umieralności z powodu raka jajnika. Taki sposób postępowania wprowadza znaczny niepokój wśród pacjentek ze względu na dużą ilość wyników fałszywie dodatnich i naraża kobiety na niepotrzebne dodatkowe procedury chirurgiczne.

2.5.2 Badania obrazowe

Głównym badaniem jest badanie ultrasonograficzne, które służy do oceny charakteru zmian w przydatkach.

Timmerman i wsp. stworzyli prosty system oceny obrazów usg, na podstawie których można zakwalifikować guzy jako łagodne (B-rules, benign) lub złośliwe (M-rules, malignant).

Kryteria rozpoznania zmian łagodnych (*B-rules, benign*):

1. Jednokomorowa zmiana cystyczna
2. Nieobecność litych komponentów lub ich obecność nie przekraczająca 7 cm
3. Cień akustyczny za guzem
4. Równa powierzchnia wewnętrzna zmiany w przypadku zmian wielkokomorowych mniejszych niż 100 mm
5. Brak unaczynienia w badaniu dopplerowskim

Kryteria rozpoznania zmian złośliwych (M-rules, *malignant*):

1. Nieregularna w obrysie zmiana
2. Obecność wodobrzusza
3. Minimum 4 struktury wewnątrz światła torbieli
4. Nieregularna torbiel wielokomorowa o wymiarze > 100 mm
5. Silne unaczynienie potwierdzone badaniem dopplerowskim

Czułość i swoistość tej metody opartej na badaniach International Ovarian Tumor Analisis (IOTA) wynoszą odpowiednio 95% i 91% (71).

Do oceny zaawansowania procesu nowotworowego, monitorowania leczenia i wykrywania wznowy służą również: tomografia komputerowa (TK), obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (MR) i obrazowanie pozytronową tomografią emisyjną (PET-KT). Badanie PET-KT charakteryzuje się wysoką czułością w wykrywaniu zmian przerzutowych przy prawidłowym poziomie CA125 (72).

3. MARKERY NOWOTWOROWE I ICH ZNACZENIE W DIAGNOSTYCE ENDOMETRIOZY I RAKA JAJNIKA

3.1 Marker CA125 – antygen nowotworowy CA125

Antygen nowotworowy 125 (CA125)/ (MUC16) jest najdokładniej przebadanym i najczęściej wykorzystywanym markerem w diagnostyce serologicznej nowotworów jajnika (73). Jego czułość wynosi (78-85,5%) przy swoistości (78,3-93%) (74). W zaawansowanym stadium choroby ponad 80% pacjentek prezentuje jego podwyższony poziom w przypadku raków surowiczych i ok. 30% w przypadku raków jajnika endometrialnych, jasnokomórkowych, niskozrożnicowanych i śluzowych (75).

Mimo że antygen CA125 uważany jest za biomarker nowotworowy wykorzystywany w diagnostyce raka jajnika, to jest to antygen obecny również w innych tkankach organizmu. Występuje m.in. w endometrium, płynie owodniowym, w nabłonku jajowodów czy kanale szyjki macicy. Datego też oznaczając stężenie CA125 można wspomagać diagnostykę innych chorób nowotworowych, np. **raka trzustki, płuc czy raka żołądka**.

Nieznacznie wyższe stężenie CA125 możemy zaobserwować w niezłośliwych zmianach, takich jak:

- **stan zapalny jajowodu,**
- **mięśniaki macicy,**
- **endometrioza,**
- **zapalenie osierdzia.**

CA125 jest kodowany przez gen MUC16 umiejscowiony na krótkim ramieniu chromosomu 19 (76). CA125 jest O-glikozylowaną glikoproteiną, co warunkuje jej hydrofilowe właściwości (77,78). CA125 jest dużą cząsteczką (powyżej 1000 kDa), związaną z błoną komórkową, zbudowaną z trzech różnych domen. Składa się z krótkiego końca cytoplazmatycznego, domeny transbłonowej oraz długiej glikozylowanej domeny zewnątrzkomórkowej. Zewnątrzkomórkowy region MUC16 zostaje uwolniony z powierzchni komórki w wyniku jej proteolitycznego rozszczepienia i stąd obserwujemy podwyższony poziom CA125 w surowicy w wyniku procesu chorobotwórczego (81).

CA125 działa na komórki układu immunologicznego, przez co limfocyty NK i monocyty nie są w stanie rozpoznać i zniszczyć komórek nowotworowych. Dodatkowo białko CA125 bierze udział w ścieżce sygnałowej promującej proliferację komórek i w mechanizmie przerzutowania (79,80).

Stężenie CA125 w surowicy krwi lub osoczu pacjentek ze złośliwym guzem jajnika jest wielokrotnie wyższa niż w próbkach zdrowych dawczyń. Wartość stężenia CA125 jest zwykle wyrażana w jednostkach aktywności (U/ml) (82) a wartość odcięcia markera CA125 została ustalona na poziomie 35 U/ml. Większą swoistość dla zmian

nowotworowych określa się dla wartości powyżej 65 U/ml (u kobiet przed menopauzą).

Zmienna specyficzność markera uzależniona jest od typu histopatologicznego nowotworu z najwyższymi wartościami dla raka surowiczego, niskozróżnicowanego, jasnokomórkowego i endometrioidalnego. CA125 jest uważany za najlepszy marker dla nieśluzowych raków jajnika (64). Wykazano obniżanie się stężenia markera CA125 w surowicy krwi po operacyjnym zmniejszeniu masy guza (83). Tydzień po radykalnej operacji stężenie markera obniża się średnio o 51% wartości przed operacją, a po 6 - 30 tygodniach do wartości ok. 9%.

Oznaczanie stężenia CA125 stosuje się również w monitorowaniu skuteczności chemioterapii. O dobrej odpowiedzi na leczenie świadczy obniżenie stężenia markera CA125 po drugim cyklu chemioterapii. Progresję choroby przepowiada utrzymywanie się stężenia przed trzecim cyklem (84). Ważnym problemem klinicznym w monitorowaniu pacjentek z rakiem jajnika jest wczesne rozpoznanie wznowy choroby. Regularne oznaczanie stężenia CA125 jest przydatnym narzędziem diagnostycznym. U ok. 70% pacjentek wzrost stężenia markera jest właśnie pierwszym objawem wznowy procesu nowotworowego, która serologiczne może wyprzedzać wznowę kliniczną o 0,5 do 24 miesięcy (85,86).

Dostępne są trzy metody analityczne oznaczania markera CA125:

- *elektrochemiluminescencja (ECLIA*),
- *immunotest chemiluminescencji Abbot Architect* (Architect i2000),
- *enzymatyczny test immunoabsorbcyjny (ELISA).*

3.2 HE4 - human epididymis protein 4

Równie ważnym markerem surowiczym co marker CA125 jest glikoproteina HE4. HE4 to ludzkie białko komórek nabłonkowych najądrza, znane również jako WFDC2 (87). HE4 jest to białko, zbudowane z pojedynczego łańcucha peptydowego o masie cząsteczkowej około 25 kD, które należy do rodziny kwaśnych białek o rdzeniu cztero - dwusiarczkowym (WFDC) (88,89,90,91).

Białko kodowane jest przez gen WFDC2 znajdujący się na długim ramieniu chromosomu 20. HE4 stymuluje proliferację komórek nowotworu, promuje adhezję komórek nowotworowych, hamuje apoptozę, powoduje oporność na chemioterapię oraz wpływa na przejście komórki z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego.

Początkowo ekspresję HE4 określano jako swoistą dla najądrza. Dalsze badania pokazały, że wykazuje on również niską ekspresję w nabłonkach układu oddechowego i rozrodczego (92,93) a wysoką ekspresję w tkance raka jajnika i w surowicy pacjentek z rakiem jajnika (94,95). Najwyższe stężenia HE4 stwierdzono w raku nabłonkowym jajnika. Jako pojedynczy marker HE4 ma wysoką czułość w wykrywaniu raka jajnika w I stopniu zaawansowania choroby, szczególnie w jego bezobjawowym stadium. W połączeniu z oznaczaniem CA125 pomaga ocenić charakter guza w miednicy małej (94). Połączenie tych dwóch pomiarów jest dokładniejszym czynnikiem predykcyjnym niż zastosowanie każdego z nich osobno. Oznaczając HE4 rzadziej obserwujemy nieprawidłowości niż przy pomiarach CA125 w ocenie łagodnych chorób jajników.

Huhtinen i wsp. określili jego czułość na 78,6% a swoistość na 95% przy różnicowaniu raka jajnika od cysty endometrialnej (95). Moore i wsp. podali, że połączenie oznaczenia CA125 i HE4 w tzw. algorytmie ROMA (Risk of Ovarian

Malignancy Algorithm) ma 94% dokładność w rozróżnianiu złośliwych od niezłośliwych guzów miednicy (96).

Test ROMA jest odzwierciedleniem otrzymanego z równań algorytmu matematycznego wskaźnika prawdopodobieństwa wykrycia raka jajnika. Wyliczany jest on oddzielnie dla pacjentek przed i po menopauzie.

Kobiety przed menopauzą

- Wartość ROMA ≥ 11,4% uznawana jest za zwiększone ryzyko wystąpienia raka jajnika
- Wartość ROMA < 11,4% uznawana jest za niskie ryzyko wystąpienia raka jajnika

Kobiety po menopauzie

- Wartość ROMA ≥ 29,9% uznawana jest za zwiększone ryzyko wystąpienia raka jajnika
- Wartość ROMA < 29% uznawana jest za niskie ryzyko wystąpienia raka jajnika

Wielkości te odnoszą się wyłącznie do oznaczeń wykonanych w aparacie Cobas i mogą być różne w przypadkach innych systemów.

Stężenie HE4 koreluje także z odpowiedzią kliniczną na leczenie i wyprzedza nawrót choroby nowotworowej widoczny w badaniach obrazowych. Dlatego może być istotnym wskaźnikiem wznowy procesu nowotworowego (97).

HE4 jest oznaczane za pomocą elektrochemicznego testu immunologicznego typu sandwich lub przy użyciu testów elektrochemiluminescencyjnych (98).

Przydatność oznaczeń białka HE4 w diagnostyce chorób nowotworowych poza rakiem jajnika nie została dobrze udokumentowana.

3.3 Interleukina 6 (IL-6)

Interleukiny są białkami z grupy cytokin. Interleukiny działają wielokierunkowo, m. in. biorą udział w procesie komunikacji pomiędzy komórkami układu immunologicznego i procesach krwiotwórczych. Leukocyty ale również fibroblasty czy komórki tłuszczowe produkują interleukiny.

Interleukina 6 (IL-6) jest cytokiną wydzielaną głównie przez aktywowane limfocyty T, makrofagi, neutrofie i komórki NK (natural kilers) pod wpływem czynników stymulujących i prozapalnych. IL-6 stymuluje produkcję innych cytokin i działa jako białko ostrej fazy, reguluje odpowiedź immunologiczną, poprzez aktywację limfocytów T i pobudzenie różnicowania limfocytów B. Reguluje metabolizm, hematopoezę i stymuluję profilerację fibroblastów. IL-6 w sposób bezpośredni silnie pobudza procesy zapalne, przez co stymuluje podziały komórek nabłonka endometrium oraz endometrialnej puli limfocytów. Wysokie stężenie tej cytokiny może jednak ograniczać rozwój stanu zapalnego na zasadzie mechanizmu hamowania zwrotnego.

Ludzki gen kodujący interleukinę 6 znajduje się na chromosomie 7 (7p21) (99,100). IL-6 ma masę molekularną 21-28 kDa w zależności od modyfikacji posttranslacyjnych w których powstaje łańcuch białkowy, zbudowany ze 184 aminokwasów (101). Regulacja ekspresji IL-6 jest bardzo złożona, odbywa się na kilku głównych poziomach: poprzez regulację poziomu transkrypcji, regulację translacji, regulację wydzielania. Liczne mechanizmy regulacji efektu biologicznego wywieranego

przez tę cytokinę związane są z obecnością rozpuszczalnych receptorów w płynach ustrojowych, z wiązaniem krążącej IL-6 z przeciwciałami anty-IL-6 i anty-IL-6R oraz z tempem jej eliminacji z krążenia.

4. STANDARDOWE METODY OZNACZANIA MARKERÓW NOWOTWOROWYCH

4.1 Testy ELISA

Test ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) jest to jeden z najczęściej wykorzystywanych testów diagnostycznych. Znajduje zastosowanie w badaniach i diagnostyce medycznej, a także w kontroli jakości procesów produkcyjnych. Nazwa ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) pochodzi od części „enzymatycznej" i „immunoabsorpcyjnej".

Testy ELISA są często stosowane do wykrywania i pomiaru obecności specyficznych przeciwciał lub antygenów o charakterze białkowym we krwi (102).

Pomimo, że metoda ta istnieje od ponad 40 lat, nadal używana jest w codziennej praktyce medycznej. Po raz pierwszy została opisana w 1971 r. przez Evę Engvall i Petera Perlmanna, którzy wykorzystali przeciwciała znakowane enzymem do ilościowego oznaczania immunoglobulin klasy IgG (103).

Zasada oznaczeń polega na tworzeniu wiązań pomiędzy antygenem a przeciwciałem i odczytywana jest w postaci barwnej reakcji, której zajście możliwe jest dzięki skoniugowanym z immunoglobulinami enzymom i odpowiednich dla nich substratom. Ilość powstałych wiązań warunkuje natężenie barwy i mierzone jest

najczęściej kolorymetrycznie przy użyciu spektrofotometru. Wyróżniamy cztery warianty testu ELISA.

Dwie najważniejsze odmiany testu to:

- test bezpośredni *(ang. direct ELISA)*
- test pośredni *(ang. indirect ELISA)* (104).

Dodatkowo wyróżniamy metodę: „kanapkową" *(ang. sandwich ELISA),* która dzieli się na metodę kanapkową bezpośrednią i pośrednią oraz metodę konkurencyjną *(ang. competitive ELISA)*(105).

Do pomiaru stężenia antygenu służą odmiany: kanapkowa oraz kompetytywna, natomiast w celu ilościowego oznaczania przeciwciał powinno się przeprowadzać test bezpośredni lub pośredni (106).

4.1.1 Test ELISA bezpośredni

Bezpośredni test ELISA jest dedykowany do wykrycia przeciwciał obecnych w surowicy przeciw określonym antygenom, najczęściej drobnoustroju. Test ten jest najszybszym i najprostszym testem. Płytkę powleka się antygenem i przeprowadza się inkubację z przeciwciałem pierwszorzędowym, sprzężonym z enzymem. Po dodaniu odpowiedniego substratu, enzym zawarty w koniugacie katalizuje reakcję, której produkt wykrywa się spektrofotometrycznie. Intensywność reakcji barwnej jest proporcjonalna do stężenia przeciwciał związanych do antygenów w badanych próbkach (107,108). W teście bezpośrednim nie używa się przeciwciał drugorzędowych, co eliminuje ryzyko wystąpienia reakcji krzyżowych (109). Przy jego użyciu można wykrywać i oznaczać ilościowo prawie każdy analit, od niskich stężeń w pikogramach do wysokich stężeń w nanogramach na mililitr.

Test ten ma jednak swoją wadę, którą jest niska dostępność na rynku przeciwciał znakowanych danym enzymem swoistym dla danego antygenu. W praktyce możliwa jest samodzielna preparatyka takich koniugatów ale jest ona bardzo czasochłonna.

4.1.2 Test ELISA pośredni

Pośredni test ELISA to metoda w której używa się dwóch rodzajów przeciwciał: pierwszorzędowych, skierowanych przeciw badanemu antygenowi oraz drugorzędowych, sprzężonych z enzymem i skierowanych przeciwko przeciwciału pierwszorzędowemu (110). Znakowane przeciwciała nie muszą być więc specyficzne względem antygenu, a jedynie względem przeciwciał pierwszorzędowych. To powoduje, że mogą być wykorzystywane do badań nad wieloma różnymi analitami. Test pośredni charakteryzuje się przez to większą czułością aniżeli test bezpośredni ale jest przez to dużo bardziej czasochłonny. Zarówno testu bezpośredniego, jak i pośredniego najczęściej używa się do oznaczania ilości przeciwciał i badania intensywności odpowiedzi immunologicznej na różnego typu antygeny.

4.1.3 Test podwójnego wiązania – „kanapkowy sandwich”

Test ELISA „kanapkowy”, wykorzystuje przeciwciała do wiązania i wychwytywania pokrewnego im antygenu. Te przeciwciała są następnie wykrywane w próbce przez przeciwciało znakowane enzymem, który ma zdolność reagowania z substratem i wytwarza widzialny sygnał świetny, najczęściej mierzony przy pomocy spektrofotometru.

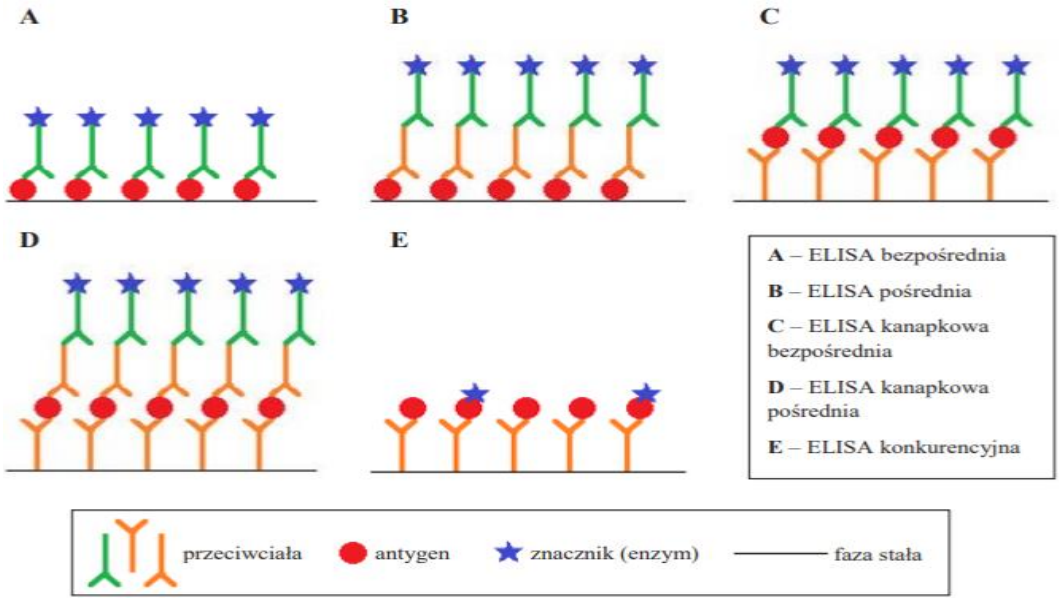
Test rozpoczyna się od opłaszczenia fazy stałej warstwą przeciwciał pierwszorzędowych. Następnie dodaję się próbę badaną, spośród której wychwytywane

są tylko te białka, przeciw którym skierowane są unieruchomione immunoglobuliny (111). W kolejnym etapie można zastosować wariant bezpośredni lub wariant pośredni, w którym dodatkowo używa się warstwy detekcyjnych przeciwciał pierwszorzędowych skierowanych przeciw oznaczanemu antygenowi. Przeciwciała te są specyficzne wobec danego antygenu ale rozpoznają inny rejon cząsteczki białkowej i dzięki temu nie blokują przeciwciała znakowanego enzymem. Zwykle stosowane są tu związki, które w wyniku reakcji przechodzą w barwny produkt i stosując pomiar w spektofotometrze określane jest stężenie antygenu w danym materiale. Test ten znajduje szerokie zastosowanie do wykrywania i ilościowego oznaczania białek z dużą ilością epitopów, takich jak cytokiny (106). Odmiana pośrednia, „sandwich" ELISA, jest uznawana za najczulszą i najbardziej specyficzną, ale jednocześnie najbardziej pracochłonną.

4.1.4 Test ELISA – metoda konkurencyjna (kompetytywna)

W przeciwieństwie do pozostałych wariantów, w tym teście stosuje się znakowane antygeny lub przeciwciała w zależności od rodzaju badanego materiału biologicznego. Uzyskany sygnał zależny jest więc od proporcji obu rodzajów konkurujących ze sobą cząsteczek i jest tym większy, im mniejsze jest stężenie antygenów lub przeciwciał znajdujących się w badanym materiale. Wariant kompetytywny stosowany jest do ilościowego oznaczania małych cząsteczek, które nie zwiążą się jednocześnie z dwoma rodzajami przeciwciał. Wykorzystuje się go do wykrywania i ilościowego oznaczania małych ilości substratu np. przy kontroli antydopingowej lub metabolitów leków, używek czy suplementów (106,107).

Testy ELISA są wykorzystywane do oznaczania markerów nowotworowych m.in. CA125, HE4, CEA, IL-6, CA72-4, AFP czy PSA.



Rycina 1. Schemat – odmiany testu ELISA

4.2 Inne metody immunoenzymatyczne

Metody immunoenzymatyczne (EIA), to metody, które wymagają zastosowania antygenu lub przeciwciała, które sprzęga się z enzymem. Otrzymany produkt reakcji jest produktem barwnym, gdzie do odczytu natężenia wykorzystuje się metody spektrofotometryczne (112).

Najczęściej stosowanymi enzymami w metodzie immunoenzymatycznej są:

- fosfataza alkaliczna AP (substrat p-nirofenylofosforan [p-NPP])
- peroksydaza chrzanowa HRP (substrat o-fenylenodiamina [OPD])

Do metod immunoenzymatycznych zaliczamy:

4.2.1 Metoda chemiluminescencyjna (CLIA)

Chemiluminescencyjny test immunologiczny (CLIA) – to analityczny test chemiczny, który wykorzystuje reakcję chemiczną do wytworzenia światła widzialnego. Chemiluminescencyjne testy immunologiczne to szybkie, czułe i specyficzne testy do diagnozowania różnych chorób. Testy te służą do ilościowego oznaczania stężeń w surowicy i osoczu hormonów, leków, markerów nowotworowych (takich jak CEA, cytokeratyna 19, SCC), markerów chorób zakaźnych, markerów uszkodzenia mięśnia sercowego czy autoprzeciwciał (113,114).

Zestawy do CLIA są w stanie wykrywać reakcje chemiluminescencji oparte na wzbudzeniu promieniowania widzialnego lub prawie widzialnego (k = 300–800 nm). Reakcja jest generowana, gdy elektron przechodzi ze stanu wzbudzonego do stanu podstawowego. Energia potencjalna w atomie jest uwolniona w postaci światła. W spektrofotometrii luminescencja ma przewagę nad absorbancją, ponieważ pierwsza jest miarą bezwzględną, podczas gdy druga jest względna. Metody chemiluminescencyjne możemy podzielić na te bezpośrednie z użyciem markerów luminoforowych lub pośrednie z użyciem markerów enzymatycznych.

4.2.2 Metoda elektrochemiluminescencyjna (ECLIA)

W metodzie elektrochemiluminescencyjnej (ECLIA) sygnałem analitycznym jest impuls światła wyzwalany przez impuls elektryczny. Impuls światła powstaje w wyniku mechanizmu chemiluminescencyjnego. Metoda elektrochemiluminescencji ECLIA przeznaczona jest do stosowania w odpowiednich analizatorach Elecsys i COBAS E.

Zasada pomiaru opiera się na technice „testu sandwich”. Dokonuje się inkubacji próbki osocza, podczas której tworzy się kompleks immunologiczny typu „kanapkowego” z biotynylowanymi monoklonalnymi swoistymi przeciwciałami dla danego markera nowotworowego, znakowanymi kompleksem rutenu. Po dodaniu mikrocząsteczek opłaszczonych streptawidyną, kompleks wiąże się z faza stałą dzięki powinowactwu biotyny i streptawidyny. Taka mieszanina reakcyjna przenoszona jest do komory pomiarowej, gdzie mikrocząsteczki przyciągane są do powierzchni elektrody za pomocą magnesu. Niezwiązane cząsteczki usuwane są za pomocą ProCell/Procell M. Napięcie przyłożone do elektrody indukuje reakcję elektrochemiluminescencji i emisję fotonu, która mierzona jest za pomocą fotopowielacza. Wyniki odczytywane są z krzywej kalibracyjnej przygotowanej dla danego analizatora w oparciu o kalibrację 2 punktową oraz krzywą wzorcową zawartą w urządzeniu. Za pomocą tego testu w standardowych laboratoriach diagnostycznych oznaczany jest m.in. marker CA125, HE4, IL-6 (Elecsys HE4 – modular analytics E170) (115,116).

4.2.3 Metody immunofluorescencyjne

W metodzie immunofluorescencyjnej (FIA)) możemy wyróżnić dwie odmiany testu immunofluorescencyjnego: pośrednią i bezpośrednią.

W przypadku tych metod stosuje się dwa rodzaje znaczników: fluorofory, które są bezpośrednio przyłączone do antygenu i enzymy, których aktywność oznacza się za pomocą produktu końcowego reakcji powodującego fluorescencje (117).

Metoda immunofluorescencji pośredniej (ang. indirect immunofluorescence – IIF) jest podstawową techniką immunopatologiczną służącą do wykrywania w surowicach pacjentów krążących autoprzeciwciał. Metoda IIF jest badaniem zarówno

jakościowym jak i ilościowym, ponieważ reakcje przeprowadza się używając wielu rozcieńczeń badanych surowic (1 : 10, 1 : 20 itd.). Służy do wykrywania przeciwciał: pęcherzycowych, przeciwciał skierowanych przeciwko błonie podstawnej, przeciwciał przeciwjądrowych (ang. antinuclear antibody – ANA).

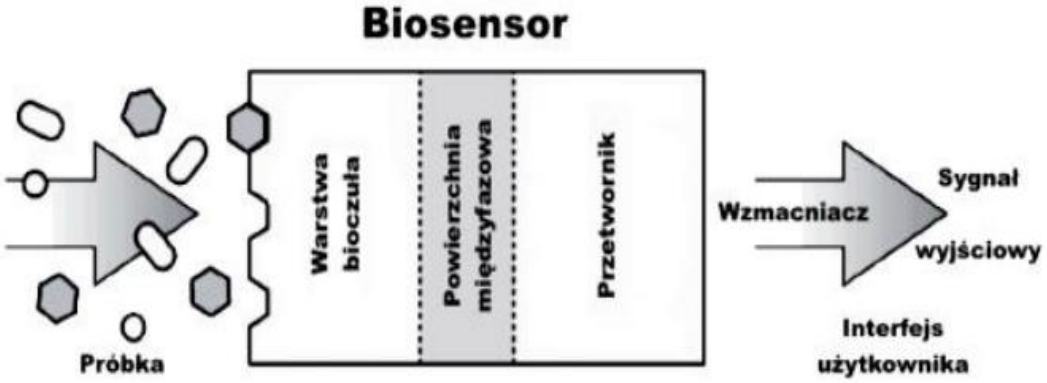
Reakcja bezpośrednia jest dużo rzadziej wykorzystywana w diagnostyce klinicznej laboratoryjnej. Techniką tą możemy oznaczyć takie antygeny jak antygen CD20 oraz HER2 (118,119).

5. TYPY BIOSENSORÓW

Biosensory zgodnie z przyjętą przez Międzynarodową Unię Chemii Czystej i Stosowanej (ang. International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) definicją, *„to samowystarczalne, zintegrowane urządzenia, które dostarczają specyficznych ilościowych lub półilościowych informacji analitycznych, za pomocą składników umieszczonych w bezpośrednim kontakcie z elementem przetwarzającym”* (120). Wykorzystują one reakcje biochemiczne do oznaczania określonych związków chemicznych, za pomocą sygnałów optycznych, elektrycznych lub termicznych (121,122). Pierwszym w historii biosensorem była elektroda tlenowa opracowana w drugiej połowie XX w. przez C. Clarka Jr. (123). Był to pierwszy biosensor enzymatyczny wykorzystywany do oznaczania steżenia glukozy. Od tego czasu ilość zastosowań biosensorów rośnie w dużym tempie. O rosnącym zainteresowaniu tą metodą świadczy też liczba publikacji w tym temacie – na przestrzeni ostatnich 20 lat wzrosła niemalże 10 - krotnie zgodnie z danymi *pubmed.gov*.

Stosowanie biosensorów ma wiele zalet w stosunku do metod standardowych. Najważniejszą z nich jest to, że badanie prowadzone jest w czasie rzeczywistym, dlatego łatwo je dopasować do potrzeb. Ponadto jest to metoda szybka, w pełni zautomatyzowana i pozwalająca w niektórych wypadkach na analizę kilku substancji jednocześnie.

Działanie biosensora polega na specyficznym rozpoznawaniu badanego analitu będącego w styczności z sensorem fizycznym lub chemicznym. Czujniki biologiczne składają się z trzech podstawowych elementów: detektora, przetwornika sygnału oraz elementu biologicznego (czujnika), którym najczęściej są: enzymy, przeciwciała, naturalne receptory, mikroorganizmy, DNA lub RNA a obecnie również aptamery.



Rycina 2. Schematyczna budowa biosensora (124)

Właśnie ze względu na te poszczególne składowe, biosensory są najczęściej klasyfikowane albo ze względu na metodę przetwarzania sygnału biologicznego albo na zastosowany biologiczny element wykrywający (125).

Biosensory ze względu na użyty element biologiczny możemy podzielić na:

- biosensory enzymatyczne;
- immunosensory;
- biosensory wykorzystujące kwasy nukleinowe;
- translacyjne biosensory;
- biosensory wykorzystujące wirusy;
- nanobiosensory.

Natomiast ze względu na rodzaj przekazywania sygnału, biosensory dzieli się na:

- elektrochemiczne;
- akustyczne;
- termiczno/kalorymetryczne;
- optyczne.

6. UZASADNIENIE PODJĘCIA BADAŃ I CELE PRACY

Automatyzacja, miniaturyzacja, nowe technologie to ciągle aktualne wyzwania współczesnej medycyny, gwarantujące stały postęp. W ostatnich latach obserwuje się rozwój nowoczesnych metod wykorzystujących czujniki, które są kombinacją biologicznie czułego i selektywnego składnika z fizykochemicznym detektorem. Określane są terminem biosensorów. Biosensory cechują się dużą selektywnością i powinowactwem względem badanych cząsteczek, umożliwiają między innymi rozwój metod analitycznych, przydatnych we współczesnej diagnostyce medycznej.

Tym bardziej, że nowoczesna medycyna coraz powszechniej operuje pojęciem biomarkera – biologicznie aktywnej cząsteczki, związanej, a często odpowiedzialnej za określone zmiany patologiczne w organizmie człowieka.

Z powyższych względów celem badań przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej była:

1. Ocena przydatności techniki Powierzchniowego Rezonansu Plazmonów w wersji Imaging (SPRI) do oznaczeń IL-6, antygenów CA125 i HE4 w raku jajnika i endometriozie.
2. Porównanie uzyskanych nową metodą wyników z dostępnymi komercyjnie metodami oznaczeń IL-6 i antygenów CA125 i HE4.
3. Wykazanie możliwości potencjalnego zastosowania metody SPRI do oznaczeń IL-6, antygenu CA125 i HE4 w rutynowej diagnostyce laboratoryjnej.

7. METODYKA BADAŃ

7.1 Odczynniki

W trakcie wykonywania badań opisywanych w rozprawie doktorskiej wykorzystane zostały odczynniki:

Białko interleukina 6 (IL-6) Abcam plc, Cambridge, USA; ludzkie białko epiderialne 4 (HE4) Abcam plc, Cambridge, USA; glikoproteina antygenowa, marker (CA 125/MUC 16) SIGMA, Steinheim, Niemcy; albumina ludzka (z osocza) Calbiochem; mysie monoklonalne przeciwciało specyficzne na marker IL-6 Abcam plc, Cambridge, USA; królicze poliklonalne przeciwciało specyficzne na marker HE4 Abcam plc, Cambridge, USA; królicze poliklonalne przeciwciało specyficzne na marker CA 125 SIGMA, Steinheim, Niemcy; 1-hydroksy-2,5-pirydynodion (NHS) ALDRICH, Munich, Niemcy; 2-aminoetanotiol (cysteamina) SIGMA, Steinheim, Niemcy; chlorowodorek 1-etylo-3 (3-dimetyloaminopropylo) karbodimid (EDC) SIGMA, Steinheim, Niemcy; etanol bezwodny 99,9% POCh Gliwice; eter polimeru glikolu polietylenowego (PEG) i p-tert-oktylofenolu (Triton X-100) SIGMA, Steinheim, Niemcy; buforowana fosforanem sól fizjologiczna (PBS), POCh Gliwice; bufor węglanowy o pH=8,5.

7.2 Sprzęt

W czasie prowadzenia pomiarów korzystano z następującej aparatury pomiarowej:

- Zestaw aparatury SPR Imaging (Pracownia Bioanalizy, Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku)

W jego skład wchodzi:

- laser,
- układ soczewek i polaryzatorów;
- ramię z pryzmatem;
- kamera CCD;
- rejestrator

Rycina 3. Stanowisko do pomiarów SPRI

7.3 Materiał i metody

Materiał stanowiła krew pobrana od dwóch grup pacjentek:

- Grupa badana:

- pacjentki operowane z powodu endometriozy (25) i raka jajnika (7) w Klinice Ginekologii i Ginekologii Onkologicznej UMB.

Od pacjentek operowanych pobierano 2 ml krwi pełnej w następujących odstępach czasowych:

A – przed operacją

B – 6 godz. po operacji

C – 24 godz. po operacji

Około 2 ml krwi wirowano przez 15 min w wirówce z prędkością 2500 obrotów/min. Uzyskaną surowicę zamrażano w temp. -70 st. C i następnie wykorzystywano do dalszych badań.

- Grupa kontrolna:

- krew zdrowych kobiet (18), bez stwierdzonych patologii w narządzie rodnym, uzyskana w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Białymstoku.

Około 2 ml krwi pobierano i wirowano przez 15 min w wirówce z prędkością 2500 obrotów/min. Następnie trzykrotnie sączono przez sączek bibułowy o średniej gęstości. Rozcieńczono 2-krotnie wodą redestylowaną i poddano pomiarom.

Surowica pochodząca od pacjentek z rakiem jajnika i torbielą endometrialną była odpowiednio rozcieńczona 2, 5 lub 10- krotnie roztworem PBS utrzymując pH=7,4 w zależności od rodzaju oznaczanego markera nowotworowego.

Pacjentki objęte badaniem wyraziły świadomą zgodę na pobranie krwi przed i po zabiegu usunięcia torbieli lub guza jajnika. Badanie uzyskało akceptację Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (uchwała nr: R-I-002/33/2019)

Metoda badań laboratoryjnych oznaczania CA125 i HE4

Marker CA125 był oznaczany standardowym testem Architect CA125, marker HE4 i IL-6 testem standardowym Elecsys na analizatorze COBAS E-411.

Powyższe markery i cytokina bedą porównane z oznaczeniami wykonanymi metodą SPRI.

Metoda pomiaru Powierzchniowego Rezonansu Plazmonów w wersji Imaging (SPRI)

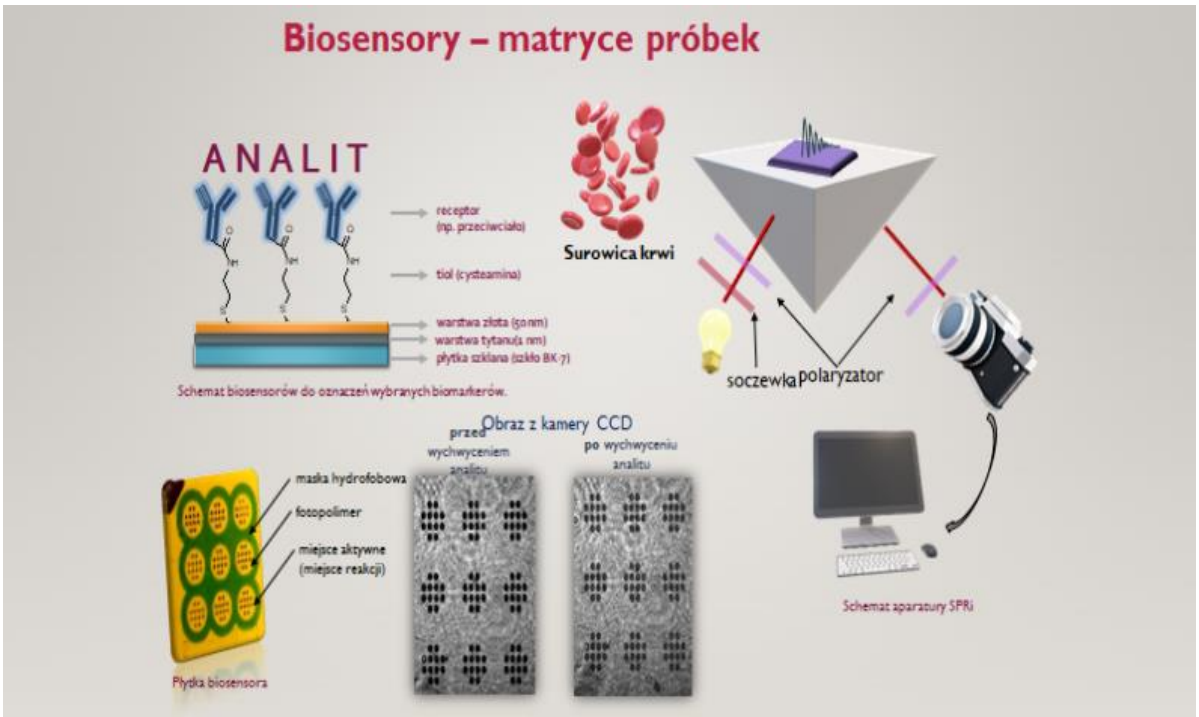
Technika SPR i SPRI wykorzystuje zjawisko całkowitego wewnętrznego odbicia światła monochromatycznego, p - spolaryzowanego, mające miejsce na pokrytej złotem powierzchni biosensora. Efekt SPR można zaobserwować po umieszczeniu cienkiej warstwy metalicznej między dwoma ośrodkami różniącymi się między sobą gęstością optyczną (np. szkło/woda, szkło/powietrze). W sieci krystalicznej metalu występuje gaz elektronowy i gdy na bioczujnik pada światło o odpowiedniej częstotliwości dochodzi do wzbudzenia plazmonów czyli quasi-cząsteczek obecnych w warstewce złota, które rezonansowo pochłaniają energię fali padającej. Pomiar polega na pomiarze intensywności światła odbitego, która zależy od kąta SPR. Ten z kolei zmienia się w zależności od ilości związanych molekuł, które powodują zmianę współczynnika załamania w pobliżu powierzchni sensora. Istnieje liniowa zależność między ilością związanych cząsteczek, a przesunięciem kąta SPR co pozwala na ilościowe oznaczanie biomolekuł z wykorzystaniem odpowiedniego elementu bio-rozpoznającego.

Jako bio-rozpoznający element bioczujnika wykorzystuje się przeciwciała oraz naturalne i syntetyczne inhibitory. Technika ta nie wymaga stosowania znaczników (label free method) dzięki czemu nie zostaje naruszona struktura biomolekuł i nie tracą one swych właściwości.

Technika SPRI różni się od klasycznej SPR tym, że eliminuje złożoność skanowania kąta padania promieniowania. W wyniku pomiaru uzyskuje się zdjęcie różniące się intensywnością pól pomiarowych, które poddawane jest dalszej analizie.

Wysoka czułość metody, niski poziom wykrywalności i oznaczalności daje możliwość oznaczania stężeń rzędu µg/ml (10^{-6}g/ml) czy też ng/ml (10^{-9}g/ml) przy odchyleniu ± 1% (2%). Są to ilości często około 1000 razy mniejsze niż otrzymywane technikami standardowo wykorzystywanymi w laboratoriach diagnostycznych. Do analizy potrzebne są niewielkie ilości próbek (rzędu kilku µl), co nie jest uciążliwe dla pacjentów. Biosensor SPRI umożliwia jednoczesny pomiar wielu próbek w przeciwieństwie do metod stosowanych komercyjnie.

Schematyczna budowę biosensorów SPRI oraz schemat pomiaru przedstawia rycina 4.



Rycina 4. Schematyczna budowa biosensorów SPRI oraz schemat pomiaru.

Ze względu na wykorzystanie matrycy biosensorów można oznaczyć jednocześnie 9 niezależnych próbek.

7.4 Statystyka

Do analizy rozkładu danych zastosowano test W Shapiro–Wilka. Dane o rozkładzie normalnym zostały przeanalizowane przy użyciu jednokierunkowej analizy wariancji (ANOVA) i pokazane jako średnia ± SD. Dane o rozkładzie nienormalnym przedstawiono jako medianę i przeanalizowano za pomocą nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa. Korelacje zostały przeanalizowane za pomocą analizy korelacji Pearson (rozkład normalny) lub Spearman's Rank (rozkład nienormalny). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism 7.4 (GraphPad Prism 7,04 Software, USA). Różnice uznano za istotne statystycznie, gdy $p<0,05$.

8. WYNIKI

W przeprowadzonych badaniach dokonano oceny stężeń CA125, HE4 i interleukiny 6 (IL-6) u pacjentek z torbielami endometrialnymi i rakiem jajnika za pomocą biosensora SPRI. Porównano je ze stężeniami oznaczonymi u zdrowych kobiet. Dokonano następnie korelacji uzyskanych stężeń ze stężeniami oznaczanymi przy pomocy standardowej, komercyjnej metody.

Analizie poddano surowicę pacjentek (n=25) ze zdiagnozowaną torbielą endometrialną. Próbki podzielono na 3 grupy w zależności od czasu przed i po wykonaniu zabiegu operacyjnego (A - przed operacją; B - 6 h po operacji wycięcia torbieli; C - 24 h po operacji wycięcia torbieli). Oznaczono w nich stężenie markera CA125, HE4 i IL-6 przy zastosowaniu skonstruowanych i analitycznie opracowanych biosensorów SPRI. Otrzymane wyniki porównano z wartościami stężeń w próbkach kontrolnych (zdrowych kobiet n=18).

Badaniu poddano również surowicę pochodzącą od pacjentek (n=7) operowanych w Klinice Ginekologii i Ginekologii Onkologicznej UMB z powodu raka jajnika. Otrzymany materiał biologiczny podzielony był również na 3 grupy ze względu na czas przed i po wykonaniu zabiegu operacyjnego (A - przed operacją; B - 6 h po operacji wycięcia guza jajnika; C - 24 h po operacji wycięcia guza jajnika).

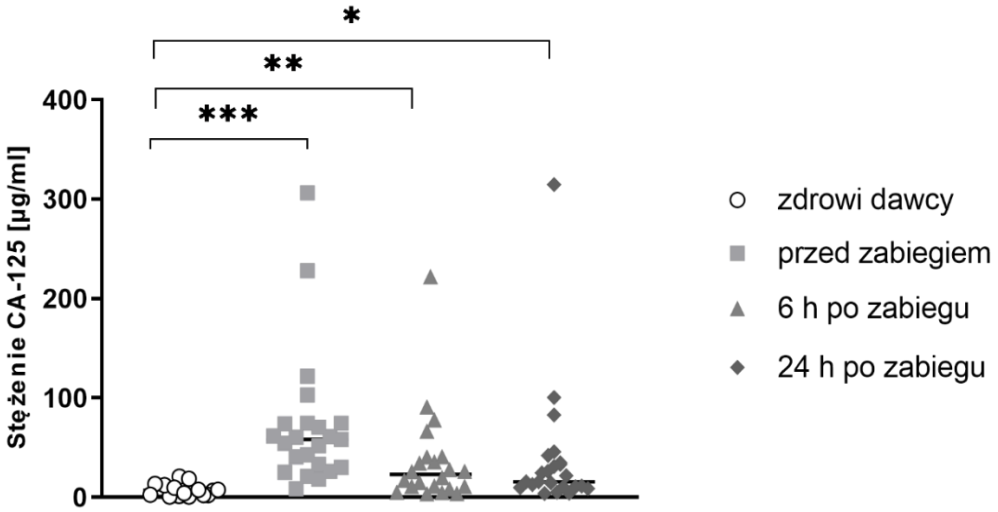
W surowicy oznaczono stężenie markera CA125, HE4 i IL-6 przy zastosowaniu skonstruowanych i analitycznie opracowanych biosensorów SPRI. Otrzymane wyniki porównano z wartościami stężeń w próbkach kontrolnych (zdrowych kobiet n=18).

8.1 Ocena stężeń badanych markerów CA125, HE4 i IL-6 w badanych grupach

8.1.1 Oznaczanie stężenia markera CA125 w próbkach pacjentek z torbielą endometrialną i zdrowych dawczyń

Rozkład wyników stężeń CA125 jest nienormalny dlatego do porównań użyto testu nieparametrycznego. Minimalne stężenie CA125 u zdrowych dawczyń wynosiło 0,86 µg/ml, maksymalne 20,69 µg/ml, analogicznie u pacjentek z torbielami endometrialnymi: przed zabiegiem min. 8,36 µg/ml do 306,2 µg/ml, 6 godzin po operacji 3,56 µg/ml do 222 µg/ml i 24 godziny po zabiegu 3,97 µg/ml do 314,6 µg/ml. Stężenia CA125 były statystycznie znamiennie wyższe w każdym oznaczanym punkcie w porównaniu do grupy kontrolnej.

Rozkład stężeń i znamienności statystyczne oraz wartości poszczególnych parametrów przedstawiają rycina 5 i tabela 1.



*p,0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs grupa kontrolna

Rycina 5. Rozkład stężeń markera CA125 dla próbek kontrolnych oraz dla materiału biologicznego pacjentek z torbielą endometrialną o różnym czasie po resekcji torbieli (A - przed operacją; B - 6 h po operacji wycięcia torbieli; C - 24 h po operacji wycięcia torbieli). Pomiary wykonano na aparacie SPRI.

Tabela 1. Minimalne i maksymalne wartości CA125 oraz pozostałe parametry u pacjentek z torbielami endometrialnymi i w grupie kontrolnej uzyskane w trakcie analizy statystycznej.

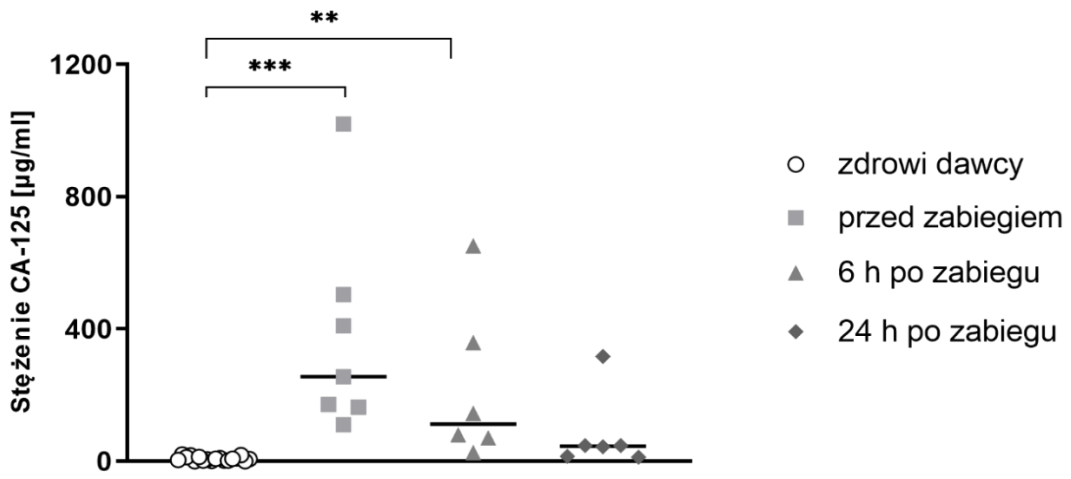
CA 125	Grupa kontrolna	Przed zabiegiem	6 h po zabiegu	24 h po zabiegu
Minimum	0,8600	8,360	3,560	3,970
25% Percentyl	2,293	30,19	10,30	10,21
Mediana	6,990	58,17	22,91	15,74
75% Percentyl	12,40	74,50	40,52	34,64
Maximum	20,69	306,2	222,0	314,6
Zakres	19,83	297,8	218,4	310,6
Średnia	7,986	71,53	36,35	38,24
Standardowe odchylenie	6,330	68,35	47,96	64,89
Błąd standardowy	1,492	14,25	10,22	13,53

8.1.2 Oznaczanie stężenia markera CA125 w próbkach pacjentek z rakiem jajnika i zdrowych dawczyń

U pacjentek leczonych z powodu raka jajnika, podobnie jak torbieli endometrialnej rozkład wyników CA125 oznaczanych przy pomocy biosensora SPRI był nienormalny. Do analizy użyto testu nieparametrycznego. Minimalne stężenie

CA125 u pacjentek z rakiem jajnika przed zabiegiem wynosiło 111,1 µg/ml, maksymalne 1020 µg/ml, odpowiednio 6 godzin po 26,28 µg/ml i 651,1 µg/ml i 24 godziny po zabiegu 12,51 µg/ml i 317,5 µg/ml. Stężenia CA125 były znamiennie statystycznie wyższe u kobiet z rakiem jajnika w porównaniu do grupy kontrolnej przed zabiegiem i 6 godzin po zabiegu. Nie wykazano różnic statystycznych stężeń CA125 uzyskanych 24 godziny po zabiegu w porównaniu do grupy kontrolnej.

Rozkład stężeń i znamienności statystyczne oraz wartości poszczególnych parametrów przedstawiają rycina 6 i tabela 2.



**p<0.01, ***p<0.001 vs grupa kontrolna

Rycina 6. Rozkład stężeń markera CA125 dla próbek kontrolnych oraz dla materiału biologicznego pacjentek z rakiem jajnika o różnym czasie po resekcji guza. (A - przed operacją; B - 6 h po operacji wycięcia guza jajnika; C - 24 h po operacji wycięcia guza jajnika). Pomiary wykonano na aparacie SPRI.

Tabela 2. Minimalne i maksymalne wartości CA 125 oraz pozostałe parametry u pacjentek z rakiem jajnika i w grupie kontrolnej uzyskane w trakcie analizy statystycznej.

CA 125	Grupa kontrolna	Przed zabiegiem	6 h po zabiegu	24 h po zabiegu
Minimum	0,8600	111,1	26,28	12,51
25% Percentyl	2,293	163,1	59,93	14,83
Mediana	6,990	256,4	112,7	45,77
75% Percentyl	12,40	504,4	432,0	115,4
Maximum	20,69	1020	651,1	317,5
Zakres	19,83	909,2	624,8	305,0
Średnia	7,986	376,7	222,2	80,87
Standardowe odchylenie	6,330	317,4	240,8	117,0
Błąd standardowy	1,492	120,0	98,31	47,77

Standardowo poziom markera nowotworowego CA125 w płynach ustrojowych (osocze, surowica) oznaczane jest w jednostkach aktywności (U/mL). Istnieje możliwość przeliczenia aktywności na standardowe stężenie np. (µg/ml) oznaczane za pomocą biosensorów SPRI (126).

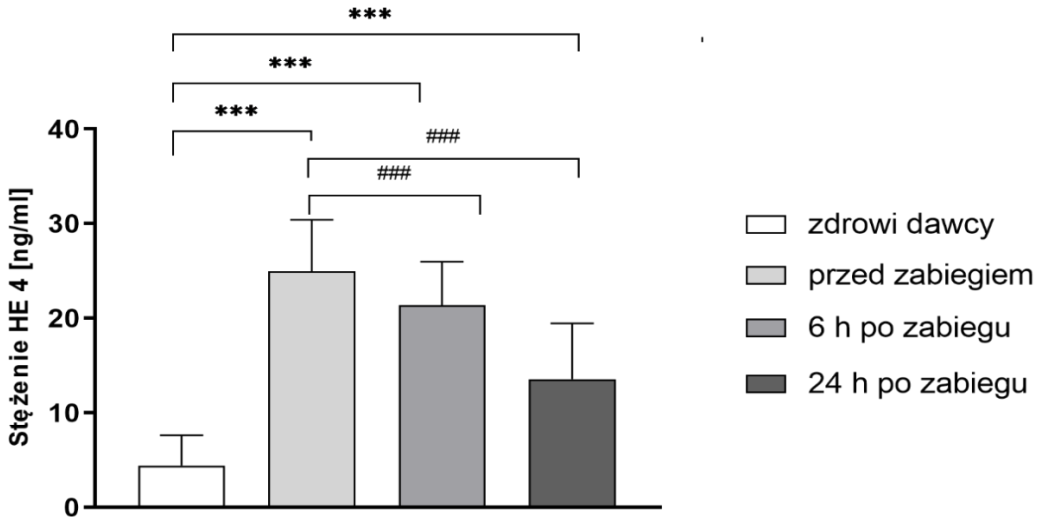
$$C = A * m/v$$

C- aktywność [U/mL]; **A** - specyficzna aktywność dla CA-125 (1040 U/mg= 1,04 U/µg); **m** - masa [µg]; **v** - objętość [mL]

8.1.3 Oznaczanie stężenia markera HE4 w próbkach pacjentek z torbielą endometrialną i zdrowych dawczyń

Rozkład stężeń HE4 oznaczanych przy pomocy biosensora był normalny, do analizy użyto wartości średniej i odchylenia standardowego. Średnie stężenie HE4 oznaczane metodą biosensora SPRI w grupie kontrolnej wynosiło 4,42 (±3,201) ng/ml i było statystycznie znamiennie niższe w porównaniu do pacjentek z torbielami endometrialnymi w każdym punkcie pomiaru, to znaczy przed zabiegiem, 6 i 24 godziny po operacji, odpowiednio 24,96 (±5,465) ng/ml, 21,36 (±4,616) ng/ml i 13,56 (±5.902) ng/ml. Interesująco stężenie HE4 ulegało znamiennemu obniżeniu już 6 i 24 godziny po zabiegu w porównaniu do wartości przed zabiegiem.

Rozkład stężeń i znamienności statystyczne oraz wartości poszczególnych parametrów przedstawiają rycina 7 i tabela 3.



***p<0.001, vs zdrowi ochotnicy, ###p<0.001 vs przed zabiegiem

Rycina 7. Rozkład stężeń markera HE4 próbek kontrolnych oraz materiału biologicznego pacjentek z torbielą endometrialną o różnym czasie po resekcji torbieli (A - przed operacją; B - 6 h po operacji wycięcia torbieli; C - 24 h po operacji wycięcia torbieli). Pomiary wykonano na aparacie SPRI.

Tabela 3. Średnie stężenia HE4 oraz pozostałe parametry u pacjentek z torbielami endometrialnymi i w grupie kontrolnej uzyskane w trakcie analizy statystycznej.

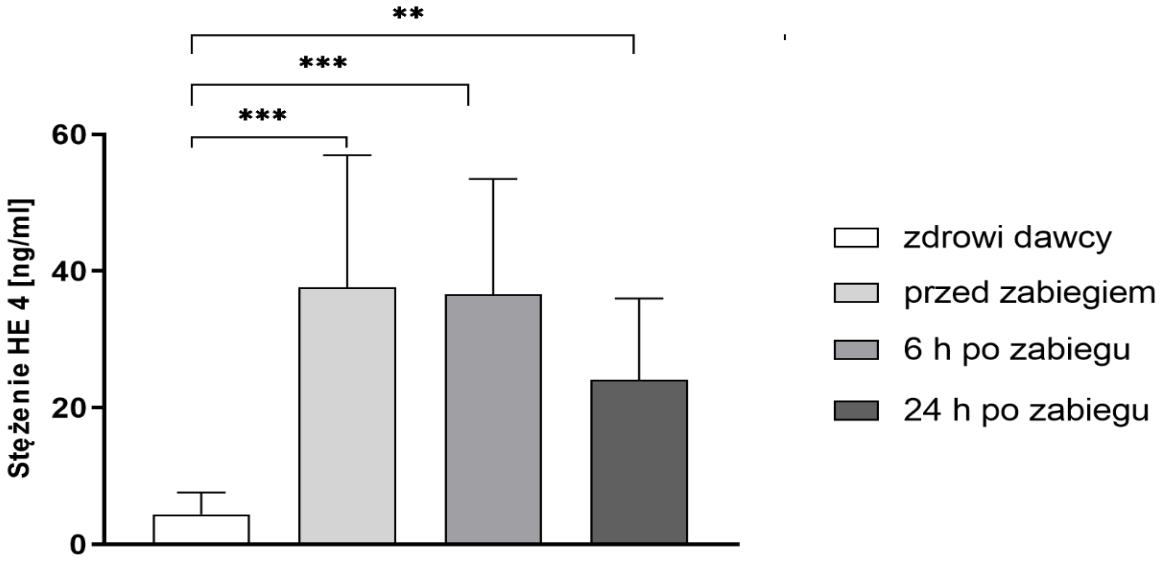
HE4	Grupa kontrolna	Przed zabiegiem	6 h po zabiegu	24 h po zabiegu
Minimum	0,2400	9,615	12,94	2,068
Maximum	10,69	32,43	31,41	23,84
Zakres	10,45	22,81	18,47	21,78
Średnia	4,422	24,96	21,36	13,56
Standardowe odchylenie	3,201	5,465	4,616	5,902
Błąd standardowy	0,7546	1,140	0,9841	1,258

8.1.4 Oznaczanie stężenia markera HE4 w próbkach pacjentek z rakiem jajnika i zdrowych dawczyń

Rozkład stężeń HE4 oznaczanych przy pomocy biosensora był normalny, do analizy użyto wartości średniej i odchylenia standardowego. Stężenia HE4 u pacjentek z rakiem jajnika były statystycznie znamiennie wyższe w każdym punkcie pomiaru i wynosiły odpowiednio 37,68 (±19,3) ng/ml przed zabiegiem, 36,58 (±16,89) ng/ml,

6 godz. po i 24,14 (±11,85) ng/ml, 24 godz. po operacji. Nie zaobserwowano jednak zna czącego spadku HE4 po zabiegu, jak to miało miejsce w przypadku pacjentek leczonych z powodu torbieli endometrialnych.

Rozkład stężeń i znamienności statystyczne oraz wartości poszczególnych parametrów przedstawiają rycina 8 i tabela 4.



**p<0.01, ***p<0.001 vs grupa kontrolna

Rycina 8. Rozkład stężeń HE4 dla próbek kontrolnych oraz dla materiału biologicznego pacjentek z rakiem jajnika o różnym czasie po resekcji guza. (A - przed operacją; B - 6 h po operacji wycięcia guza jajnika; C - 24 h po operacji wycięcia guza jajnika). Pomiary wykonano na aparacie SPRI.

Tabela 4. Średnie stężenia HE4 oraz pozostałe parametry u pacjentek z rakiem jajnika i w grupie kontrolnej uzyskane w trakcie analizy statystycznej.

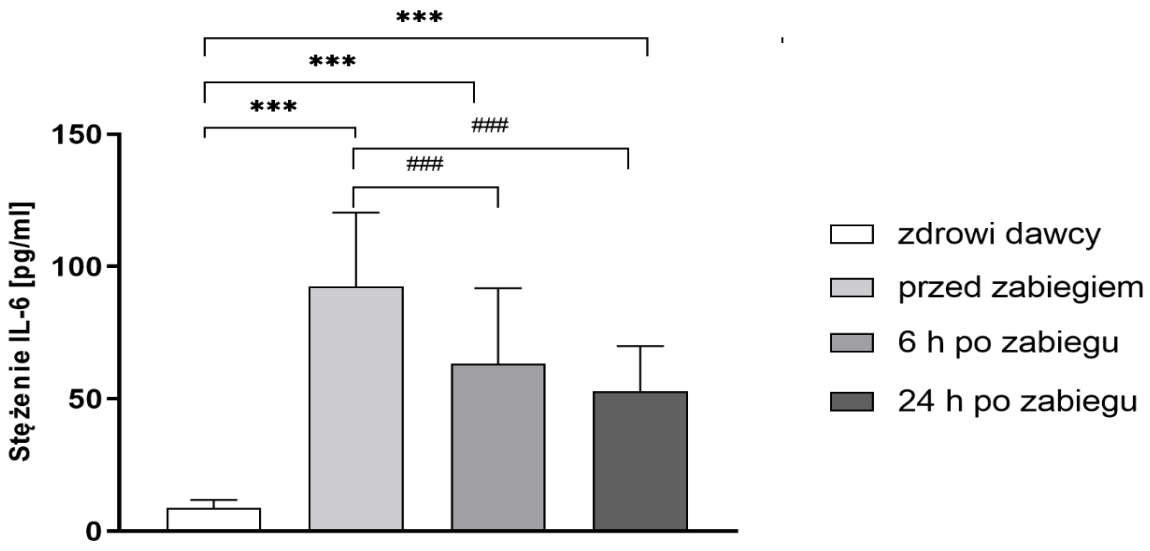
HE4	Grupa kontrolna	Przed zabiegiem	6 h po zabiegu	24 h po zabiegu
Minimum	0,2400	15,48	14,96	10,21
Maximum	10,69	66,16	52,12	35,67
Zakres	10,45	50,68	37,16	25,46
Średnia	4,422	37,68	36,58	24,14
Standardowe odchylenie	3,201	19,30	16,89	11,85
Błąd standardowy	0,7546	7,296	6,897	4,838

8.1.5 Oznaczanie stężenia IL-6 w próbkach pacjentek z torbielą endometrialną i zdrowych dawczyń

Rozkład stężeń interleukiny 6 oznaczanych przy pomocy biosensora był normalny, do analizy użyto wartości średniej i odchylenia standardowego. Średnie stężenie interleukiny 6 oznaczane metodą biosensora SPRI w grupie kontrolnej wynosiło 8,808 (±3,094) pg/ml i było statystycznie znamiennie niższe w porównaniu do

pacjentek z torbielami endometrialnymi w każdym punkcie pomiaru, to znaczy przed zabiegiem, 6 i 24 godziny po operacji, odpowiednio 92,56 (±27,92) pg/ml, 63,29 (±28,40) pg/ml i 52,79 (±17,15) pg/ml. Podobnie jak w przypadku HE4, stężenie interleukiny 6 ulegało znamiennemu obniżeniu już w 6 i 24 godziny po zabiegu, w porównaniu do wartości przed zabiegiem.

Rozkład stężeń i znamienności statystyczne oraz wartości poszczególnych parametrów przedstawiają rycina 9 i tabela 5.



***p<0.001, vs grupa kontrolna, ###p<0.001 vs przed zabiegiem

Rycina 9. Rozkład stężeń interleukiny 6 próbek kontrolnych oraz materiału biologicznego pacjentek z torbielą endometrialną o różnym czasie po resekcji torbieli (A - przed operacją; B - 6 h po operacji wycięcia torbieli; C - 24 h po operacji wycięcia torbieli). Pomiary wykonano na aparacie SPRI.

Tabela 5. Średnie stężenia interleukiny 6 oraz pozostałe parametry u pacjentek z torbielami endometrialnymi i w grupie kontrolnej uzyskane w trakcie analizy statystycznej.

IL-6	Grupa kontrolna	Przed zabiegiem	6 h po zabiegu	24 h po zabiegu
Minimum	5,080	49,19	18,82	31,27
Maximum	15,54	155,0	137,7	95,41
Zasięg	10,46	105,8	118,9	64,14
Średnia	8,808	92,56	63,39	52,79
Odchylenie standardowe	3,094	27,92	28,40	17,15
Błąd odchylenia	0,7293	5,822	6,197	3,743

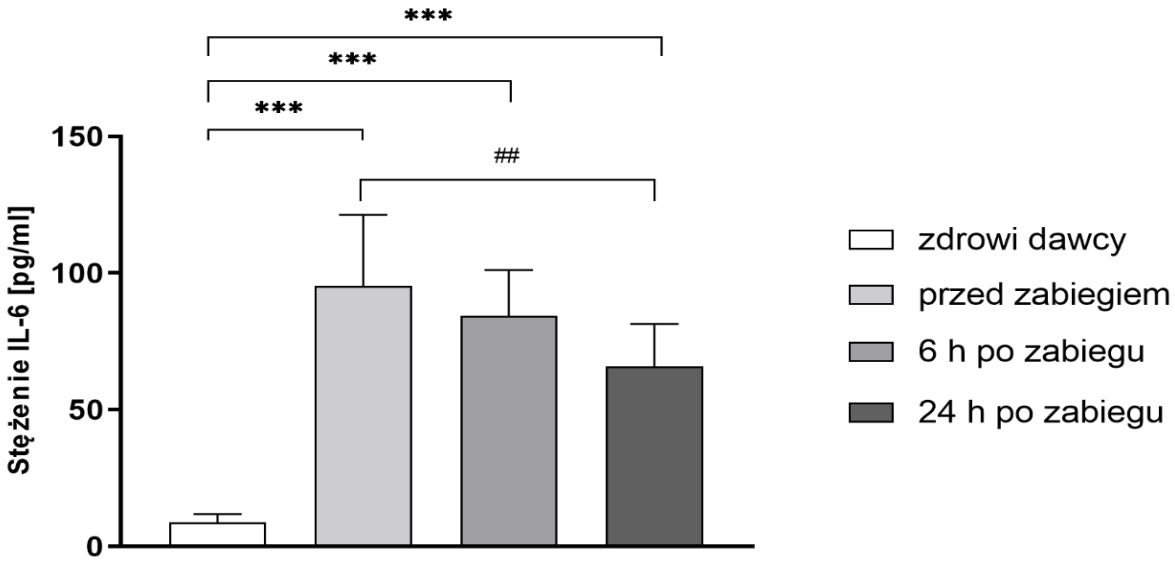
8.1.6 Oznaczanie stężenia markera IL-6 w próbkach pacjentek z rakiem jajnika i zdrowych dawczyń

Rozkład stężeń interleukiny 6 oznaczanych u pacjentek z rakiem jajnika przy pomocy biosensora był normalny, do analizy użyto wartości średniej i odchylenia standardowego.

Stężenia interleukiny 6 u pacjentek z rakiem jajnika były statystycznie znamiennie wyższe w każdym punkcie pomiaru i wynosiły odpowiednio 95,18 (±26,15)

pg/ml przed, 6 godzin po 84,42 (±16,64)pg/ml i 65,49 (±15,45) pg/ml 24 godziny po zabiegu operacyjnym. Wykazano także statystycznie znamienny spadek stężenia interleukiny 6 po 24 godzinach od zabiegu w porównaniu do stężenia przed operacją.

Rozkład IL-6 i znamienności statystyczne oraz wartości poszczególnych parametrów przedstawiają rycina 10 i tabela 6.



**p<0.01, ***p<0.001 vs grupa kontrolna, ##p<0.01 vs przed zabiegiem

Rycina 10. Rozkład stężeń intereleukiny-6 oznaczanych metodą biosensora u pacjentek leczonych z powodu raka jajnika o różnym czasie po resekcji guza jajnika (A - przed operacją; B - 6 h po operacji wycięcia guza jajnika; C - 24 h po operacji wycięcia guza jajnika) w porównaniu do grupy kontrolnej.

Tabela 6. Średnie stężenia interleukiny 6 oraz pozostałe parametry u pacjentek z rakiem jajnika i w grupie kontrolnej uzyskane w trakcie analizy statystycznej.

IL-6	Grupa kontrolna	Przed zabiegiem	6 h po zabiegu	24 h po zabiegu
Minimum	5,080	55,90	65,79	40,41
Maximum	15,54	124,6	101,9	82,98
Zasięg	10,46	68,67	36,08	42,57
Średnia	8,808	95,18	84,42	65,94
Odchylenie standardowe	3,094	26,15	16,64	15,45
Błąd odchylenia	0,7293	9,882	6,795	6,308

8.2 Ocena korelacji pomiędzy oznaczeniami CA125, HE4 i interleukiny 6 oznaczanych za pomocą biosensora SPRI a metodą standardową u pacjentek z rakiem jajnika i torbielą endometrialną

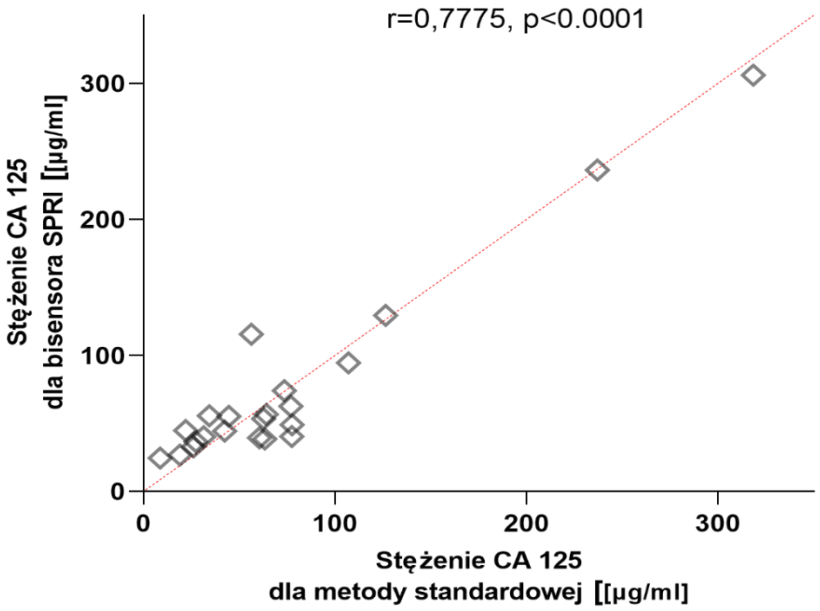
W celu poprawnej analizy wyników otrzymanych przy wykorzystaniu skonstruowanych biosensorów SPRI przeprowadzono oznaczenia badanych markerów z wykorzystaniem standardowych technik diagnostycznych powszechnie używanych

w medycznych laboratoriach klinicznych. Marker CA125 był oznaczany standardowym testem Architect CA125, marker HE4 i IL-6 testem standardowym Elecsys na analizatorze COBAS E-411. Otrzymane w obu metodach dane poddano korelacji.

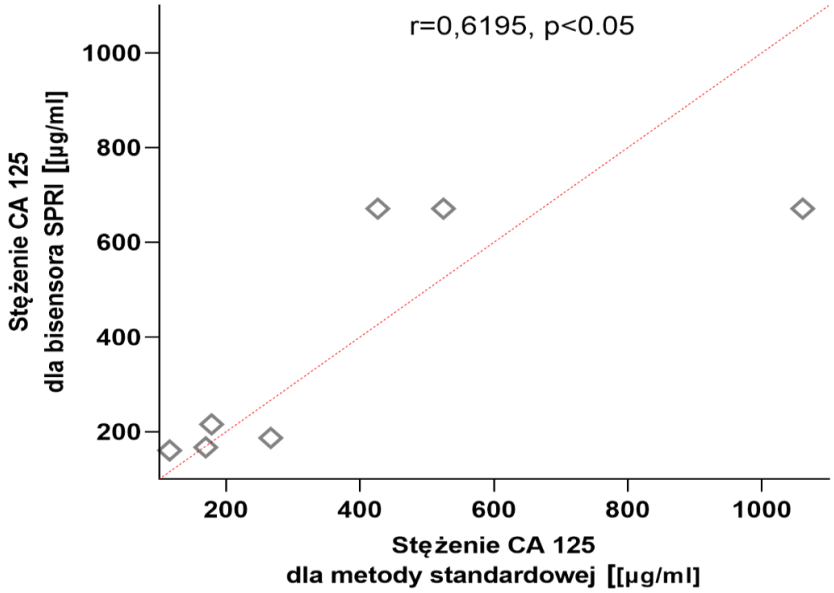
Analiza porównawcza pomiarów stężeń badanych parametrów przy pomocy biosensora i metod komercyjnych przeprowadzonych testem korelacji Spearmana i Pearsona wykazała:

- dodatnią korelację pomiędzy oznaczeniem stężenia CA125 metodą biosensora i metodą tradycyjną w przypadku torbieli endometrialnych ($r=0,7775$, $p< 0,0001$)
- dodatnią korelację pomiędzy oznaczeniem stężenia CA125 metodą biosensora i metodą tradycyjną w przypadku raka jajnika ($r=0,6195$, $p< 0,05$)
- dodatnią korelację pomiędzy oznaczeniem stężenia HE4 metodą biosensora i metodą tradycyjną w przypadku torbieli endometrialnych ($r=0,9189$, $p< 0,05$)
- dodatnią korelację pomiędzy oznaczeniem stężenia HE4 metodą biosensora i metodą tradycyjną w przypadku raka jajnika ($r=0,9720$, $p< 0,0001$)
- dodatnią korelację pomiędzy oznaczeniem stężenia interleukiny 6 metodą biosensora i metodą tradycyjną w przypadku torbieli endometrialnych ($r=0,6309$, $p< 0,0001$)
- dodatnią korelację pomiędzy oznaczeniem stężenia interleukiny 6 metodą biosensora i metodą tradycyjną w przypadku raka jajnika ($r=0,9327$, $p< 0,05$).

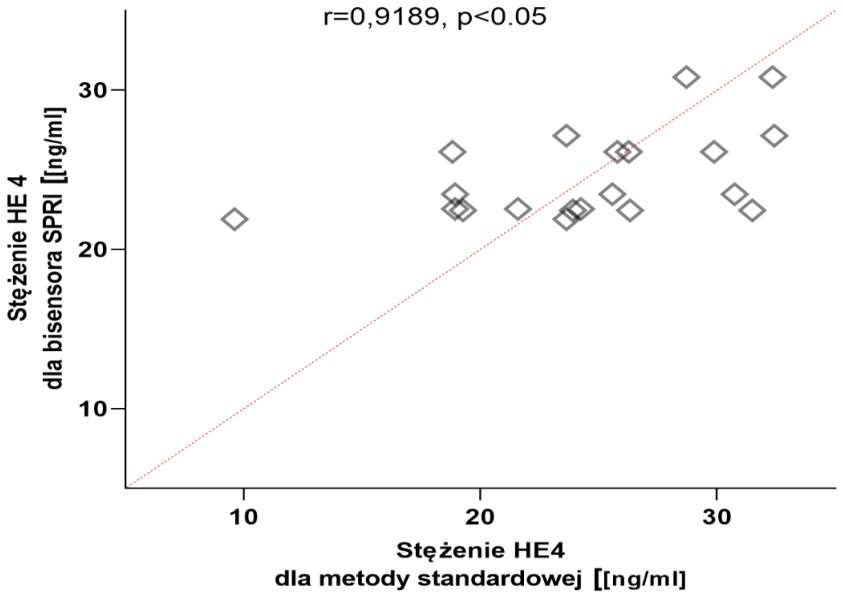
Szczegółowe wyniki przedstawiono na rycinach 11 – 16.



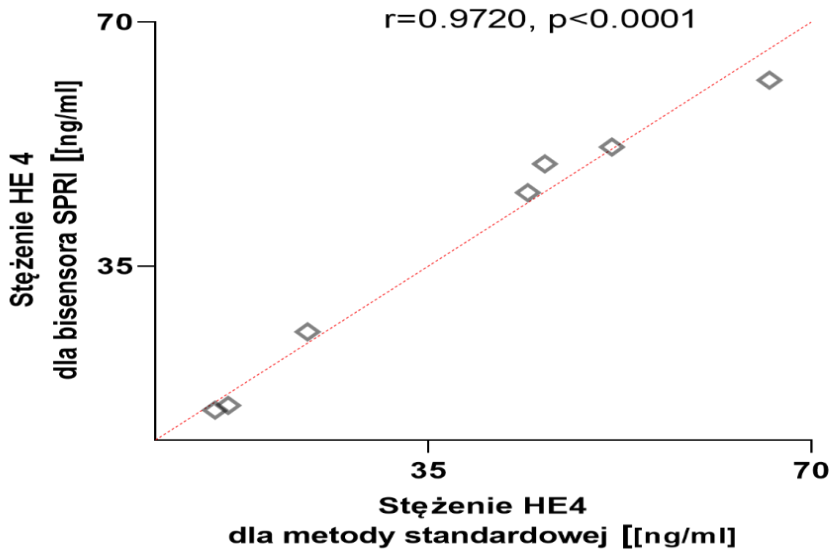
Rycina 11. Dodatnia korelacja pomiędzy oznaczeniami CA125 w surowicy krwi pacjentek z torbielą endometrialną uzyskanych metodą SPRI i testem standardowym (Architect CA125 test) - korelacja Spearmana.



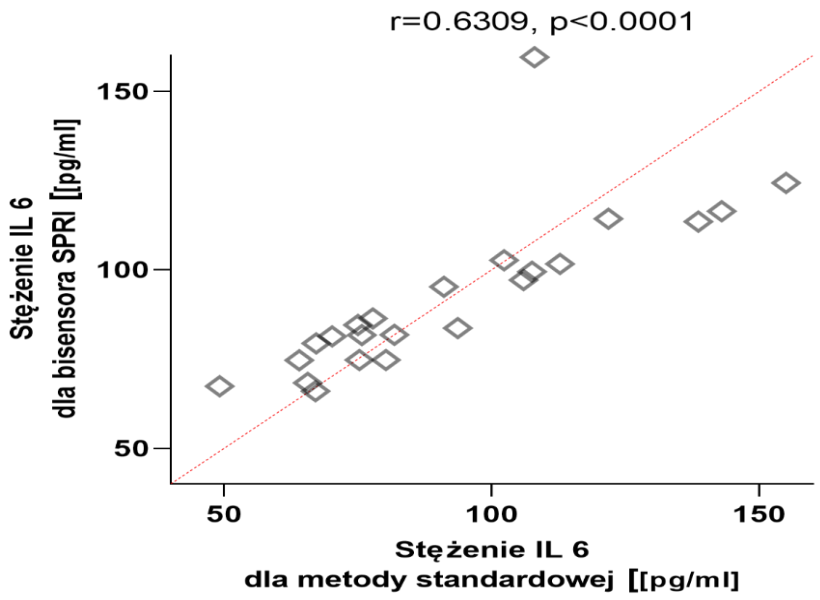
Rycina 12. Dodatnia korelacja pomiędzy oznaczeniami CA125 za pomocą biosensora SPRI i metodą tradycyjną w przypadkach raka jajnika - korelacja Pearsona.



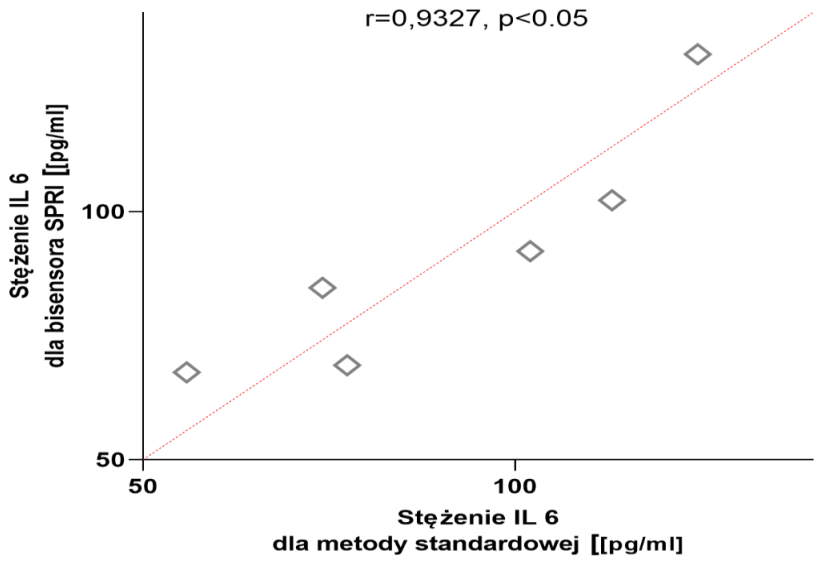
Rycina 13. Dodatnia korelacja pomiędzy wynikami stężenia markera HE4 w surowicy pacjentek uzyskanych metodą biosensora SPRI i testem standardowym ((Elecsys HE4 test na analizatorze COBAS E-411) w przypadkach torbieli endometrialnej – korelacja Pearsona.



Rycina 14. Dodatnia korelacja pomiędzy wynikami stężenia markera HE4 w surowicy krwi pacjentek z rakiem jajnika uzyskanych metodą SPRI i testem standardowym (Elecsys HE4 test na analizatorze COBAS E-411) – korelacja Pearsona.



Rycina 15. Dodatnia korelacja pomiędzy wynikami stężenia markera IL-6 w osoczu krwi pacjentek z torbielą endometrialną jajnika uzyskanych metodą SPRI i testem standardowym (Elecsys IL-6 test na analizatorze COBAS E-411) – korelacja Pearsona.



Rycina 16. Dodatnia korelacja pomiędzy oznaczeniami stężenia interleukiny 6 u pacjentek z rakiem jajnika uzyskanych metodą SPRI i testem standardowym (Elecsys IL-6 test na analizatorze COBAS E-411) – korelacja Pearsona.

9. DYSKUSJA

Endometrioza jest przewlekłą chorobą zapalną estrogenozależną. Szacunkowe oceny pozwalają przypuszczać, że dotyczy ona nawet 10% całej populacji miesiączkujących kobiet (127). Oznacza to, że na świecie żyje z tą chorobą ok. 390 mln kobiet. Endometrioza, a szczególnie towarzyszący jej ból w obrębie miednicy mniejszej pogarsza jakość życia kobiety i jej codzienne funkcjonowanie, obejmujące nie tylko wykonywanie podstawowych czynności życiowych ale i aktywność sportową, życie seksualne, stosunki partnerskie w domu i pracy (128,129). Leczenie endometriozy generuje znaczące w systemie ochrony zdrowia porównywane do leczenia cukrzycy czy reumatoidalnego zapalenia stawów (130).

Szacuje się, że na raka jajnika zwanego „cichym zabójcą", rocznie w Polsce zapada ok. 4000 kobiet, a 2500 z nich umiera.

Markery CA125, HE4 i interleukina 6 należą do niespecyficznych związków, które są podwyższone zarówno w raku jajnika jak i w endometriozie. Nie mają dużej wartości diagnostycznej w screeningu, ale są przydatne w monitorowaniu efektów leczenia i określenia predykcji pojawienia się wznowy. Algorytm ROMA wykorzystujący stężenia CA125 i HE4 pozwala określić ryzyko złośliwego charakteru zmian stwierdzanych w jajnikach, a także określić predykcję powstania wznowy choroby nowotworowej.

W przedstawionych badaniach określono przydatność opracowanych biosensorów SPRI do oznaczania markerów CA125, HE4 i interleukiny 6 w diagnostyce raka jajnika i endometriozy. Oznaczanie przy użyciu biosensorów stwarza perspektywę opracowania metod prostych w obsłudze, szybkich i wydajnych

ekonomicznie. Zgodnie z definicją Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej IUPAC biosensorem chemicznym jest instrument analityczny który wykorzystuje sygnał biologiczny na analitycznie przydatny sygnał. Metoda powierzchniowego rezonansu plazmonów SPR (ang. Surface Plasmon Resonance) jest techniką optyczną pomiaru wykorzystującą zjawisko fizyczne zmiany współczynnika załamania po związaniu się cząsteczek na powierzchni metalu. Między węzłami sieci krystalicznej metalu krążą wolne elektrony nazwane plazmonami – odpowiedniki fotonów, będące kwantami promieniowania elektromagnetycznego. Plazmony biorą udział w zjawiskach optycznych zachodzących w warstwie metalu. Energia fotonu padającego na powierzchnię metalu musi być równa energii drgań oscylacyjnych plazmonów aby te weszły w rezonans. Ze względu na to, że energia plazmonów z wnętrza metalu jest znacznie większa niż fotonów z zakresu światła widzialnego, w rezonans mogą wejść tylko plazmony z powierzchniowej warstwy metalu o grubości 300–400 nm bo tylko te mają podobną energię jak fotony . Przy tego typu metodzie mówimy o wykorzystaniu zjawisku powierzchniowego rezonansu plazmonów (SPR, ang. Surface Plasmon Resonance). Aparat do pomiarów analitycznych z wykorzystaniem SPRI składa się z części optycznej, przetwornika, który współdziała z elementami optycznymi i częścią biochemiczną czujnika oraz układu elektronicznego umożliwiającego przetwarzanie i rejestrację danych. Część optyczna aparatury SPRI zawiera źródło promieniowania (laser He-Ne, argonowy lub dioda LED), elementy optyczne (soczewki, polaryzatory, lustro) oraz pryzmat z cienką warstwą metalu, w którym wzbudzana jest fala rezonansowa plazmonów (26, 27). Przetwornik przekształca zmiany zachodzące na powierzchni metalu na zmiany współczynnika załamania światła, który może być określany przez optyczną detekcję SPR. W procesie tym sygnał elektryczny jest generowany i przetwarzany przez układ elektroniczny. Aparatura SPRI zwykle

wyposażona jest w kamerę CCD do wychwytywania światła odbitego z całej powierzchni czipa. Bardzo ważną częścią układu SPRI jest czujnik z czułym elementem rozpoznającym. Konstrukcja powierzchni takiego czujnika zależy od jego producenta i praktycznego zastosowania. Zazwyczaj jest to czip szklany z warstwą obojętnego metalu (złota o grubości 50 nm). Niemodyfikowana warstwa złota nie jest odpowiednim środowiskiem dla biomolekularnych interakcji, w związku z tym, warstwy złota są modyfikowane, np. monowarstwą tiolu (24). Biosensory te posiadają odpowiednie przeciwciało połączone ze złotą powierzchnią chipa za pomocą linkera cysteaminy. Sama budowa biosensora umożliwia zastosowanie przeciwciał bez konieczności wzmacniania sygnału analitycznego, np. przez wykorzystanie znaczników, co powoduje, że oznaczane substancje nie tracą swoich właściwości funkcjonalnych (131).

Na uwagę zasługuje prostota i łatwość wykonania pomiarów. Należy także podkreślić, że cały panel charakteryzuje się przystosowaniem stężenia receptora (przeciwciała) na powierzchni biosensora do określonych zakresów stężeń mierzonych antygenów, to znaczy przy oznaczaniu CA125 jest to 200 µg/ml (126), HE4 - 20 ng/ml (132) a interleukiny 6 - 60 pg/ml (133). Analiza wymaga wykonania odpowiednich krzywych kalibracyjnych dla każdego oznaczanego związku. Wykonane pomiary potwierdziły możliwość zastosowania biosensora do oznaczeń stężeń wybranych parametrów, ponieważ zakresy stężeń oznaczanych parametrów zawierały się w liniowych fragmentach krzywych kalibracyjnych. Opracowane biosensory były także badane pod kątem precyzji pomiaru. Wykazano, że precyzja pomiaru mieści się poniżej 10%, zarówno jako wyniki zawyżone, jak i zaniżone co należy uznać za wynik zadowalający (134).

Kolejnymi parametrami określającymi precyzyjność pomiarów są granica wykrywalności i granica oznaczalności. Przeprowadzone badania dotyczące określenia tych parametrów wykazały przy oznaczaniu CA125, iż granica oznaczalności nie wpływa na uzyskane pomiary, podczas gdy przy oznaczaniu HE4 granica ta wynosi 0,3 ng/ml co sprawia, że wszystkie wyniki poniżej tej wartości mają charakter półilościowy. W przypadku interleukiny 6 zakresem detekcji tej substancji jest przedział 0.9-3 pg/ml (126,132,133).

W surowicy krwi znajduje się dużo innych białek i substancji. Ważne jest więc określenie specyficzności sygnału analitycznego. Badanie specyficzności biomarkerów wykazało nieznaczny wpływ potencjalnych interferentów na HE4 i interleukinę 6, oraz interferencję oznaczenia CA125 z nadmiarem albuminy, mieszczącym się jednak w akceptowalnym przedziale dopuszczalnego błędu (126).

Jednak najważniejszym parametrem określającym przydatność nowoopracowanego systemu do oznaczania jakiejkolwiek substancji jest jego zgodność z istniejącymi już systemami komercyjnymi.

Głównym celem pracy było wykazanie przydatności, opracowanych w Pracowni Bioanalizy Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku biosensorów do oznaczeń IL-6, CA125 i HE4 w wersji SPRI, do wykorzystania w diagnostyce i nadzorze leczenia endometriozy i raka jajnika, pod względem dokładności oznaczeń i wiarygodności uzyskanych wyników.

Dokonano porównania uzyskanych wyników ze stężeniami uzyskiwanymi przy użyciu metod standardowych, wykonywanych w laboratorium komercyjnym. Badania te wykonano po uzyskaniu próbek krwi od zdrowych kobiet oraz od pacjentek z torbielami endometrialnymi i rakiem jajnika.

Stężenie CA125 oznaczanych metodą SPRI u pacjentek z torbielą endometrialną było średnio 10 - krotnie wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej. Jest to zgodne z powszechnie dostępnym piśmiennictwem. Marker CA125 i jego rola w endometriozie została dogłębnie zbadana. Stężenia CA125 korelują ze z stopniem zaawansowania i przebiegiem choroby oraz z doszczętnością leczenia (135). Jednak do tej pory nie zbadano szybkości spadku CA125 po wykonanej operacji. Stężenia CA125, 6 i 24 godziny po operacji usunięcia torbieli były wprawdzie statystycznie znamiennie większe w porównaniu z grupą kontrolną jednak poziom istotności wyraźnie malał ($p<0,001$ vs $p<0,05$). Przeprowadzone porównanie uzyskanych wyników metodą SPRI z metodą komercyjną (Architect CA125 test) wykazało zgodność uzyskanych wyników ($r=0,7775$). Natomiast u kobiet z rakiem jajnika opracowany biosensor wykazał ponad 50 - krotnie wyższe stężenia u kobiet chorych w porównaniu do grupy kontrolnej. Literatura potwierdza wyniki badań własnych (136). Po operacji cytoredukcyjnej zauważono gwałtowne obniżenie stężenia CA125. Stężenia CA125 24 godziny po zabiegu operacyjnym nie różniły się statystycznie od stężeń w grupie kontrolnej. Porównanie uzyskanych wyników z testem komercyjnym podobnie wykazało dodatnią korelację pomiędzy oznaczeniami CA125 za pomocą biosensora i metodą tradycyjną u kobiet z rakiem jajnika (korelacja Pearsona, $r=0,6195$). Wykazano więc równoważność oznaczeń CA125 metodą SPRI i metodą komercyjną.

W dostępnej literaturze nie znaleziono opracowań dotyczących markera HE4 w endometriozie. W badaniach własnych stwierdzono prawie 5 - krotnie wyższe stężenie HE4 u kobiet z endometriozą w porównaniu do grupy kontrolnej. Stężenie to malało statystycznie znamiennie 6 i 24 godziny po zabiegu. W przyszłości należałoby przeprowadzić badania nad dynamiką zmian w stężeniu HE4 w powiązaniu

z doszczętnością wykonywanego zabiegu operacyjnego. Uzyskane wyniki oznaczeń HE4 metodą SPRI porównano do oznaczeń uzyskanych standardowym testem Elecsys wykonywanym na aparacie COBAS E-411. Wykazano dodatnią korelację pomiędzy wynikami stężenia markera HE4 w surowicy pacjentek uzyskanych metodą biosensora SPRI i testem standardowym (korelacja Pearsona, r=0,9189).

Rola markera HE4 w raku jajnika jest dobrze poznana i posłużyła do opracowania algorytmu oceny ryzyka występowania choroby nowotworowej (137). Średnie stężenie HE4 u kobiet z rakiem jajnika przekraczało ośmiokrotnie średnie stężenie obserwowane w grupie kontrolnej. Nie było więc tak wyraźnie wyższe jak przy oznaczeniach CA125. Przeprowadzone porównanie uzyskanych wyników metodą SPRI i testem komercyjnym wykazały dodatnią korelację pomiędzy wynikami stężenia markera HE4 w surowicy krwi pacjentek z rakiem jajnika (korelacja Pearsona, r=0,9720). Wysoka zgodność uzyskanych wyników pozwala więc na wysunięcie wniosku, że opracowany biosensor został zwalidowany i w połączeniu z oznaczeniem CA125 może być wykorzystywany do diagnostyki i monitorowania leczenia raka jajnika z wyliczeniem ryzyka przy zastosowaniu algorytmu ROMA.

Intersujące sa zmiany stężeń HE4 u pacjentek z endometriozą. Być może zjawisko to mogłoby być wykorzystane w monitorowaniu leczenia tej choroby.

Wiadomo, że endometrioza to zapalna choroba estrogenozależna związana z toczącym się w organizmie kobiety procesem zapalnym. Poznano wiele mediatorów stanu zapalnego biorących udział w rozwoju tej choroby. Wśród nich są intereleukina 6 która z interleukiną 1β stymulują wiele procesów zapalnych prowadzących do neuroangiogenezy (138). Oznaczenie stężeń interleukiny 6 wykazało ponad 10 - krotnie wyższe stężenia tej cytokiny u kobiet z endometriozą i rakiem jajnika w porównaniu do

grupy kontrolnej. Po wykonaniu operacji zauważono szybkie obniżenie jej stężenia. U pacjentek z endometriozą był on już znamiennie statystycznie niższy po 6 godzinach, w raku jajnika znamienność pojawiła się po 24 godzinach od operacji. Uzyskane metodą SPRI wyniki porównano do wyników uzyskanych oznaczeń testem Elecsys IL-6 na aparacie COBAS E – 411. Uzyskano dodatnią korelację Pearsona pomiędzy wynikami uzyskanymi przy pomocy biosensora i testu komercyjnego. Dla endometriozy współczynnik wyniósł r=0,6309 a dla raka jajnika r= 0,9327.

W Pracowni Bioanalizy Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku po opracowaniu pojedynczych biosensorów na wyżej wymienione biomarkery wykonano dodatkowo jednoczesny pomiar stężenia badanych markerów przy użyciu nowoskonstruowanego panelu ginekologiczno – onkologicznego z detekcją SPRI.

Pozwoliło to na równoczesne oznaczenie 5 różnych biomarkerów. W oryginale do analizowanych markerów, oznaczano CEA (antygen karcino-embrionalny) i aromatazę. Porównano stworzony panel ginekologiczno-onkologiczny z jednoczesnym oznaczeniem 5 markerów nowotworowych (CA125, HE4, IL-6, CEA, aromataza) do wyników uzyskanych dla pojedynczych biosensorów. We wszystkich analizowanych próbkach obliczone współczynniki Pearsona i Spearmana wskazywały na dobrą zgodność wyników uzyskanych z zastosowaniem biosensorów w panelu ginekologiczno-onkologicznym.

Opracowany model panelu ginekologiczno - onkologicznego jest pierwszym tego rodzaju panelem do diagnostyki antygenowej współdziałający z techniką SPRI.

Zastosowanie dodatkowo wymienionych biomarkerów w jednym panelu analitycznym do jednoczesnego oznaczania pięciu markerów w próbkach pochodzących od poszczególnych pacjentów pozwoliłoby na znacznie szybszą diagnostykę

w porównaniu do szeregu metod standardowych używanych w komercyjnych laboratoriach. Model ten jest właściwie gotowy do wdrożenia do powszechnego użytkowania. Poszerza to w znacznym stopniu gamę dostępnych narzędzi diagnostycznych.

Reasumując, biosensory z detekcją SPRI reprezentują metodę do oznaczania wielu analitów biologicznych jednocześnie, co daje możliwość wieloskładnikowej analizy markerów nowotworowych w próbkach badanych pacjentów. Połączenie biosensorów z techniką SPRI daje możliwość szybkiej, taniej i nieuciążliwej dla pacjentów analizy kilku parametrów jednocześnie. Skonstruowany aparat cechuje się znaczną miniaturyzacją a ilość materiału potrzebnego do oznaczenia jest niewielka.

Przeprowadzona analiza uzyskanych wyników wykazała wiarygodność tej metody i możliwości oznaczania substancji w diagnostyce i monitorowaniu pacjentek z rakiem jajnika i torbielą endometrialną. Wykazano, że uzyskane przy pomocy techniki SPRI wyniki są bardzo zbliżone do wyników uzyskanych dostępnymi metodami komercyjnymi. Opracowany zestaw ma więc szanse znaleźć zastosowanie w codziennej praktyce diagnostyczno- leczniczej.

10. WNIOSKI

1. Technika oznaczeń metodą Powierzchniowego Rezonansu Plazmonów w wersji Imaging (SPRI) daje możliwość dokładnego oznaczenia stężenia IL-6 i antygenów CA125 i HE4 w raku jajnika i endometriozie.

2. Analiza statystyczna potwierdziła użyteczność nowych metod z użyciem biosensorów SPRI do oznaczeń IL-6, CA125 i HE4 w diagnostyce raka jajnika i endometriozy.

3. Charakterystyka opracowanych biosensorów mieści się w akceptowalnych granicach i jest typowa dla tego rodzaju oznaczeń.

4. Technika Powierzchniowego Rezonansu Plazmonów w wersji Imaging z zastosowaniem biosensorów z odpowiednio skonstruowaną matrycą może być użytecznym narzędziem w diagnostyce i monitorowaniu leczenia raka jajnika i endometriozy.

11. STRESZCZENIE

Endometrioza definiowana jest jako obecność czynnych gruczołów i tkanki podścieliska występujących poza jamą macicy. Występowanie endometriozy w populacji kobiet szacuje się od 5 do nawet 40%. Patogeneza endometriozy jest nieznana, istnieją tylko teorie próbujące wyjaśnić patomechanizm tego schorzenia.

Zarówno endometrioza jak i rak jajnika ze względu na szerokie spektrum dolegliwości i trudności diagnostycznych są jednostkami chorobowymi wymagającymi usprawnienia i ułatwienia diagnostyki oraz monitorowania procesu nowotworowego.

Celem niniejszej pracy była ocena przydatności techniki Powierzchniowego Rezonansu Plazmonów w wersji Imaging (SPRI) do oznaczeń IL-6, antygenów CA125 i HE 4 w raku jajnika i endometriozie.

Porównano uzyskane nową metodą wyniki z dostępnymi komercyjnie metodami oznaczeń antygenów CA125, HE4 i IL-6.

Dodatkowo potwierdzono przydatnosć metody SPRI do oznaczeń antygenu CA125, HE4 i IL-6 oraz wykazano możliwości potencjalnego zastosowania tej metody w rutynowej diagnostyce laboratoryjnej.

Materiał stanowiła krew pobrana od dwóch grup pacjentek, operowanych z powodu endometriozy (25) i raka jajnika (7) w Klinice Ginekologii i Ginekologii Onkologicznej UMB. Od pacjentek operowanych pobierano 2 ml krwi pełnej w następujących odstępach czasowych: przed operacją, 6 i 24 godz. po operacji.

Krew wirowano przez 15 min w wirówce z prędkością 2500 obrotów/min. Uzyskaną surowicę zamrażano w temp. -70 st. C i następnie wykorzystywano do dalszych badań.

Grupę kontrolną stanowiła krew zdrowych kobiet (18) uzyskana w Regionalnym Centrum Krwiodastwa i Krwiolecznictwa w Białymstoku.

Do oznaczeń markera CA125, HE4 i IL-6 skonstruowano pojedyncze biosensory SPRI a następnie utworzono panel ginekologiczno - onkologiczny umożliwiający wykonanie oznaczeń jednocześnie kilku markerów w czasie rzeczywistym.

Do celów porównawczych marker CA125 był oznaczany standardowym testem Architect CA 125, marker HE4 i IL-6 testem standardowym Elecsys na analizatorze COBAS E - 411.

Dokonano analizy porównawczej pomiarów stężeń badanych parametrów przy pomocy biosensora i metod komercyjnych. Do celów statystycznych zastosowano test korelacji Spearmana i Pearsona.

Wykazano:

- dodatnią korelację pomiędzy oznaczeniem stężenia CA 125 metodą biosensora i metodą tradycyjną w przypadku torbieli endometrialnych ($r=0,7775$, $p< 0,0001$) jak i raka jajnika ($r=0,6195$, $p< 0,05$),
- dodatnią korelację pomiędzy oznaczeniem stężenia HE4 metodą biosensora i metodą tradycyjną w przypadku torbieli endometrialnych ($r=0,9189$, $p< 0,05$) i w przypadku raka jajnika ($r=0,9720$, $p< 0,0001$),

- dodatnią korelację pomiędzy oznaczeniem stężenia interleukiny 6 metodą biosensora i metodą tradycyjną w przypadku torbieli endometrialnych ($r=0,6309$, $p< 0,0001$) i w przypadku raka jajnika ($r=0,9327$, $p< 0,05$).

Analiza porównawcza uzyskanych wyników wykazała użyteczność diagnostyczną pojedynczych biosensorów w diagnostyce raka jajnika i endometriozy.

Wyniki uzyskane z zastosowaniem biosensorów są bardzo zbliżone do wyników uzyskanych z zastosowaniem testów komercyjnych zastosowanych w laboratorium.

12. SUMMARY

Endometriosis is defined as the presence of functional glands and stromal tissue outside the uterine cavity. The prevalence of endometriosis in the female population is estimated at 5 to even 40%. The pathogenesis of endometriosis is unknown, there are only theories trying to explain the pathomechanism of this disease.

Both endometriosis and ovarian cancer, due to the wide spectrum of ailments and diagnostic difficulties, are diseases that still require improvement and facilitation of diagnosis and monitoring of the neoplastic process.

The aim of this study was to evaluate the suitability of the Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRi) technique for the determination of IL-6 and CA125, HE4 antigens in ovarian cancer and endometriosis.

The results obtained with the new method were compared with commercially available methods for the determination of CA125, HE4 antigens and IL-6. In addition, the validation of the SPRI method for CA125, HE4 and IL-6 antigen determinations was confirmed, and the potential use of this method in routine laboratory diagnostics was demonstrated.

The material was blood collected from two groups of patients who underwent surgery due to endometriosis (25) and ovarian cancer (7) at the Department of Gynecology and Gynecological Oncology of the Medical University of Bialystok. 2 ml of whole blood was collected from operated patients at the following intervals: before surgery, 6 and 24 hours after the surgery.

The blood was centrifuged for 15 min in a centrifuge at 2500 rpm. The obtained serum was frozen at -70 degrees C and then used for further research.

The control group consisted of plasma from healthy womens (18) obtained at the Regional Blood Donation Centre.

For the determination of the CA125, HE4 and IL-6 marker, single SPRI biosensors were constructed, and then a gynecological and oncological panel was created to enable the determination of several markers simultaneously in real time. For comparison purposes, the CA125 marker was tested with the Architect CA125 standard test, the HE4 and IL6 markers with the Elecsys standard test on a COBAS E - 411 analyzer.

A comparative analysis of the concentration measurements of the tested parameters using a biosensor and commercial methods was carried out. For statistical purposes, the Spearman and Pearson correlation test was used.

Demonstrated:

- positive correlation between the determination of CA125 concentration using the biosensor method and the traditional method in the case of endometrial cysts ($r=0,7775$, $p<0,0001$) and ovarian cancer ($r=0,6195$, $p<0,05$),

- positive correlation between the determination of HE4 concentration using the biosensor method and the traditional method in the case of endometrial cysts ($r=0,9189$, $p< 0,05$) and in the case of ovarian cancer ($r=0,9720$, $p< 0,0001$),

- positive correlation between the determination of interleukin-6 concentration using the biosensor method and the traditional method in the case of endometrial cysts ($r=0,6309$, $p< 0,0001$) and in the case of ovarian cancer ($r=0,9327$, $p< 0,05$).

Comparative analysis and validation of the obtained results showed the diagnostic usefulness of single biosensors in diagnosis of ovarian cancer and endometriosis. The results obtained using the panel are very similar to the results obtained using commercial tests used in the laboratory.

13. PIŚMIENNICTWO

1) Abbas S, Ihle P, Koster I et al.: Prevelance and incidence of diagnosed endometriosis and risk of endometriosis in patient with endometriosis symptoms: finding from a statutory health insurance- based cohort in Germany. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2012; 160(1): 79-83.
2) Jarrell JF, Vilos GA, Allaire C et al.: Chronic Pelvic Pain Working Group; Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada. Consensus guidelines for the management of chronic pelvic pain. J Obstet Gynaecol Can 2005; 27: 869.
3) Barton-Smith P, Ballard K, Kent ASH: Endometriosis A general review and rationale for surgical therapy. Reviews in Gyneacological and Perinatal Practice 2006; 6: 168-176.
4) Schindler AE: Patophysiology, diagnosis and treatment of endometriosis. Mivera Ginecol 2004; 56: 419-435.
5) Fauconnier A: Relation between pain symptoms and the anatomic location of deep infiltrating endometriosis. Fertil Steril 2002; 78: 719-726.
6) Jakiel G, Robak-Chołubek D, Tkaczuk-Włach J: Endometrioza. Prz Menopauzalny 2006; 2: 126-129.
7) American Society for Reproductive Medicine. Revised American Society for Reproductive Medicine classification of endometriosis 1996 Fertil Steril 1997; 67: 822-829.

8) Mol BW, Bayram N, Lijmer JG, Wiegerinck A et al.: The performance of CA-125 measurement in the detection of endometriosis: a metaanalysis. Fertil Steril 1998; 70 (6): 1101-1108.

9) Pattaway DE, Rondinone D, Miller KA, Barnes K: Clinical evaluation of CA125 concentrations as a prognostic factor for pregnancy in infertile women with surgically treated endometriosis. Ferti Steril 1995; 64: 321-324.

10) Nikolova T, Zivadinovic R, Evtimovska N et al.: Diagnostic performance of human epididymis protein 4 compared to a combination of biophysical and biochemical markers to differentiate ovarian endometriosis from epithelial ovarian cancer in premenopausal women. J Obstet Gynaecol Res 2017; 43: 1870–1879.

11) Zapardiel I, Gorostidi M, Ravaggi A et al.: Utility serum marker HE4 for the differential diagnosis between endometriosis and adnexal malignancy. Int J Gynecol Cancer 2016; 26: 52–55.

12) Huhtinen K, Suvitie P, Hissa J et al.: Serum HE 4 concetration differentiates malignant ovarian tumors from ovarian endometriotic cysts. Br J Cancer 2009; 100: 1315-1319.

13) Becker CM, Bokor A, Heikinheimo O et al.: ESHRE guideline: endometriosis Hum Reprod Open 2022; 2: 1-26.

14) Kanikowska D, Markowska J, Wiktorowicz K: Historia badań nad endometriozą. Polski Przegląd Nauk o Zdrowiu. 2010; 1: 42-45.

15) Rokitansky C: Über Uterusdrüsen-Neubildung in Uterus - und Ovarial-Sarcomen. Z Ges Aerzte Wien 1860; 16: 577–581.

16) Cullen TS: Adenomyoma of the uterus. Philadelphia: WB Saunders; 1908

17) Russel WW: Aberrant portions of the mulerian duct found in an ovary. Ovarian cysts of mulerian orgin. Bull Johnns Hopkins Hospital 1899;10: 8-10.

18) Samson JA: Peritoneal endometriosisdue to menstrual dissemination of endometrial tissue into peritoneal cavity. Am J Obstet Gynecol 1927; 14: 422-69.

19) Nap AW, Groothuis PG, Demir AY, Evers JL et al.: Pathogenesis of endometriosis. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2004; 18: 233-244.

20) Miller JE, Ahn SH, Monsanto SP, Khalaj K, Koti M, Tayade C: Implications of immune dysfunction on endometriosis associated infertility. Oncotarget 2017; 8(4): 7138-7147.

21) Konincx PR, Kennedy SH, Barlow DH: Pathogenesis of endometriosis: the role of peritoneal fluid. Gynecol Obstet Invest 1999; 47: 23-33.

22) Song M, Karabina SA, Kartaradze N, Murphy AA et al.: Presence of endometrial epithelial cells In the peritoneal cavity and the mesothelial inflammatory response. Fertil Steril 2003; 79: 789-794.

23) Santanam N, Song M, Rong R, Murphy A, Parthasarathy S: Athelosclerosis , oxidation and endometriosis. Free Radical Research 2002; 36(12): 1315-1321.

24) Dmowski W, Gebel H, Braun D: Decreased apoptosis and sensitivity to macrophage mediated cytolysis of endometrial cells in endometriosis. Hum Reproduct Update 1998; 4(5): 696-701.

25) Dmowski WP: Teoria deficytu immunologicznego w etiopatogenezie endometriozy z perspektywy 25 lat. Ginekologia po Dyplomie 2006; 5: 28-36.

26) Siristatidis C, Nissotakis C, Chrelias C: Immunological factors and their role in Genesis and development of endometriosis. J Obstet Res 2006; 32: 162-70.

27) Maybin JA, Critchley HO: Menstrual physiology: implications for endometrial pathology and beyond. Hum Reprod Update 2015; 21(6): 748-61.

28) Pasoto SG, Abrao MS, Viana VS: Endometriois and systemic lupus: a comperative evaluation of clinical manifeastation and serological autoimmune phenomena. Am J Reprod Immunol 2005; 53: 85-93.

29) Taylor PV, Maloney MD, Campbell JM: Autoreactivity in women with endometriosis. Br J Obstet Gynecol 1991; 98: 680-4.

30) Bruner KL, Matrisian LM, Rodgers WH et al.: Suppresion of matrix metaloproteinases inhibits establishment of ectopic lesions by human endometrium in nude mice. J Clin Invest 1997; 99: 2851-7.

31) Sillem M, Hahn U, Coddington CC et al.: Ectopic growth of endometrium depends on its structural integrity and proteolytic activity in the cynomolgous monkey (Macaca fascicularis). Fertil Steril 1996; 66: 468-73.

32) Van Langendonct A, Casanas-Roux F, Donnez J: Oxaditive stress and peritoneal endometriosis. Fertil Steril 2002; 77: 861-70.

33) Zhang R, Wild RA, Ojago M: Effect of tumor necrosis factor-alfa on adhesion of hyman endometrial cells to peritoneal mesothelial cells: an in vitro system. Fertil Steril 1993; 59: 1196-201.

34) Chug H, Lee J, Moon H et al.: Matrix metaloproteinase-2, membranous, membranous type 1 matrix metaloproteinase and tissue inhibitor of metaloproteinase – 2 expression in ectopic and eutopic endometrium. Fertil Steril 2002; 4: 787-95.

35) Donnez J, Smoes P, Gillerot S et al.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. Hum Reprod 1998; 13: 1686-90.

36) Kralickova M, Vetvicka V: Immunological aspects of endometriosis: Review Ann Transl Med 2015; 3: 153-157.

37) Kalu E, Sumar N, Giannopoulos T, Patel P, Croucher C, Sherriff E, Bansal A: Cytokine profiles in serum and peritoneal fluid from infertile women with and without endometriosis. J Obstet Gynaecol Res 2007; 33: 490–495.

38) May KE, Conduit-Hulbert SA, Villar J, Kirtley S, Kennedy SH, Becker CM: Peripheral biomarkers of endometriosis: A systematic review. Hum Reprod Update 2010;1 6: 651–674.

39) Sajdak S, Moszyński R: Współczesne metody leczenia endometriozy. Przegląd Ginekologiczno-Położniczy 2006; 6(1): 3-9.

40) Szyłło K, Górski J: Endometrioza – rozpoznanie, leczenie według współczesnych rekomendacji. Prz Menopauzalny 2011; 15: 464-8.

41) Leyland N, Casper R, Laberge P, Singh SS: Endometriosis: diagnosis and management. J Obstet Gynaecol Can 2010; 32 (7 Suppl 2): S1-32.

42) Sobstyl M, Tkaczuk-Włach J, Jakiel G: Farmakologiczne leczenie endometriozy. Prz Menopauzalny 2010; 3: 194-197.

43) Kulp JL Taylor HS: Nowe teorie dotyczące przyczyn powstawania i leczenia endometriozy. Ginekologia po Dyplomie 2009; 62(4): 12-18.

44) D'Hooghe TM, Cuneo S, Nugent N, Chai D et al.: Recombinant human TNF binding protein-1 (r-hTBP-1) inhibits the development of endometriosis in baboons: a prospective, randomized, placebo-and drug-controlled study. Fertil Steril 2001; 76(suppl.): S3.

45) Cabasag CJ, Fagan PJ, Ferlay J, Vignat J, Laversanne M, Liu L, van der Aa MA, Bray F, Soerjomataram I: Ovarian cancer today and tomorrow: A global assessment by world region and Human Development Index using GLOBOCAN 2020. Int J Cancer 2022; 151(9): 1535-1541.

46) Krajowy rejestr nowotworów - http://onkologia.org.pl/.

47) Wells TS: Diseases of the ovaries: their diagnosis and treatment. J and A Churchil, London 1872.

48) Dubeau L: The cel of origin of ovarian epithelial tumors and the ovarian Surface epithelium dogma: does the emperor have no clothes? Gynecol Oncol 1999; 72: 437-442.

49) Nowak-Markwitz E, Spaczyński M: Rak jajnika – nowe spojrzenie na pochodzenie i histiogenezę. Ginek Pol 2012; 83: 454-457.

50) Nelson HD, Huffman LH, Fu R et al.: Genetic risk assessment and BRCA mutation testing for breast and ovarian cancer susceptibility: systematic evidence review for the U.S. Ann Intern Med 2005; 143(5): 362-7 9.

51) Auersperg N, Ota T, Mitchell GW: Early events in ovarian epithelicarcinogenesis: progress and problems in experimental approaches. Int J Gynecol Cancer 2002; 12(6): 691-703.

52) Globocan 2012, http://globocan.iarc.fr/

53) Ries LA: Ovarian cancer. Survival and treatment differences by age. Cancer 1993; 71(2 Suppl): 524-9.

54) Moorman PG, Palmieri RT, Akushevich et al.: Ovarian cancer risk factor in African - American and white woman. Am J Epidemiol 2009; 170: 598-606.

55) Venn A. Watson L. Lumley J et al.: Breast and ovarian cancer incidence after fertility and in vitro fertilization. Lancet 1995; 346: 99-100.

56) Franceschi S, Pazzini F, Neggri E, Both M et al.: Pooled analysis of 3 European cases control studies of ovarian cancer: III. Oral contraceptive use. Int J Cancer 1991; 49: 61-65.

57) Beral V, Million Woman Study Colaborators, Bull D, Green J, Reeves G: Ovarian cancer and hormon replacement therapy in Million Woman Study. Lancet 2007; 369: 1703-1710.

58) Brinton LA, Gridley L, Persson I, Baron J, Bergqvist A: Cancer risk after a hospital discharge diagnosis of endometriosis. Am J Obstet Gynecol 1997; 176: 572-9.

59) Ness RB, Grisso JA, Cottreau C et al.: Factors related to inflamation of the ovarian epithelium and risk of ovarian cancer. Epidemiology 2000; 11: 111-7.

60) Worley MJ, Welch WR, Berkowitz RS et al.: Endometriosis-associated ovarian cancer: a review of pathogenesisInt. J Mol Sci 2013; 14(3): 5367-5379.

61) Riman T, Dickam PW, Nilsson S et al.: Some life-style factors and the risk of invasive epithelial ovarian cancer in Swedish woman. Eur J Epidemiol 2004; 19(11): 1011-1019.

62) Heintz APM, Odicino F, Maisonneuve P et al.: Carcinoma of the ovary. International Journal of Gynecology and Obstetrics 2006; 95,S1: 161-192.

63) Ginekologia onkologiczna pod red. Janina Markowska i Radosław Mądry. MedPharm Polska, 2008; 182-184.

64) Manyś G: Czynniki prognostyczne w raku jajnika. Markowska J (red): Ginekologia Onkologiczna Urban & Partner, Wrocław 2006; 847-855.

65) Brun JL, Feyler A, Chêne G et al.: Long-term results and prognostic factors in patients with epithelial ovarian cancer. Gynecol Oncol 2000; 78(1): 21-7.

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

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

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

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

70) Sato S, Yokohama Y, Sakamoto T, Masayuki F: Usefulness of mass screening of ovarian carcinoma using transvaginal ultrasonograpy. Cancer 2000; 89,3: 582-588.

71) Timmerman D, Ameye L, Fischerova D, Epstein E i wsp.: Simple ultrasoun rules in distinquis between benign and malignant adnexal masses before surgery: prospective validation by IOTA group. BMJ 2010; 341: c6839.

72) Rustin GJ, Quinn M, Tigpen T et al.: New guidlans to evaluate the respons to treatment in solid tumors (ovarian cancer). J Nat Cancer Int 2004; 96: 487-488.

73) Huy NVQ, Khoa VV, Tam LM et al.: Standard and optimal cut-off values of serum ca-125, HE4 and ROMA in preoperative prediction of ovarian cancer in Vietnam. Gynecol Oncol Rep 2018; 25: 110-114.

74) Bast RC, Knap RC: Use of the CA125 antigen in diagnosis and monitorin of ovarian cancer. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1995; 129: 354-356.

75) Santillan A, Garg R, Zahurak ML et al.: Risk of epthelial ovarian cancer reccurens in patient with rising serum CA125 within the normal range. J Clin Oncol 2005; 23: 9338-9343.

76) Yin BW, Lloyd KO: Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antygen: Identification as a new mucin, MUC16. J Biol Chem 2001; 276(29): 27371-27375.

77) Perez BH, Gipson IK: Focus on Molecules: Human mucin MUC16. Exper Eye Res 2008; 87(5): 400-401.

78) Bouanene H, Miled A: Conflicting views on the molecular structure of the cancer antigen CA125/MUC16. Disease Marker 2010; 28(6): 385-94.

79) Comamala M, Pinard M, Theriaut C et al.: Downregulation of cel Surface CA125/MUC16 induces epithelial-tomesenchymal transition and restors EGFR signaling in NIH: OVCAR3 ovarian carcinoma cells. BR J Cancer 2011; 104(6): 989-989.

80) Bast RC Jr, Spriggs DR: More than a biomarker: CA125 may contribute to ovarian cancer patogenesis. Gynecol Oncol 2011; 121: 429-430.

81) Bast RC Jr, Feeney M, Lazarus H et al.: Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. J Clin Investig 1981; 68(5): 1331–1337.

82) Scholler N, Urban N: CA125 in Ovarian Cancer. Biomark Med 2007; 1(4): 513–523.

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

84) Skaznik-Wikiel ME, Sukumvanich P, Beriwal S i wp.: Possible use of CA125 level normalization after third chemiotherapy cycle in deciding on chemiotherapy regimen in patient with epithelia ovarian cancer. Int J Gynecol Cancer 2011; 21: 1013-107.

85) Rustin GJ, van der Burg ME, Berek JS: Advanced ovarian cancer. Tumour markers. Ann Oncol 1993; 4 Suppl 4: 71-7.

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

87) Zheng X, Chen S, Li L et al.: Evaluation of HE4 and TTR for diagnosis of ovarian cancer: Comparison with CA-125. J Gynecol Obstet Hum Reprod 2018; 47(60): 227–230.

88) Bingle L, Singleton V, Bingle CD: The putative ovarian tumor marker gene HE4(WFD2), is expressed in normaltissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms. Oncogene 2002; 21: 2768-2773.

89) Chhikara N, Saraswat M, Sharmistha Dey T, Singh S, Yadav S: Human Epididymis Protein-4 (HE-4): A novel Cross - Class Protease Inhibitor". PLoS One 2012; 7(11): 1-12.

90) Kirchhoff C, HabbenI, Ivell R et al.: A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. Biol Reprod 1991; 45: 350-357.

91) Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y et al.: Human epididymis protein 4(HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometroid ovarian carcinomas. Cancer Res 2005; 65: 2162-2169.

92) Hellstrom I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M et al.: The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker of ovarian carcinoma. Cancer Res 2003; 63: 3695-3700.

93) Hertlein L, Stieber P, Kirschenhofer A et al.: Human epididymis protein 4 (HE4) in benign and malignat diseases. Clin Chem Lab Med 2012; 50: 2181-8.

94) Moore RG, Brown AK, Miller MC et al.: The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mas. Gynecol Oncol 2008; 108: 402-408.

95) Huhtinen K, Suvitie P, Hiissa J et al. Serum He4 concentration differentiates malignant ovarian tumors from ovarian endometriotic cysts. Br J Cancer 2009; 100: 1315-1319.

96) Moore RG, Brown AK, Miller MC et al.: Utility of a novel serum tumor biomarker HE4 in patients with endometroid adenocarcinoma of the uterus. Gynecol Oncol 2008; 110: 196-201.

97) Anastasi E, Marchei GG, Viggiani V et al.: HE4: a new potential early biomarker for the reccurencee of ovarian cancer. Tumour Biol 2010; 31: 113-119.

98) Wu J, Fu Z, Yan F, Ju H: Biomedical and clonical applications of immunoassay and immunosensors for tumor markers. Trends Anal Chem 2007; 26: 679-688

99) Sehgal PB, Zilberstein A, Ruggieri RM et al.: Human chromosome 7 carries the beta 2 interferon gene. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83(14): 5219-22.

100) Yasukawa K, Hirano T, Watanabe Y, Muratani K, Matsuda T, Nakai S, Kishimoto T: Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. EMBO J 1987; 6(10): 2939-45.

101) Hirano T, Yasukawa K, Harada H et al.: Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. Nature 1986; 324(6092): 73-76.

102) ELISA technical guide. IDEXX Laboratories, 2010. /Tech tip #65. ELISA technical guide and protocols. Thermo Fisher Scientific 2010.

103) Engvall E, Perlmann P: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry 1971; 8 (9): 871-874.

104) Bosterbio. Antibodies and ELISA Experts: ELISA Handbook. Principle, troubleshooting, sample preparation and assay protocols (www.bosterbio.com/media/pdf/ELISA_Handbook.pdf; 13.02.2018 r.)

105) Crowther JR: The ELISA Guidebook: Methods in Molecular Biology 2001; 149: 1-421.

106) Technical guide for ELISA. KPL 2013.

107) Ferens-Sieczkowska M, Kątnik-Prastowska I: Immunoenzymatyczne testy fazy stałej. [W:] Immunochemia w biologii medycznej. Metody badawcze. Pod red. I. Kątnik-Prastowskiej, Warszawa 2009, 106-126.

108) Vin A: Indirect ELISA. [W:] ELISA. Methods and protocols. Pod red. R.M. Hnasko. Methods in Molecular Biology 2015; 1318: 51-59.

109) Bosterbio. Antibodies and ELISA Experts: ELISA Handbook. Principle, troubleshooting, sample preparation and assay protocols www.bosterbio.com/media/pdf/ELISA_Handbook.pdf; 13.02.2018 r.

110) Crowther JR: The ELISA Guidebook. Methods in Molecular Biology 2001; 149: 1-421.

111) Stanker LH, Hnasko RM: A double-sandwich ELISA for identification of monoclonal antibodies suitable for sandwich immunoassays. [W]: ELISA. Methods and protocols. Pod red. R.M. Hnasko. Methods in Molecular Biology 2015; 1318: 69-78.

112) Odrowąż–Sypniewska G, Czerski T: Nowe metody diagnostyki molekularnej w badaniach epidemiologicznych. Laboratorium – Przegląd ogólnopolski 2004; 6: 36-38.

113) Dębińska-Kieć A, Naskalski J: Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. Wrocław 2002, 59-106.

114) Cinquanta L, Fontana DE, Bizzaro N: Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection?", Autoimmun Highlights 2017; 8: 1-9.

115) https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/elecsys-he4-humanepididymal-protein-4.html

116) https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/elecsys-il-6.html

117) Kern P, Kron M, Hiesche K: Measurement of Antinuclear Antibodies: Assessment of Different Test Systems. Clin Diagn Lab Immunol 2000; 7(1): 72–78.

118) Shariatifar H, Hakhamaneshi M-S, Abolhasani M, Ahmadi FH: Immunofluorescence labeling of the tumor marker CD20 with quantum dots for the rapid and quantitative detection of diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma. J Cell Biochem 2019; 120(3): 4564-4572.

119) Chen C, Peng J, Xia He-S et al.: Quantum dot immunofluorescence technology to quantify HER2 expression in breast cancer. Biomaterials 2009; 30(15): 2912-2918.

120) Thevenot D, Toth K, Dust R: Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification (Technical Report), Pure and Applied Chemistry. 1999; Vol. 12: 2333–2348.

121) Rodriguez-Mozaz S, López de Alda MJ, Marco MP, Barcelo D: Biosensors for environmental monitoring. A global perspective. Talanta 2005; 65(2): 291–297.

122) Tothill IE: Biosensors for cancer markers diagnosis. Semin Cell Dev Biol 2009; 20(1): 55–62.

123) Delvaux M, Demoustier-Champagne S: Immobilisation of glucose oxidase within metallic nanotubes arrays for application to enzyme biosensors. Biosensors and Bioelectronics 2003; 18(7): 943-951.

124) Chambers JP, Arulanandam BP, Matta LL, Weis A, Valdes JJ: Biosensor recognition elements. Curr Med Chem 2008; (10): 1-12.

125) Sankiewicz A, Puzan B, Gorodkiewicz E: Bioczujniki SPRI – narzędzie diagnostyczne przyszłości. CHEMIK 2014; 68 (6): 528–535.

126) Szymańska B, Lukaszewski Z, Hermanowicz - Szamatowicz K, Gorodkiewicz E: A biosensor for determination of the circulating biomarker CA125/MUC16 by Surface Plasmon Resonance Imaging. Talanta 2020; 206: 120-187.

127) Meuleman C, Vandenabeele B, Fieuws S, Spiessens C, Timmerman D, D'Hooghe T: High prevalence of enometriosis in infertile women with normal ovulation and normospermic partners. Fertil Steril 2009; 92(1): 68-74.

128) Zondervan KT, Becker CM, Missmer SA: Endometriosis N Engl J Med 2020; 382(13): 1244-1256.

129) Culley L, Law C, Hudson N, Denny E, Mitchell H, Baumgarten M, Raine-Fenning: The social and psychological impact of endometriosis o women's lifes: a critical narrative review. Hum Reprod Update 2013; 19(6): 625-39.

130) Zondervan KT, Becker CM, Koga K, Missmer SA et al.: Endometriosis. Nat Rev Dis Primers 2018; 4(1): 9.

131) Li R, Feng F, Chen ZZ, Bai et al: Sensitive detection of carcinoembryonic antigen using surface plasmon resonace biosensor with gold nanoparticles signal amplification. Talanta 2015; 140: 143-149.

132) Szymanska B, Lukaszewski Z, Zelazowska-Rutkowska B, Hermanowicz-Szamatowicz K, Gorodkiewicz E: An SPRi Biosensor for Determination of the Ovarian Cancer Marker HE4 in Human Plasma. Sensors (Basel) 2021; 21(10): 3567

133) Szymańska B, Lukaszewski Z, Oldak L, Zelazowska – Rutkowska B, Hermanowicz-Szamatowicz K, Gorodkiewicz E: Two Biosensors for the Determination of Interleukin - 6 in Blood Plasma by Array SPRi. Biosensors 2022; 12: 412

134) Gorodkiewicz E, Sankiewicz A, Laudański P: Surface plasmon resonance imaging biosensors for aromatase based on a potent inhibitor and specific antibody: Sensor development and amplification for biological material. Cent Eur J Chem 2014; 12: 557-567.

135) Pittway DE: Endometriosis. Obstet Gynecol Clin North Am 1989; 16: 237-252.

136) Bonifacio VDB: Ovarian cancer biomarkers: Moving forward in early detection. Adv Exp Med Biol 2020; 1219: 355-363.

137) Dochez V, Caillon H, Vaucel E, Dimet J, Winer N, Ducarme G: Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA 125, HE 4, RMI and ROMA: a review. J Ovarian Res 2019; 12: 28-37.

138) Machairiotis N, Vasilakaki S, Thomakos N: Inflamatory mediators and pain in endometriosis: A systematic review. Biomedicines 2021; 8: 54-63.

14. SPIS RYCIN

Rycina 1. Schemat – odmiany testu ELISA.

Rycina 2. Schematyczna budowa biosensora.

Rycina 3. Stanowisko do pomiarów SPRI.

Rycina 4. Schematyczna budowa biosensorów SPRI oraz schemat pomiaru.

Rycina 5. Rozkład stężeń markera CA125 dla próbek kontrolnych oraz dla materiału biologicznego pacjentek z torbielą endometrialną o różnym czasie po resekcji torbieli (A - przed operacją; B - 6h po operacji wycięcia torbieli; C - 24h po operacji wycięcia torbieli). Pomiary wykonano na aparacie SPRI.

Rycina 6. Rozkład stężeń markera CA125 dla próbek kontrolnych oraz dla materiału biologicznego pacjentek z rakiem jajnika o różnym czasie po resekcji guza. (A - przed operacją; B - 6h po operacji wycięcia guza jajnika; C - 24h po operacji wycięcia guza jajnika). Pomiary wykonano na aparacie SPRI.

Rycina 7. Rozkład stężeń markera HE4 próbek kontrolnych oraz materiału biologicznego pacjentek z torbielą endometrialną o różnym czasie po resekcji torbieli (A - przed operacją; B - 6h po operacji wycięcia torbieli; C - 24h po operacji wycięcia torbieli). Pomiary wykonano na aparacie SPRI.

Rycina 8. Rozkład stężeń HE4 dla próbek kontrolnych oraz dla materiału biologicznego pacjentek z rakiem jajnika o różnym czasie po resekcji guza. (A - przed operacją; B - 6h po operacji wycięcia guza jajnika; C - 24h po operacji wycięcia guza jajnika). Pomiary wykonano na aparacie SPRI.

Rycina 9. Rozkład stężeń interleukiny 6 próbek kontrolnych oraz materiału biologicznego pacjentek z torbielą endometrialną o różnym czasie po resekcji torbieli (A - przed operacją; B - 6h po operacji wycięcia torbieli; C - 24h po operacji wycięcia torbieli) Pomiary wykonano na aparacie SPRI.

Rycina 10. Rozkład stężeń intereleukiny 6 oznaczanych metodą biosensora u pacjentek leczonych z powodu raka jajnika o różnym czasie po resekcji guza jajnika (A - przed operacją; B - 6h po operacji wycięcia guza jajnika; C - 24h po operacji wycięcia guza jajnika) w porównaniu do grupy kontrolnej.

Rycina 11. Dodatnia korelacja pomiędzy oznaczeniami CA125 w surowicy krwi pacjentek z torbielą endometrialną uzyskanych metodą SPRI i testem standardowym (Architect CA125 test) - korelacja Spearmana.

Rycina 12. Dodatnia korelacja pomiędzy oznaczeniami CA125 za pomocą biosensora i metodą tradycyjną w przypadkach raka jajnika – korelacja Pearsona.

Rycina 13. Dodatnia korelacja pomiędzy wynikami stężenia markera HE4 w surowicy pacjentek uzyskanych metodą biosensora SPRI i testem standardowym ((Elecsys HE4 test na analizatorze COBAS E-411) w przypadkach torbieli endometrialnej – korelacja Pearsona.

Rycina 14. Dodatnia korelacja pomiędzy wynikami stężenia markera HE4 w surowicy krwi pacjentek z rakiem jajnika uzyskanych metodą SPRI i testem standardowym (Elecsys HE4 test na analizatorze COBAS E-411) – korelacja Pearsona

Rycina 15. Dodatnia korelacja pomiędzy wynikami stężenia markera IL-6 w osoczu krwi pacjentek z torbielą endometrialną jajnika uzyskanych metodą SPRI i testem standardowym (Elecsys IL-6 test na analizatorze COBAS E-411) – korelacja Pearsona.

Rycina 16. Dodatnia korelacja pomiędzy oznaczeniami stężenia interleukiny 6 u pacjentek z rakiem jajnika uzyskanych metodą SPRI i testem standardowym (Elecsys IL-6 test na analizatorze COBAS E-411) – korelacja Pearsona.

15. SPIS TABEL

Tabela 1. Minimalne i maksymalne wartości CA125 oraz pozostałe parametry u pacjentek z torbielami endometrialnymi i w grupie kontrolnej uzyskane w trakcie analizy statystycznej.

Tabela 2. Minimalne i maksymalne wartości CA125 oraz pozostałe parametry u pacjentek z rakiem jajnika i w grupie kontrolnej uzyskane w trakcie analizy statystycznej.

Tabela 3. Średnie stężenia HE4 oraz pozostałe parametry u pacjentek z torbielami endometrialnymi i w grupie kontrolnej uzyskane w trakcie analizy statystycznej.

Tabela 4. Średnie stężenia HE4 oraz pozostałe parametry u pacjentek z rakiem jajnika i w grupie kontrolnej uzyskane w trakcie analizy statystycznej.

Tabela 5. Średnie stężenia interleukiny 6 oraz pozostałe parametry u pacjentek z torbielami endometrialnymi i w grupie kontrolnej uzyskane w trakcie analizy statystycznej.

Tabela 6. Średnie stężenia interleukiny 6 oraz pozostałe parametry u pacjentek z rakiem jajnika i w grupie kontrolnej uzyskane w trakcie analizy statystycznej.

16. PODZIĘKOWANIA

Dziękuje wszystkim, bez których nie powstałaby ta praca, a szczególnie:

Panu Prof. dr hab. n. med. Sławomirowi Wołczyńskiemu, mojemu promotorowi, za nadzór naukowy i merytoryczny nad pracą,

Pani Prof. dr hab. Ewie Gorotkiewicz za udostępnienie i pomoc w opracowaniu wyników oraz pomoc merytoryczną nad częścią dotyczącą biosensorów,

Dr hab. n. farm. Justynie Hermanowicz za pomoc w opracowaniu statystyki,

Dr hab. n. med. Mariuszowi Kuźmickiemu za pomoc i możliwość zebrania materiału do pracy doktorskiej,

Dr n. med. Bogumile Czartoryskiej - Arłukowicz za nieustanną i niestrudzoną motywację do pracy,

jednak przede wszystkim

Mężowi

za cierpliwość, miłość i nieocenione wsparcie duchowe i merytoryczne.