

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**ARTEJA ANDOLJŠEK**

**DOLOČANJE TUMORSKEGA OZNAČEVALCA HE4 PRI RAKU JAJČNIKA  
OZIROMA ENDOMETRIJA**

**DIPLOMSKA NALOGA**

Ljubljana, 2010

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

ARTEJA ANDOLJŠEK

**DOLOČANJE TUMORSKEGA OZNAČEVALCA HE4 PRI RAKU JAJČNIKA  
OZIROMA ENDOMETRIJA**

DETERMINATION OF TUMOUR MARKER HE4 IN OVARIAN AND  
ENDOMETRIAL CANCER

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljala pod vodstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem., na Inštitutu za klinično kemijo in biokemijo, v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani. Meritve so bile opravljene na Ginekološki kliniki, v Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani.

Zahvaljujem se prof. dr. Jošku Osredkarju za koristne napotke in pomoč pri nastajanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi prof. dr. Janji Marc in asist. dr. Anamariji Zega za njune koristne pripombe po pregledu diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi vsem mojim najbližjim, moji družini za vso podporo in finančno pomoč pri študiju, prijateljem, sošolcem in vsem, ki so kakorkoli pripomogli k nastanku moje diplomske naloge.

**IZJAVA:**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., višjega svetnika.

Ljubljana, junij 2010

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Janja Marc

Članica diplomske komisije: doc. dr. Anamarija Zega

## KAZALO VSEBINE

<b>POVZETEK</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VI</b>
<b>KAZALO SLIK</b> .....	<b>VII</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b> .....	<b>VIII</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV IN KRATIC</b> .....	<b>IX</b>
<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 RAK JAJČNIKA</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1.1 EPIDEMIOLOŠKI DEJAVNIKI IN MEHANIZEM NASTANKA</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1.2 DEDNI DEJAVNIKI</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1.3 DEJAVNIKI OKOLJA</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1.4 HORMONSKI DEJAVNIKI IN REPRODUKTIVNE LASTNOSTI</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1.5 TEORIJE NASTANKA RAKA JAJČNIKA</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1.5.1 OVULACIJSKA TEORIJA</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1.5.2 GONADOTROPINSKA TEORIJA</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1.5.3 GENETSKA TEORIJA</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1.6 HISTOLOŠKE VRSTE EPITELIJSKIH TUMORJEV JAJČNIKOV</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1.7 STOPNJA DIFERENCIACIJE</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1.8 OPREDELITEV STADIJEV PRIMARNIH TUMORJEV JAJČNIKOV</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1.9 KLINIČNA SLIKA IN DIAGNOSTIKA</b> .....	<b>8</b>
<b>1.2 RAK ENDOMETRIJA (RAK MATERNIČNEGA TELESA)</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2.1 RAK ENDOMETRIJA IN STEROIDNI HORMONI</b> .....	<b>12</b>
<b>1.2.2 EPIDEMIOLOŠKI DEJAVNIKI IN MEHANIZEM NASTANKA</b> .....	<b>13</b>
<b>1.2.3 KLASIFIKACIJA RAKA ENDOMETRIJA</b> .....	<b>13</b>
<b>1.2.4 KLINIČNA SLIKA IN DIAGNOSTIKA</b> .....	<b>14</b>
<b>1.2.5 ENDOMETRIOZA</b> .....	<b>14</b>

<b>1.3 TUMORSKI OZNAČEVALCI</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3.1 METODE DOLOČANJA TUMORSKIH OZNAČEVALCEV</b> .....	<b>16</b>
1.3.1.1 RADIOIMUNSKA METODA (RIA).....	17
<b>1.3.2 CA 125</b> .....	<b>17</b>
1.3.2.1 METODA DOLOČANJA CA 125.....	18
1.3.2.1.1 KEMILUMINISCENČNA METODA.....	18
<b>1.3.3 TUMORSKI OZNAČEVALEC HE4 (WFDC2)</b> .....	<b>19</b>
1.3.3.1 ODKRITJE HE4.....	21
1.3.3.2 IZRAŽANJE HE4.....	21
1.3.3.3 IMUNOHISTOKEMIJA.....	24
<b>2. NAMEN DELA</b> .....	<b>26</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEL</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1 VZORCI</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2 METODA</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2.1 ENCIMSKO-IMUNSKA METODA (ELISA)</b> .....	<b>28</b>
3.2.1.1 NAMEMBNOST METODE.....	30
3.2.1.2 PRINCIP METODE.....	30
3.2.1.3 POSTOPEK METODE.....	31
3.2.1.4 NATANČNOST METODE.....	31
3.2.1.5 MEJA DETEKCIJE.....	32
3.2.1.6 OBČUTLJIVOST METODE.....	32
3.2.1.7 PRIDOBITEK DODATKA (RECOVERY).....	33
3.2.1.8 LINEARNOST REDČENJA.....	34
3.2.1.9 ANALITIČNA SPECIFIČNOST.....	36
3.2.1.10 POTENCIALNO MOTEČA KLINIČNA STANJA.....	37
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>38</b>
<b>5. RAZPRAVA</b> .....	<b>43</b>
<b>6. SKLEP</b> .....	<b>46</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>47</b>

## **POVZETEK**

Rak jajčnika in endometrija sta zelo pomembni obliki raka pri ženskem reproduktivnem sistemu. Rak endometrija je najpogostejši malignom ženskih spolovil, rak jajčnika pa je na tretjem mestu in že mnoga leta tisti, zaradi katerega umre največ bolnic. Visoka umrljivost pri raku jajčnika in endometrija, se lahko povezuje z dejstvom, da se bolezen največkrat odkrije v že napredovali obliki, bolnice pa so večinoma starejše od 50 let. Zato je zelo pomemben razvoj diagnostičnih metod in čim prejšnje in uspešnejše odkrivanje zgodnjega raka jajčnika in endometrija. Najbolj obetavni metodi za odkrivanje raka jajčnika in endometrija sta ultrazvok in določanje tumorskega označevalca CA 125 in HE4. V serumih pacientk smo določali človeški obmodni protein 4 (HE4), ki je tumorski označevalec pri raku jajčnika in endometrija. HE4 je majhen cirkulirajoči peptid, serumska koncentracija tumorskega markerja HE4 je povišana pri bolnicah s karcinomom jajčnika in endometrija. Protein HE4 potuje iz rakastih celic jajčnika v krvni obtok, kjer ga lahko detektiramo. Izražanje HE4 pri normalnih tkivih jajčnika ali benignih tumorjih je zelo nizka. Zadnje študije so pokazale, da je HE4 najboljši marker pri I stopnji raka jajčnika, zato pa se uporablja za detekcijo v zgodnji fazi bolezni in pri bolnicah z velikim tveganjem za nastanek raka jajčnika in endometrija.

V naši raziskavi smo želeli preizkusiti nov tumorski označevalec HE4, ki naj bi bil bolj občutljiv kot do sedaj uporabljeni CA 125. V ta namen smo uvedli določanje tumorskega označevalca HE4 in skušali oceniti klinično učinkovitost označevalca HE4 v primerjavi z CA 125 za odkrivanje raka jajčnika in endometrija. Tumorski označevalec HE4 smo določali z metodo ELISA.

V raziskavo smo vključili 46 bolnic z rakom jajčnika in endometrija. Normalna vrednost HE4 v serumih zdravih žensk je 70 pmol/L, medtem ko je imelo samo 6,5% žensk povišane vrednosti serumske koncentracije HE4. Ker so bile serumske koncentracije označevalca HE4 povišane le pri nekaterih bolnicah (3/46), lahko iz teh rezultatov sklepamo, da je HE4 slabo zanesljiv tumorski označevalec za odkrivanje raka jajčnika oz. endometrija. Vendar pa smo obravnavali izredno majhno skupino bolnic zato tudi nismo dobili pričakovanih rezultatov, zato bodo šele nadaljnje raziskave pokazale pravo vrednost tumorskega označevalca HE4.

Povzamemo lahko, da ima tumorski označevalec HE4 zelo pomembno klinično vlogo v onkologiji, vendar ga ne moremo uporabljati kot samostojno diagnostično metodo za

odkrivanje raka jajčnika in endometrija, saj je še vedno ključnega pomena ginekološki pregled in vaginalna ultrazvočna preiskava.

## **ABSTRACT**

Ovarian and endometrial cancers are very well-spread forms of cancer in a female's reproductive system. Endometrial cancer is the most common malignant tumour found in female genitals. Ovarian cancer is the third most common and has been the most lethal for many years. The high mortality rate concerning ovarian and endometrial cancers is directly linked to the usually late discovery of the tumour, and the patients are mostly over 50 years old. The development of diagnostic methods is thus of high importance with these types of cancer. The most promising methods for discovery of endometrial and ovarian cancers are ultrasound and detection using determining tumour markers CA 125 and HE4. Analysing patients' serum, we determined the human epididymis protein 4 (HE4) which is the tumour marker for endometrial and ovarian cancer. HE4 is a small circulating peptide and its concentration is increased if the patient has ovarian or endometrial carcinoma. It is released from the cancer cells into the blood stream where it can be detected. Its concentration is very low if the ovaries are normal or the tumours are benign. The latest studies show that HE4 marker is most efficient at level I of ovarian cancer and is, therefore, used to detect the tumour in its very early stages with patients that have a high risk of endometrial or ovarian cancer.

In our research, we wished to test the new tumour marker HE4 which is supposed to be a lot more sensitive than the normally used CA 125. With that in mind we tried to assess the clinical efficiency of the HE4 marker compared to the CA 125 one in relation to ovarian and endometrial cancer detection. The tumour marker HE4 was determined with the ELISA method.

Our research involved 46 patients with ovarian and endometrial cancer. The normal value of HE4 in healthy woman's serum is 70 pmol/L. However, only 6,5% (3 out of 46) of the tested patients had an increased level of HE4 serum concentration. Because of that we can conclude the HE4 marker is inefficient and unreliable tumour marker for detecting endometrial or ovarian cancer, but no final conclusion can be made mostly because our research comprised of a very low number of patients. Future researches will show the true value of the HE4 tumour marker. To summarise, HE4 has an important clinical role in oncology but cannot be used as an independent diagnostic method for ovarian and endometrial cancer detection. Gynecologic and vaginal ultrasound procedures are of still of key importance.



## **KAZALO SLIK**

<i>Slika 1: Normalna anatomija jajčnikov.....</i>	<i>2</i>
<i>Slika 2: Rak jajčnika.....</i>	<i>2</i>
<i>Slika 3: Karcinom jajčnika.....</i>	<i>8</i>
<i>Slika 4: Serozni cistom (papilarna struktura) .....</i>	<i>8</i>
<i>Slika 5: Postopek laparoskopije.....</i>	<i>10</i>
<i>Slika 6: Shema ženskega spolnega organa.....</i>	<i>10</i>
<i>Slika 7: Normalni endometrij.....</i>	<i>12</i>
<i>Slika 8: Hiperplazija endometrija.....</i>	<i>12</i>
<i>Slika 9: Rak endometrija.....</i>	<i>12</i>
<i>Slika 10: Endometrioza.....</i>	<i>12</i>
<i>Slika 11: CA 125.....</i>	<i>17</i>
<i>Slika 12: HE4.....</i>	<i>19</i>
<i>Slika 13: Primeri imunske reaktivnosti HE4 označevalca na mikroploščah.....</i>	<i>25</i>
<i>Slika 14: Shema reakcije substrata na katerega deluje encim.....</i>	<i>28</i>
<i>Slika 15: Shema izvedbe testa ELISA za določanje protiteles.....</i>	<i>28</i>
<i>Slika 16: Shema testa ELISA za določanje antigena.....</i>	<i>29</i>
<i>Slika 17: Postopek metode ELISA.....</i>	<i>31</i>
<i>Slika 18: Grafični prikaz s katerim smo prikazali diagnozo pacientk.....</i>	<i>40</i>
<i>Slika 19: Grafični prikaz korelacije rezultatov med serumskimi koncentracijami HE4 in CA 125.....</i>	<i>421</i>

## **KAZALO PREGLEDNIC**

<i>Preglednica I: Najpogostejši vzroki krvavitev iz maternice pri ženskah v pomenopavzi.....</i>	<i>14</i>
<i>Preglednica II: Izražanje HE4 pri normalnih tkivih z uporabo imunohistokemij.....</i>	<i>22</i>
<i>Preglednica III: Izražanje HE4 pri neoplazmah .....</i>	<i>23</i>
<i>Preglednica IV: Natančnost metode ELISA .....</i>	<i>32</i>
<i>Preglednica V: Pridobitek dodatka (recovery) metode .....</i>	<i>33</i>
<i>Preglednica VI: Linearnost redčenja metode.....</i>	<i>35</i>
<i>Preglednica VII: Analitična specifičnost metode .....</i>	<i>36</i>
<i>Preglednica VIII: Potencialno moteča klinična stanja .....</i>	<i>37</i>
<i>Preglednica IX: Rezultati meritev koncentracij tumorskega označevalca CA 125 in HE4 .....</i>	<i>38</i>
<i>Preglednica X: Serumske koncentracije CA 125 pri bolnicah z rakom jajčnika in endometrija.....</i>	<i>39</i>
<i>Preglednica XI: Serumske koncentracije HE4 pri bolnicah z rakom jajčnika in endometrija</i>	<i>40</i>
<i>Preglednica XII: Število primerov pacientk glede na diagnozo.....</i>	<i>41</i>

## SEZNAM OKRAJŠAV IN KRATIC

<b>AM</b>	<i>aritmetična sredina – povprečje</i>
<b>AP</b>	<i>alkalna fosfataza</i>
<b>CA 125</b>	<i>karcinomski antigen 125</i>
<b>CA 72-4</b>	<i>tumor povezani glikoprotein 72-4</i>
<b>CEA</b>	<i>karcinoembrionalni antigen</i>
<b>CT</b>	<i>računalniška tomografija</i>
<b>CV</b>	<i>koeficient variacije</i>
<b>ELISA/EIA</b>	<i>encimsko imunska metoda</i>
<b>FIGO</b>	<i>Mednarodno združenje ginekologov in porodničarjev</i>
<b>FSH</b>	<i>folikel stimulirajoči hormon</i>
<b>HAMA</b>	<i>človeško protitelo proti mišjemu reagentu</i>
<b>HCG</b>	<i>humani horionski gonadotropin</i>
<b>HE4/WFDC2</b>	<i>človeški obmodni protein 4 (4-disulfid)</i>
<b>HER2</b>	<i>človeški epidermalni rastni receptorski faktor 2</i>
<b>HRP</b>	<i>hrenova peroksidaza</i>
<b>HSG</b>	<i>hidroksisteroid dehidrogenaza</i>
<b>IO</b>	<i>induktor ovulacije</i>
<b>LH</b>	<i>luteinizirajoči hormon</i>
<b>LIA</b>	<i>luminometrično-immunska metoda</i>
<b>LOD</b>	<i>meja zaznavnosti</i>
<b>M</b>	<i>srednja vrednost – mediana</i>
<b>MAB</b>	<i>monoklonsko protitelo</i>
<b>MRI</b>	<i>magnetna resonanca</i>
<b>N</b>	<i>celotna skupina pacientk</i>
<b>OKC</b>	<i>oralna kontracepcija</i>
<b>RF</b>	<i>revmatoidni faktor</i>
<b>RIA</b>	<i>radioimunska metoda</i>
<b>RTG</b>	<i>rentgen</i>
<b>SD</b>	<i>standardna deviacija</i>
<b>SE</b>	<i>standardna napaka</i>
<b>SLPI</b>	<i>zaviralec sekretorne levkocitne peptidaze</i>

<b><i>SZO</i></b>	<i>Svetovna zdravstvena organizacija</i>
<b><i>TGF-<math>\beta</math></i></b>	<i>izven celični signalni protein <math>\beta</math></i>
<b><i>UZ</i></b>	<i>ultrazvok</i>

## **1. UVOD**

Ginekološki raki oziroma raki rodil predstavljajo izjemno pogosto obliko raka pri ženskem spolu. Pod tem imenom štejemo vse rake, ki prizadenejo rodila, in sicer rak materničnega telesa, rak materničnega vratu, rak jajcevodov, rak jajčnikov, rak nožnice ter rak zunanjega spolovila. V človeškem telesu se celice delijo in z novimi nadomestijo odmrte. To je normalen proces. Ko pa se zdrava celica spremeni v rakavo, se deli nenormalno hitro, nenadzorovano, tako da nastane tumor (večja celična masa). Tumor lahko pritiska na sosednja tkiva in organe, celice pa se lahko od njega tudi odcepijo in premestijo na nova mesta po telesu, kjer začne iz njih rasti nov tumor (zasevek ali metastaza). Če rak nastane v jajčniku, govorimo o ovarijskem raku, če pa v maternični sluznici (materničnem telesu) pa o endometrijskem raku. Rak jajčnika oziroma endometrija je skupno ime za številne različne bolezni z različno prognozo in pogosto različnim zdravljenjem. Najpomembnejši epidemiološki in biološki dejavniki, ki vplivajo na prognozo bolezni in zdravljenje primarnih rakov jajčnika in endometrija, so histopatološka vrsta tumorja (epitelni in neepitelni), biološka agresivnost (mejno maligni in invazivni) in tumorska masa oziroma razširjenost bolezni (zgodnji stadij in razširjeni stadij).

Rak jajčnika in endometrija sta zelo pomembni obliki raka pri ženskem reproduktivnem sistemu. Rak endometrija je najpogostejši malignom ženskih spolovil, rak jajčnikov pa je po podatkih Registra raka za Slovenijo na tretjem mestu in že mnoga leta tisti, zaradi katerega umre največ bolnic. Stadij bolezni, ostanek tumorja po operaciji in starost bolnice so najpomembnejši dejavniki, ki vplivajo na preživetje. Visoka umrljivost pri raku jajčnikov in endometrija, tako v Sloveniji kot tudi drugod po svetu, se lahko upravičeno povezuje z dejstvom, da se bolezen največkrat, pri kar 75% bolnic, odkrije v že napredovali obliki (stadij III ali IV), bolnice so večinoma starejše od 50 let, zaradi zelo razširjene bolezni pa je popolna makroskopska odstranitev tumorja mogoča le v redkih primerih. Zato je zelo pomemben razvoj diagnostičnih metod in čim prejšnje in uspešnejše odkrivanje zgodnjega raka jajčnika in endometrija. Žal pa presejanje, odkrivanje bolnic med navidez zdravimi ženskami v splošni populaciji, z metodami ali načini, kot jih poznamo danes, ni uspešno, saj ne znižuje umrljivosti (6). Ker zaenkrat ni uspešnega

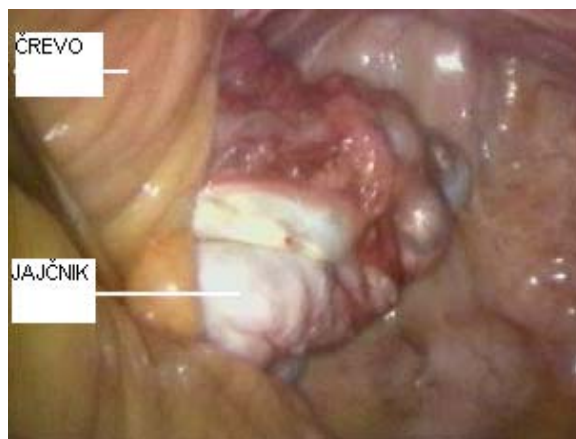
načina zgodnjega odkrivanja raka jajčnika oziroma endometrija, pa je pomembno, da se pozornost usmeri na vse ženske, pri katerih je tveganje veliko in na vse tiste, pri katerih se odkrijejo kakršnekoli sumljive spremembe, saj jim to omogoča ozdravitev ali pa vsaj čim daljše preživetje.

### **1.1 RAK JAJČNIKA**

Gre za maligno obolenje enega ali obeh jajčnikov (7). Nastopa redkeje kot rak na maternici, vendar pa je nevarnejši med malignimi obolenji ženskih spolovil. Nastane najpogosteje med 40-60 letom starosti. Tu gre za maligne tumorje, ki so primarno maligni (epitelni, stromalni in tumor zarodnih celic) ali sekundarni maligni (so posledica zasevanja malignomov endometrija, gastrointestinalni tumorji, dojk). Nastopajo v obliki masivnih, večinoma krhkih bul, ki pa so lahko tudi votlo cistične in dosegaajo velikost glave. Že zelo zgodaj raj enega jajčnika zajame tudi drugi jajčnik tako, da imamo običajno opraviti z rakom obeh jajčnikov. Rak jajčnika razmeroma hitro metastazira po trebušni votlini, čeprav še ni dosegel večje mere. Zasevke najdemo po peritoneju kot večje ali manjše vozličce. Rak jajčnika spremlja tudi eksudat v trebušni votlini, ki se ga lahko nabere za več litrov. Na začetku ženske ne čutijo nobenih simptomov, zato je tudi zgodnje odkrivanje manj uspešno (8). Kasneje nastopijo kravavitve, bolečina v trebuhu, nabrekanje trebuha, tipna zatrdlina v trebuhu, če je tumor velik lahko pritiska na sečni mehur in ga draži, tumor lahko tudi pritiska na prepono in s tem povzroča težave z dihanjem.



**Slika 1:** Normalna anatomija jajčnikov



**Slika 2:** Rak jajčnika

### **1.1.1 EPIDEMIOLOŠKI DEJAVNIKI IN MEHANIZEM NASTANKA**

Večina študij se ukvarja z epidemiologijo invazivnega epiteljskega raka jajčnika, zato je etiologija mejno malignih in neepiteljskih tumorjev še manj znana. Med rizične dejavnike prištevajo genetske in hormonske ter dejavnike okolja. Najpomembnejši od teh naj bi bili: starost, rasa, število ovulacij ter družinska anamneza. Najmanj naj bi bile ogrožene črnke in Japonke, najbolj pa Skandinavke, Kanadčanke in Američanke (4).

### **1.1.2 DEDNI DEJAVNIKI**

Dedni dejavniki naj bi povzročili 5-13 % rakov jajčnika (9). Vsaj 90 – 95 % žensk naj bi imelo sporadično obliko raka, obstajajo pa tudi trije organsko specifični družinski sindromi (povezava raka dojke in jajčnika, jajčnika in kolorektalnega nepolipoznega raka in mestno specifičen rak jajčnika). Značilno za vse tri je zbolevanje pred 50. letom, slabša diferenciranost ter obojestransost (4). Ugotovili so, da se nagnjenost deduje avtosomno dominantno.

### **1.1.3 DEJAVNIKI OKOLJA**

Pri dejavnikih okolja so značilni predvsem smukec (to je kontaminacija, ki razlaga vpliv kemikalij iz okolja), uživanje velikih količin mesa in živalskih maščob.

### **1.1.4 HORMONSKI DEJAVNIKI IN REPRODUKTIVNE LASTNOSTI**

Največ študij se ukvarja z vplivom hormonskih oziroma reproduktivnih dejavnikov na velikost tveganja za razvoj raka jajčnikov:

- nosečnost zmanjšuje tveganje; najbolj zaščitno deluje prva nosečnost in to pred 22. letom. Ena do dve nosečnosti zmanjšata tveganje za 20 % (10). Nosečnost naj bi povzročila trajne posledice v izločanju gonadotropinov zaradi trajno spremenjenega delovanja hipofize (11).
- dojenje; ženska, ki po porodu doji je maksimalno zaščitena (10), na zmanjšanje tveganja vpliva vsak mesec dojenja.
- oralna kontracepcija (OKC); jemanje več kot tri leta, po nekaterih študijah že več kot tri mesece zmanjša tveganje, učinek pa traja še 10 do 15 let po prenehanju (12).

- nuliparnost; zvišuje tveganje za 1.5 do dvakrat (10, 13).
- neplodnost; je dejavnik tveganja, neodvisen od nuliparnosti (11), ki pa tveganje še dodatno poviša (13). Različne študije ugotavljajo povezavo med nezmožnostjo zanositve in rakom jajčnika. Tveganje za mejno maligne in visoko maligne tumorje naj bi bilo do 1.8 do 6.5- krat večje kot pri nuliparah (ženskah, ki še niso rodile), katerih neplodnost še ni bila raziskana (14).

### **1.1.5 TEORIJE NASTANKA RAKA JAJČNIKA**

Obstajajo številne teorije o povezavi raka jajčnika z reproduktivnimi lastnostmi.

Najpomembnejše so ovulacijska, gonadotropinska in genetska teorija (4).

#### **1.1.5.1 OVULACIJSKA TEORIJA**

Že leta 1971 je Fathalla (15) podal hipotezo o povezavi ovulacije z nastankom ovarijske neoplazme. Ta teorija meni, da so številne ovulacije vzročni faktor za razvoj epitelijskega raka jajčnika. Ponavljajoča poškodba epitelijskega tkiva se hitro zaceli zaradi intenzivne celične replikacije, ki jo inducirajo rastni faktorji iz folikularne tekočine. Posledica je povečana proliferacija in število mitotskih figur blizu mesta ovulacije. Lahko nastane tudi t.i. »inkluzijsko telesce« (16, 17), obdano z epitelijskimi celicami, v katerih lahko pride do napake replikacije DNA. Posledica je lahko aktivacija onkogen ali inaktivacija tumor supresor gena (18). Teorijo potrjuje tudi dejstvo, da gre v 80 % primerom za izgubo alela. Balash in Barri (19) dopuščata možnost povezave med ovulacijo in rakom, ki pa ni vzročna. Teorijo podpira tudi ugotovitev, da pred puberteto ter pri bolnikih z gonadno disgenezo (nepravilnim razvojem) zelo redko pride do epitelijskega tipa raka jajčnika (16). Leta 1979 je Casagrande (20) uporabil pojem »ovularna starost«. Meni, da je število ovularnih ciklov med menarho in menopavzo neposredno proporcionalno tveganju za nastanek raka jajčnika. Po tej teoriji torej vse, kar zmanjšuje število ovulacij (nosečnost, dojenje, OKC) deluje zaščitno, vse kar jih povečuje, induktor ovulacije (IO), pa tveganje večja (4).



### **1.1.5.2 GONADOTROPINSKA TEORIJA**

Stadel (21) in Cramer (22) sta opozorila, da so zvišani gonadotropini neposredno ali posredno preko steroidnih hormonov povezani z razvojem novotvorb jajčnika. Epitelij jajčnika je zaradi ovulacije ciklično poškodovan. Večina rakov nastane iz epitelijskega, predvsem iz celic, ki so citološko in histološko podobne peritonealnim (nastale iz celomskega mezotelija) (23). Ta mezotelij je ločen od strome jajčnika, ki proizvaja hormone, z bazalno membrano ter tankim slojem vezivnega tkiva. Po ovulaciji oz. invaginaciji epitela in nastanku epitelijske inkluzije pride do rupture vezivnega tkiva, epitelijska površina ni več ločena od ovarijskega korteksa. Izpostavljena je estrogensko bogati folikularni tekočini (24). Tako mikro okolje je ugodno za celično reprodukcijo, celična poškodba ter rasni faktorji pa k temu še pripomorejo (23). Danes študije kažejo, da imajo na svoji površini tudi FSH in HCG receptorje v nizkih koncentracijah (25) po novejših podatkih pa tudi LH receptorje (26). Poleg neposrednega vpliva je pomemben tudi posredni, saj gonadotropinski stimulus neposredno vpliva na stromo, ki ima veliko FSH receptorjev in je v tesnem stiku z epitelijskimi celicami. Estrogeni, ki stimulirajo epitelij, so stromalnega izvora, njihova proizvodnja pa je odvisna od koncentracije gonadotropinov (23). Nihanje v izločanju gonadotropinov korelirajo z incidenco raka jajčnika glede na starost le da slednji svoj vrh doseže 15 do 20 let kasneje glede na FSH vrh (21). Zdravila za indukcijo ovulacije posredno in neposredno povečujejo koncentracijo cirkulirajočih gonadotropinov in preko tega mehanizma lahko večajo tveganje za nastanek novotvorb (24).

### **1.1.5.3 GENETSKA TEORIJA**

Delovanje jajčnika uravnavajo regulatorji zunaj gonad (FSH, LH) in znotraj gonad (steroidi in gonadni peptidi). Najpomembnejši peptidi v uravnavanju tako delovanja FSH-ja kot v uravnavanju znotraj gonad spadajo k največji družini izvenceličnih signalnih proteinov TGF- $\beta$ . To so inhibini in aktivini (funkcionalno antagonistični proteini s skupno  $\beta$  podenoto), folistatin (aktivin vezavni protein) ter MIS. S poskusi na transgenskih miših so ugotovili, da ima osrednjo vlogo pri nastanku raka jajčnika  $\alpha$  podenota inhibina. Miši pri katerih so z genetsko okvaro povzročili odsotnost  $\alpha$  podenote inhibina so razvile tumorje jajčnika, podobne granuloznim celičnim tumorjem pri mladih ženskah (27). Če

podoben model velja tudi za ljudi je možno, da IO, ki povečuje koncentracijo gonadotropinov povzročijo stromalne tumorje jajčnika, a le pri ženskah z genetsko okvaro inhibina (28).

### ***1.1.6 HISTOLOŠKE VRSTE EPITELIJSKIH TUMORJEV JAJČNIKOV***

Epitelijske ovarijske tumorje razvrščamo po histoloških značilnostih v sedem osnovnih razredov. Mednarodno združenje ginekologov in porodničarjev (International Federation of Gynaecologists and Obstetricians, FIGO) priporoča uporabo razvrščanja po Mednarodni histološki klasifikaciji tumorjev št. 9, ki jo je leta 1973 objavila Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) (30). Med histološkimi vrstami fiziološko ni bistvenih razlik.

Tumor razvrstimo v določen histološki razred glede na celični tip, lokacijo in naravo malignosti. Glede na naravo malignosti ločimo tri vrste tumorjev: benigne, mejno maligne in maligne (invazivne karcinome). Mejno maligni (mejni) tumorji imajo boljšo prognozo od malignih. Jedra mejno malignih celic so spremenjena, opazna je proliferativna aktivnost, ne rastejo pa infiltrativno in destruktivno (1).

#### ***1. SEROZNI CISTOMI IN KARCINOMI***

Ciste so napolnjene s serozno tekočino. Imajo papilarno strukturo. Oponašajo epitelij jajcevoda. Med malignomi so najpogostejši tumorji.

#### ***2. MUCINOZNI CISTOMI IN KARCINOMI***

Izločajo mucin, drugače pa so podobni seroznim. Najpogosteje so benigni v obliki velikih cistomov. Pojavljajo se v vseh treh stopnjah malignosti.

#### ***3. ENDOMETROIDNI TUMORJI***

Posnemajo strukturo endometrija.

#### ***4. SVETLOCELIČNI TUMORJI***

Imajo svetlo citoplazmo.

#### ***5. NEDIFERENCIRANI KARCINOMI***

Tumor je premalo diferenciran, da bi ga lahko uvrstili v katerokoli drugo skupino.

#### ***6. MEŠANI EPITELIJSKI TUMORJI***

Sem se razvrščajo tumorji, ki so sestavljeni iz dveh ali več malignih tumorjev, vendar noben od njih ne prevladuje.

#### ***7. NEKLASIFICIRANI TUMORJI***

Razvrstitev ni bila možna npr. zaradi nekroze, ali pa ni bila opravljena.

### **1.1.7 STOPNJA DIFERENCIACIJE**

Stopnja diferenciacije označuje morfološko sliko tumorskega tkiva. Uporabljamo način razvrščanja (FIGO) (30):

*STOPNJA DIFERENCIACIJE 1:* Dobro diferenciran.

*STOPNJA DIFERENCIACIJE 2:* Zmerno diferenciran.

*STOPNJA DIFERENCIACIJE 3:* Slabo diferenciran ali nediferenciran.

*STOPNJA DIFERENCIACIJE 0:* Stopnje diferenciacije ni bilo mogoče določiti, ali pa ni bila določena.

### **1.1.8 OPREDELITEV STADIJEV PRIMARNIH TUMORJEV JAJČNIKOV**

Stadijev tumorjev jajčnikov ni mogoče določiti le na podlagi kliničnega pregleda in nekaterih preiskav (RTG, UZ, biološki označevalci tumorja). Stadij bolezni je mogoče določiti s kirurškim pregledom trebušne votline (laparatomija ali laparoskopija). Klasifikacij za tumorje jajčnikov je bilo narejenih že nekaj. Od leta 1992 je v veljavi razvrstitev, ki jo je določila Mednarodna zveza ginekologov in porodničarjev (FIGO) (30):

**STADIJ I:** Tumor je omejen na ovarija.

STADIJ Ia: Tumor je omejen na en ovarij; na površini ovarija ni tumorja; ovojnica ni prizadeta. Ascitesa ni.

STADIJ Ib: Tumor je omejen na oba ovarija; na površini ovarijev ni tumorja; ovojnica ni prizadeta. Ascitesa ni.

STADIJ Ic: Enako kot stadija Ia ali Ib, vendar pa je prisotna ena od naslednjih sprememb: tumor na površini ovarija, počena ovojnica, v ascitesu ali peritonealnih izpirkih so maligne celice.

**STADIJ II:** Tumor na enem ali obeh ovarijih, ki se širijo v malo medenico.

STADIJ IIa: Tumor se širi in/ali metastazira v meternico in/ali jajcevoda.

STADIJ IIb: Tumor se širi v druga tkiva male medenice.

STADIJ IIc: Tumor se širi v malo medenico (stadij IIa ali IIb), hkrati pa je prisotna še ena od naslednjih sprememb: tumor na površini ovarija, počena ovojnica, v ascitesu ali peritonealnih izpirkih so prisotne maligne celice.

*Andoljšek A.*

*Določanje tumorskega označevalca HE4 pri raku jajčnika oziroma endometrija*

**STADIJ III:** Tumor na enem ali obeh ovarijih z mikroskopsko dokazanimi metastazami na peritoneju izven male medenice in/ali metastazami v regionalnih bezgavkah. Tudi površinske metastaze na jetrih tumor uvrščajo v stadij III.

STADIJ IIIa: Mikroskopsko potrjene metastaze na površini peritoneja izven male medenice. Regionalne bezgavke niso prizadete.

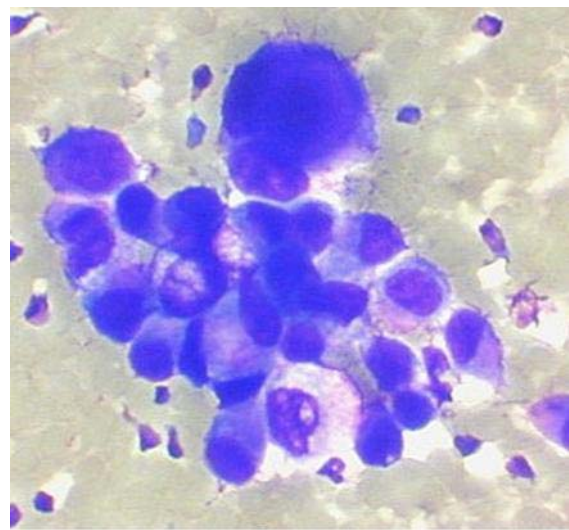
STADIJ IIIb: Metastaza na peritoneju izven male medenice je makroskopska, a ni večja kot 2 cm v svojem največjem premeru. Regionalne bezgavke niso prizadete.

STADIJ IIIc: Metastaza na peritoneju izven male medenice je večja kot 2 cm in/ali metastaza v regionalnih bezgavkah.

**STADIJ IV:** Oddaljene metastaze, metastaze v jetrnem parenhimu uvrščajo tumor v stadij IV. Plevralni izliv mora biti citološko pozitiven, da uvrstimo bolezen v stadij IV.



*Slika 3: Karcinom jajčnika*



*Slika 4: Serozni cistom (papilarna struktura)*

### **1.1.9 KLINIČNA SLIKA IN DIAGNOSTIKA**

Klinično vsi tumorji kažejo zelo podobno. Prevladujejo nespecifični znaki, kot so: bolečine v spodnjem delu trebuha, bolečine v žlički, pogosto uriniranje, spremembe v mesečnem perilu, pred menstrualne bolečine. Ko se bolezen razširi, se začne v trebušni votlini nabirati tekočina, zastajati začneta urin in blato, pojavita se težko dihanje in hujšanje (31).

Diagnostika: Pri diagnostiki je pomembna anamneza, natančen splošen pregled, vaginalni in rektalni ginekološki pregled, ultrazvok abdomna, transvaginalni ultrazvok, priporočljiva

je tudi računalniška tomografija (CT) abdominalna. Nujne so hematološke in biokemične preiskave krvi in določitev vrednosti tumorskega označevalca CA 125 ( $>30$  U/ml označevalca CA 125 - pomeni 58 % verjetnost za bolezen) (32). Pri diagnostiki raka jajčnikov gre za morfološko oceno jajčnikov, ocenjuje se velikost jajčnikov, prisotnost cist in njihova velikost, enostavnost ali kompleksnost, debelina sten, odboji, prisotnost pregrad, papilarnih izrastkov in solidnih vložkov (29). Najobetavnejši in najbolj raziskani metodi pri odkrivanju raka jajčnika sta ultrazvok in serumski marker CA 125. Pri transvaginalnem ultrazvoku se v primerjavi z abdominalnim ultrazvokom lažje morfološko oceni jajčnike. Dopplerjev transvaginalni ultrazvok povečuje specifičnost običajnega transvaginalnega ultrazvoka in temelji na razlikah v izmerjenem krvnem pretoku skozi maligni oziroma benigni tumor jajčnikov. Pomanjkljivost obeh metod je, da niti z določevanjem CA 125 niti s transvaginalnim ultrazvokom ne moremo zanesljivo ločiti zgodnjega raka jajčnika od morebitnih benignih sprememb, še posebno ne pri predmenopavzalnih bolnicah. Pri benignih spremembah gre lahko za benigne ciste jajčnikov, policistično obolenje jajčnikov in endometriozo, pa tudi druge vrste bul v trebušni votlini (1). Prav zaradi premajhne specifičnosti sta metodi neprimerni za odkrivanje raka jajčnikov v splošni populaciji. Za končno diagnozo tako potrebujemo še dodatne preiskave oziroma postopke, najpogosteje laparoskopijo ali laparotomijo. Ko je na osnovi slikovnih in laboratorijskih preiskav velika možnost, da ima bolnica raka jajčnikov je indicirana laparotomija (kirurško odprtje trebuha). Pri mladih ženskah in ko je sprememba najverjetneje benigna, izvid tumorskih označevalcev pa je negativen, je primernejša laparoskopija. Pri slednji se votla igla namesti v trebuh tik pod popek (v narkozi) in skozi to iglo se vnese CO<sub>2</sub>, zato da se trebušna votlina razpne. Laparoskop se zatem namesti skozi drugi vbod in skozenj se pregledajo jajčniki in drugi organi v abdominalni votlini. Omogoča pa tudi oceno operabilnosti in citološko ter histološko potrditev in opredelitev raka jajčnikov (52).

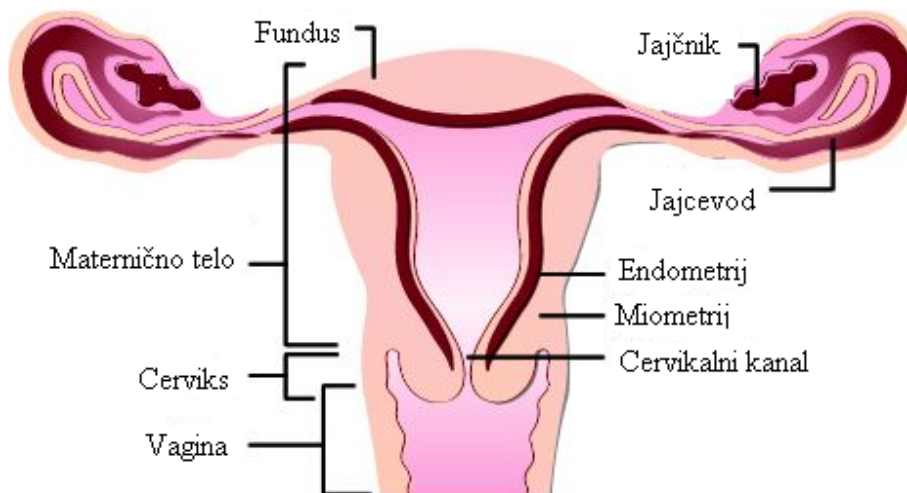
*Andoljšek A.*

*Določanje tumorskega označevalca HE4 pri raku jajčnika oziroma endometrija*



*Slika 5: Postopek laparoskopije*

## **1.2 RAK ENDOMETRIJA (RAK MATERNIČNEGA TELESA)**



*Slika 6: Shema ženskega spolnega organa*

Rak endometrija je najpogostejša maligna ginekološka tvorba pri ženskah, medtem ko je med vsemi malignimi tvorbami na četrtem mestu, s sedmo stopnjo pojavnosti. Redek je pred 30. letom, najpogosteje ga zasledimo po 50. letu. V treh četrtinah primerov je bolezen ob ugotovitvi omejena na maternico. Najpogostejši način širjenja raka endometrija je limfogeno zasevanje. Glede na histološki tip je daleč najpogostejši adenokarcinom. Letne

incidence raka materničnega telesa so po letu 1950 postopno naraščale, nekoliko izrazitejše pa je bilo to naraščanje v zadnjih desetih letih. Petletno preživetje bolnic je odvisno od same stopnje raka. Poznamo štiri stadije raka endometrija: stadij I (75- 90 %), stadij II (60-80%), stadij III (30- 40%) in stadij IV (do 5%). Večino primerov raka materničnega telesa predstavlja rak endometrija. Na drugem mestu so sarkomi, ki se pojavljajo le v 2-6%. Dejavniki tveganja za nastanek raka endometrija so: debelost, diabetes ali motena toleranca na glukozo, neplodnost, hipertenzija, pozna menopavza, jetrne bolezni, estrogen sekretorni tumorji in eksogeni estrogeni. Rak endometrija glede na klinične, patološke in molekularne značilnosti opišemo kot rak endometrija tip I in rak endometrija tip II (41). Raziskave kažejo, da sta oba tipa odvisna od estrogenov.

### ***1. RAK ENDOMETRIJA: TIP I***

70-80% primerov raka endometrija predstavlja tip I. Zanj je značilno, da je dobro ali zmerno diferenciran. Pojavlja se pri mlajših ženskah in ima dobro prognozo. Razvije se iz enostavne, preko kompleksne in atipične hiperplazije. Na ravni DNA se največ sprememb zgodi na tumor supresorskem genu PTEN. Gre za mutacije, bolj redko pa za alelno izgubo. PTEN se nahaja na 10. kromosomu in kodira protein, ki ima tirozin-kinazno aktivnost. Mutacije PTEN povzročijo nenehno aktivacijo fosfatidilinozitol 3-kinazne poti, ki vpliva na apoptozo. Pojavljajo se tudi mutacije onkogene na eksonu 1, kodon 12 in kodon 13, pa tudi na eksonu 2, kodon 61. Značilne so tudi mutacije genov, ki kodirajo proteine, odgovorne za popraviljanje napak pri prepisovanju DNA (41).

### ***2. RAK ENDOMETRIJA: TIP II***

Serozni ali svetlocelični tip raka endometrija se pojavlja predvsem pri starejših ženskah po 60. letu (navadno 5 do 10 let kasneje kot rak endometrija tipa I) in je redek pri mlajših ženskah. Razvije se iz intraepitelijskega adenokarcinoma v atrofičnem endometriju. Je slabo diferenciran. Za tip II so značilne mutacije tumor supresorskega gena p53. Pojavljajo se pri 80-90% žensk, ki imajo ta tip raka endometrija. Mutacije so povezane s prekomernim izražanjem proteina in spadajo med zgodnje dogodke pri kancerogenezi tipa II, saj so jih zaznali že pri intraepitelijskem adenokarcinomu. Značilno je tudi prekomerno

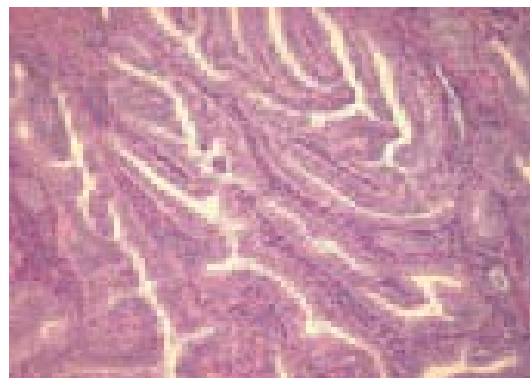
*Andoljšek A.*

*Določanje tumorskega označevalca HE4 pri raku jajčnika oziroma endometrija*

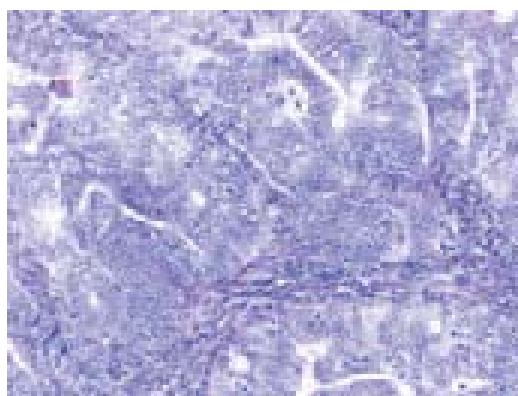
izražanje onkogenega HER-2, ki kodira receptor tirozin-kinaze. Receptor je pomemben pri uravnavanju celične rasti in diferenciacije (41).



*Slika 7: Normalni endometrij*



*Slika 8: Hiperplazija endometrija*



*Slika 9: Rak endometrija*



*Slika 10: Endometrijoza*

### **1.2.1 RAK ENDOMETRIJA IN STEROIDNI HORMONI**

Rak endometrija spada med hormonsko odvisne tipe raka. Mehanizem kancerogeneze hormonsko odvisnih tipov raka vključuje delovanje eksogenih in/ali endogenih hormonov, ki vplivajo na proliferacijo. S povečanim številom celičnih delitev se poveča tudi možnost za naključne genetske napake in s tem verjetnost za nastanek malignega fenotipa (41). Pojavnost malignega fenotipa je odvisna od somatskih mutacij, ki se pojavijo med celično delitvijo. Specifični geni, ki so vpleteni v napredovanje hormonsko odvisnih tipov raka, so geni endokrinih poti, geni, ki so odgovorni za popravljanje napak pri prepisovanju, tumor supresorski geni in onkogeni (42). Steroidne hormone uravnavamo na pred-receptorski



ravni (uravnavanje količine in aktivnosti encimov, ki aktivirajo ali inaktivirajo hormone) in receptorski ravni (uravnavanje količine steroidnih receptorjev).

### ***1.2.2 EPIDEMIOLOŠKI DEJAVNIKI IN MEHANIZEM NASTANKA***

Endometrioza in rak endometrija sta od estrogenov odvisni bolezni, zelo razširjeni v ZDA, zahodni Evropi in Sloveniji. Endometrioza se pojavlja pri 15-20% žensk v reproduktivnem obdobju in je v 30-50% vzrok neplodnosti; rak endometrija pa je tretja najpogostejša oblika raka pri ženskah. Povečana koncentracija estrogenov ob zmanjšani koncentraciji progesteragenov vodi do proliferacije celic endometrija, s tem povečanega števila celičnih delitev in večje možnosti naključnih genetskih napak, ki lahko vodijo v nastanek endometrioze, hiperplazije endometrija in raka endometrija. Uravnavanje biološke aktivnosti estrogenov in progesteragenov poteka na nivoju receptorjev, pa tudi na predreceptorskem nivoju s pomočjo encimov, ki biološko aktivni obliki (estradiol, progesteron) pretvorijo v neaktivni obliki (estron, 20alfa-hidroksiprogesteron) in obratno. Encimi, ki na predreceptorskem nivoju uravnavajo aktivnost estrogenov in progesteragenov so 17 beta hidroksisteroid dehidrogenaze (17 beta-HSD) in 20 alfa-hidroksisteroid dehidrogenaze (20 alfa-HSD).

### ***1.2.3 KLASIFIKACIJA RAKA ENDOMETRIJA***

#### ***STADIJ I***

Ia - tumor omejen na endometriju.

Ib - tumor zajema manj debeline miometrija.

Ic - tumor zajema več debeline miometrija.

#### ***STADIJ II***

IIa – tumor zajema cervikalne žleze.

IIb – tumor prodira v cervikalno stromo.

#### ***STADIJ III***

IIIa – tumor zajema serozo uterusa, adnekse, pozitivna peritonealna citologija.

IIIb – tumor metastazira v vagino.

IIIc - metastaze v medeničnih, paraaortnih bezgavkah.

#### **STADIJ IV**

IVa – invazija (vdor mikroorganizmov) v sluznico mehurja ali rektuma.

IVb - oddaljene metastaze ali razširitev bolezni v abdomnu zunaj male medenice v ingvinalne bezgavke.

#### **1.2.4 KLINIČNA SLIKA IN DIAGNOSTIKA**

Pri klinični sliki raka endometrija se pojavijo naslednji znaki: krvavenje (nekaj let po menopavzi ali pred menopavzo), vodni izcedek, bolečina (pozni simptom zaradi razširitve), povečanje uterusa (maternice).

#### **Preglednica I: Najpogostejši vzroki krvavitev iz maternice pri ženskah v pomenopavzi**

<i>Vzrok krvavitve</i>	<i>Frekvenca [%]</i>
Atrofija endometrija	60-80
Nadomestno hormonsko zdravljenje	15-25
Endometrijski polip	2-12
Hiperplazija endometrija	5-10
Karcinom endometrija	10

Diagnostika: Pri diagnostiki je pomemben ginekološki pregled (spekulum, bris, palpacija maternice ali rektalni pregled), dilatacija in kiretaža, ultrazvočna meritev debeline endometrija, jemanje vzorca endometrija, histeroskopija, rentgen pljuč, ultrazvok abdomna, scintigrafija. Zdravljenje raka endometrija poteka individualno, kirurško zdravljenje, konzilij (ginekolog, radioterapevt, onkolog, patolog). Klasično kirurško zdravljenje obsega histerektomijo, selektivno limfadenektomijo ter odvzem izpirkov iz trebuha za citološko preiskavo.

#### **1.2.5 ENDOMETRIOZA**

Endometrioza je ena izmed najpogostejših benignih patologij ženskega genitalnega trakta (46). Endometrioza je bolezen, pri kateri se endometrijske žleze s stromo pojavljajo tudi izven maternične votline (43). Bolezen je zelo pogosta pri ženskah v plodnem obdobju (41). Ocenjujejo, da endometrioza prizadene okoli 3 - 7% žensk v rodnem obdobju vendar prava incidenca ni znana. Pogosto je endometrioza naključna najdba pri nekaterih ženskah ki ne kažejo nobenih simptomov. Najpogosteje se pojavlja pri ženskah med 30. in 45.

letom starosti. Skoraj nikoli pa je ne najdemo izven rodnega obdobja, saj je endometrij tudi izven maternice stimuliran z istimi ženskimi spolnimi hormoni kot znotraj maternice. Endometriotično tkivo se lahko razraste po celotni peritonealni votlini (jajčnikih, črevesu, mehurju...), bolezenski simptomi so največkrat hude bolečine, v 40% povezane z neplodnostjo (44). Morfološko in histološko ločimo tri oblike endometrioze: peritonealno endometriozo, endometriozo jajčnika in globoko infiltrativno endometriozo (45). Vzrok endometrioze je neznan. Pospešuje jo hormon estrogen, ki je potreben za rast maternične sluznice. Povečana koncentracija estrogenov in/ali zmanjšana koncentracija progesterona sta faktorja tveganja za nastanek. Endometrioza je dedna. Endometriozo lahko nakažejo preiskave kot so ultrazvok, CT ali magnetna resonanca (MRI), vendar pregled ni zanesljiv, ker so področja endometrioze velikokrat premajhna. Edina gotova metoda za odkrivanje endometrioze je laparoskopija. S to metodo lahko vidimo število in lokacijo sprememb. Pri dolgotrajni bolezni je ta postopek lahko težaven zaradi obilnih zarastlin v trebušni votlini.

### **1.3 TUMORSKI OZNAČEVALCI**

Tumorski označevalci so snovi, ki so produkt malignih celic ali snovi, ki so nastale zaradi delovanja malignih celic, njihova koncentracija se pod vplivom malignega procesa poveča, to koncentracijo pa določamo v telesnih tekočinah. Odkrivanje tumorskih označevalcev je zlasti pomembno pri presejanju in zgodnji diagnostiki raka jajčnika, saj je le zgodnja diagnoza pogoj za uspešno zdravljenje. Maligne celice se od nemalignih celic razlikujejo na različnih ravneh (spremenjena morfolologija, fiziologija, rast celic). Razlike lahko uporabljamo za dokazovanje malignih celic in snovi, ki jih pri tem spremljamo, tako imenovanih tumorskih označevalcev. Tako so lahko tumorski označevalci membranski antigeni, hormoni, encimi, nukleozidi.. Tumorske označevalce lahko razdelimo na več načinov: po kemični strukturi, po mestu nastanka in glede na vrsto tumorske bolezni, pri katerih naj bi jih določali. Tumorske označevalce lahko delimo glede na njihove biokemične lastnosti na: onkofetalne proteine, hormone, encime, tumor spremljajoče antigene, posebne serumske proteine in skupino mešanih tumorskih označevalcev (33). Idealni tumorski označevalec bi se moral izločati vedno kadar je tumor prisoten in ne bi ga smeli dokazati pri benignih boleznih. Vendar pa poznamo številne pomanjkljivosti tumorskih označevalcev, to so nezadostna specifičnost za vrsto rakave bolezni, tvorba

*Andoljšek A.*

### ***Določanje tumorskega označevalca HE4 pri raku jajčnika oziroma endometrija***

označevalcev v visokih koncentracijah pri nemalighnih boleznih (vnetja, nemaligne bolezni jeter...), različna fiziološka stanja (nosečnost, menstruacija, laktacija) in tvorba v povsem zdravih tkivih. Z izboljšanjem novih metod pa se je tudi število tumorskih označevalcev povečalo, vendar pa je pri diagnostiki raka jajčnika še vedno najpogosteje uporabljen tumorski označevalec tumorju pridruženi antigen 125 (CA 125).

#### ***1.3.1 METODE DOLOČANJA TUMORSKIH OZNAČEVALCEV***

Tumorske označevalce določamo vedno kvantitativno, kar pomeni, da je pomembna količina te snovi v krvi in ne le njena prisotnost (33). Pri določevanju tumorskih označevalcev potrebujemo visoko občutljivo metodo. Metode, ki jih danes uporabljamo temeljijo na podobnem principu, določanje kompleksov antigena in protiteles. Poznamo tri metode določanja tumorskih označevalcev:

- ***RADIOIMUNSKA METODA (RIA)***
- ***ENCIMSKOIMUNSKA METODA (ELISA/EIA)***
- ***LUMINOMETRIČNO-IMUNSKA METODA (KEMILUMINISCENCA)***

Naštete metode so najbolj razširjene in se med seboj razlikujejo po spojini, ki je vezana na detekcijska protitelesa in po načinu detekcije nastalih kompleksov. Prilagojene so za dokazovanje nizkih koncentracij antigena, kako specifična je metoda pa je odvisno od kvalitete protiteles, ter od specifičnosti protiteles za posamezen antigen oziroma tumorski označevalec (33). Danes še ne poznamo antigenske strukture, ki bi bila prisotna samo v malignih tumorskih celicah. Zato lahko protitelesa proti posameznim tumorskim označevalcem navzkrižno reagirajo še z drugimi antigenskimi determinantami, zato ne moremo govoriti o popolnem specifičnem označevalcu ali metodi za določanje tumorskih označevalcev. Pri povišanih vrednostih tumorskih označevalcev ni nujno da gre samo za maligno bolezen ampak imamo tudi druge faktorje, ki vplivajo na serumsko koncentracijo označevalcev. Faktorji, ki lahko vplivajo na koncentracijo v serumu, so lahko lažno pozitivni in lažno negativni. Lažno pozitivni rezultati pri tumorskih označevalcih so: vnetni procesi, benigne bolezni jeter, motnje v delovanju ledvic, tumorska nekroza, diagnostični postopki (kemoterapija, mamografija...), različna fiziološka stanja

*Andoljšek A.*

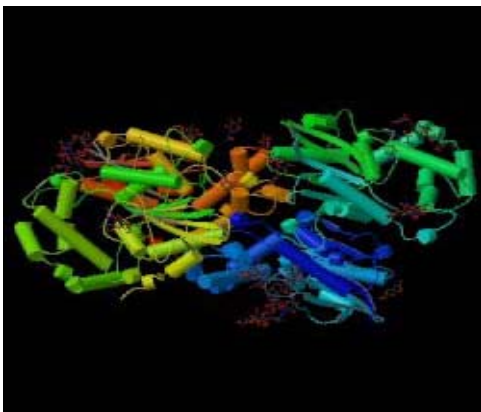
### *Določanje tumorskega označevalca HE4 pri raku jajčnika oziroma endometrija*

(nosečnost, menstrualni cikel...). Lažno negativni pa so: popoln izostanek sinteze, slabo izražanje antigenske determinante, slaba prekrvavitev tumorja, nastajanje imunskih kompleksov z organizmu lastnimi protitelesi in hiter razpad in izločanje antigenov.

#### *1.3.1.1 RADIOIMUNSKA METODA (RIA)*

Radioimunska metoda je izredno občutljiva laboratorijska metoda za določanje antigenov, hormonov, zdravil v organizmu. Za njeno izvedbo potrebujemo snov, ki jo določujemo, v kemijsko čisti obliki. Nanjo vežemo radioaktivni označevalec (izotop). Beljakovinske molekule navadno označujemo z jodom  $^{125}\text{I}$ , nebeljakovinske pa s tricijem ( $\text{H}^3$ ). Prvi je sevalec gama, drugi pa beta, radioaktivnost, ki jo oddajata pa merimo s scintilacijskimi števci in jo izrazimo v števkih na minuto.

#### *1.3.2 CA 125*



*Slika 11: CA 125*

CA 125 (karcinoembrionski antigen - CEA) je beljakovina, tako imenovani tumorski marker ali biomarker in je snov, ki se nahaja v povišani koncentraciji v tumorskih celicah kot v drugih celicah telesa. CA 125 je prisoten v višji koncentraciji v rakastih celicah jajčnika zato je tudi najpogosteje uporabljen označevalec raka jajčnika. Uporaben je za diagnostiko in spremljanje bolnic z rakom jajčnika, v kombinaciji z drugimi diagnostičnimi metodami, uporaben je tudi za spremljanje učinka kemoterapije. Samo določanje CA 125 ni dovolj zanesljivo za potrditev diagnoze (2). CA 125 je tumorju pridružen antigen, prikažemo ga lahko s pomočjo specifičnega mišjega monoklonskega protitelesa OCA 125,

*Andoljšek A.*

***Določanje tumorskega označevalca HE4 pri raku jajčnika oziroma endometrija***

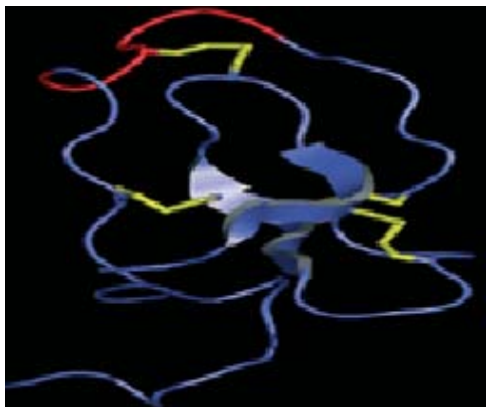
na površini celic karcinoma jajčnika. Antigen CA 125 sestoji iz dveh antigenskih struktur, ki vežeta monoklonski protitelesi OCA 125 in M11 (3). Tumorski označevalec CA 125 lahko dokažemo v serumu šele takrat, ko tumor omogoči prehod antigena v dobro prekrvavljeno stromo jajčnika. Tumorji, ki rastejo na površini jajčnika, sproščajo antigen v trebušno votlino, nato preko mezgovnega sistema tekočina drenira v venski krvni obtok in nato ga v serumu dokažemo z encimsko-immunskim testom (36). Referenčne vrednosti za CA 125 so od 0-35 E/ml. Povišane vrednosti so pri bolnicah s karcinomom jajčnika. Poleg karcinoma jajčnika pa je označevalec lahko povišan tudi pri drugih stanjih: rak dojke, pljuč, danke, trebušne slinavke, pri cirozi jeter, pri akutnem vnetju trebušne slinavke, vnetju potrebušnice, pri endometriozi, vnetju v medenici, pri prekomerni stimulaciji jajčnikov, ob menstruaciji, v prvem tromesečju nosečnosti...Priporočen odvzem je z epruveto brez dodatkov (rdeči zamašek). Transport poteka pri sobni temperaturi, število točk je 4,9.

***1.3.2.1 METODA DOLOČANJA CA 125***

***1.3.2.1.1 KEMILUMINISCENČNA METODA***

Kemiluminiscenca je sevanje za snovi značilne svetlobe kot posledica kemične reakcije. Navadno sta za pojav potrebna dva reaktanta, poleg tega pa je potreben tudi ustrezen katalizator za potek reakcije. Pri tem nastane vmesni vzbujeni produkt, ki po prehodu v osnovno stanje odda foton določene valovne dolžine. Standardni primer kemiluminiscence je test z luminolom, ki se uporablja za dokazovanje krvi; pri tem je za reakcijo (aktivacijo) potreben vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), kot katalizator pa deluje železov ion v hemoglobinu. Luminol reagira z vodikovim peroksidom v prisotnosti železovega oz. bakrovega iona ali pa pomožnega oksidanta, pri čemer nastane modra svetloba.

### **1.3.3 TUMORSKI OZNAČEVALEC HE4 (WFDC2)**



***Slika 12: HE4***

HE4 (človeški obmodni protein 4 (4-disulfid)) je tumorski označevalec pri raku jajčnika in endometrija. HE4 je bil najbolj učinkovit od vseh devetih biomarkerjev, ki so jih primerjali zato so raziskovalci ocenili, da bi bil lahko boljši od CA125, ki je trenutno najbolj razširjeni serumski biomarker za odkrivanje raka na jajčnikih in velja za zlati standard. Raziskovalci so poleg HE4 markerja testirali tudi druge različne biomarkerje; SMRP, CA72-4, aktivin A, inhibin, osteopontin, epidermalni rastni faktor in serumski Her2. Koncentracije biomarkerjev (z izjemo Her2) so bile signifikantno različne med pacientkami z rakom in tistimi z benignimi tumorji, kar kaže na njihovo sposobnost za prepoznavanje malignih bolezni. Serumski HE4 je imel največjo občutljivost (72,9%) in specifičnost (95%) za prepoznavanje malignomov. Ko pa je bil v kombinaciji z CA 125 se mu je občutljivost povečala na 76,4%. Raziskave so pokazale, da je HE4 zelo uspešen marker pri razlikovanju raka jajčnika in endometrija od benignih tumorjev in cyst. HE4 je majhen cirkulirajoči peptid, serumska koncentracija HE4 tumorskega markerja je povišana pri bolnicah s karcinomom jajčnika in endometrija. Protein HE4 potuje iz rakastih celic jajčnika v krvni obtok, kjer ga lahko detektiramo. Izražanje HE4 pri normalnih tkivih jajčnika ali benignih tumorjih je zelo nizka, zato je veliko boljši pri presejalnem testu kot CA 125. Zadnje študije so pokazale, da je HE4 najboljši marker pri I stopnji raka jajčnika. Zato pa se HE4 tumorski marker uporablja za detekcijo v zgodnji fazi bolezni in pri bolnicah z velikim tveganjem za nastanek raka jajčnika in endometrija. Karcinoma ovarija in endometrija sta dve najpogostejši maligni bolezni pri ženskem reproduktivnem sistemu.

Številne študije kažejo, da je lahko HE4 v kombinaciji z CA 125, obetavni marker pri diagnostiki raka jajčnika in endometrija. HE4 lahko v kombinaciji z CA125 izboljša specifičnost diagnostike z izključevanjem nekaterih benignih bolezni. HE4 (WFDC2) je eden izmed 14 homolognih genov na kromosomu 20q12–13.1, ki kodirajo beljakovine z 4-disulfidnimi skupinami WAP (WFDC). Dva od teh genov SLPI in elafin, sta poznana kot inhibitorja levkocitne proteaze, ki izražata HE4 v reproduktivnim in urološkem traktu. Geni na WFDC lokusu so različno ohranjeni pri različnih vrstah in imajo pomembno vlogo pri naravni odpornosti, saj imajo antimikrobno in protivnetno aktivnost. Izražanje SLPI-ja in elafina je bilo ugotovljeno pri različnih karcinomih in genih, zato imata pomembno vlogo pri razvoju raka ali napredovanju. Poleg tega je bila razširitev 20q12-13 dokazana pri karcinomu dojke in jajčnikov. Čeprav je meta analiza genov izražala HE4 pri karcinomih jajčnika je bilo tudi ugotovljeno, da je najbolj pogost prekomerno izražen gen. Veliko izražanje HE4 gena in proteina je prisotno tudi pri drugih ne ovarijskih karcinomih. Ugotovljeno je bilo, da imajo resni karcinomi jajčnika v povprečju precej višjo stopnjo genske ekspresije od drugih karcinomov. Pri adenokarcinomih pljuč je bila ugotovljena naslednja najvišja stopnja izražanja intenzivnosti, pri čemer so skvamozni karcinomi imeli nizko raven izražanja. Prehodne celice karcinomov dojke, ledvic in trebušne slinavke so imele zmerno raven izražanja HE4. Karcinomi črevesja, želodca, jeter in prostate so večinoma imeli nizko raven izražanja HE4. V raziskavi smo našli prisotnost HE4 proteina pri normalnih glandularnih epitelijih ženskega genitalnega trakta, medtem ko je bila prisotnost HE4 pri normalnih epiteljskih površinah jajčnikov negativna. Pri moškem genitalnem traktu, sta bila samo obmodek in semenovod močno imuno pozitivna. Imunoreaktivni so bili tudi respiratorni epitelij, distalni ledvični tubuli in žleze slinavke. Črevesna sluznica je bila pozitivna s spremenljivo intenzivnostjo. Pri večini študij je bila z izjemo sluzničnega tipa, večina površin epiteljskih tumorjev jajčnikov imunoreaktivna za HE4. Obarvanje je bilo tudi prisotno pri endometriju pljuč, dojke, in karcinomih trebušne slinavke, kot tudi pri različnih novotvorbah ledvic, žlez, žleze slinavke in malignih mezotelijomih. HE4 je mogoče detektirati z imunohistokemijo pri različnih karcinomih, ki imajo lahko različno diagnozo raka na jajčnikih, protitelo anti-HE4 se ne sme uporabljati ločeno, lahko pa dopolnjuje izbiro drugih protiteles za diagnozo. Poleg tega, da ima HE4 potencial v histopatološki diagnozi, je bil tudi analiziran kot serološki biomarker za raka



jajčnikov. Identifikacija HE4 promotorja, kateri je dejaven pri diferenciaciji rakavih celic jajčnika, temelji na transkripcijskemu cilju gena na področju aktivnega genskega zdravljenja. Podobne študije so ocenjevale uporabo promotorja za WFDC, ki je del SLPI-ja pri genskem zdravljenju karcinomov jajčnikov in materničnega vrata. Rezultati označujejo distribucijo HE4 pri normalnih tkivih odraslih in različnih malignih boleznih. Našli smo pomembne genske ekspresije in močne imunske reaktivnosti v nekaterih pljučih endometrija, dojke in adenokarcinomov, manj pogosto pa se pojavijo pri gastrointestinalnih in uroloških karcinomih. Treba je tudi opozoriti na spremenljivo obarvanje pri karcinomih jajčnika. Poznavanje vzorcev izražanja beljakovine HE4 je uporabno pri histopatoloških diagnozah in treba je tudi upoštevati v prihodnjih študijah, ki temeljijo na zdravljenju.

#### ***1.3.3.1 ODKRITJE HE4***

HE4 je prvi opredelil in karakteriziral Kirchoff pri različnih cDNA presejalnih človeških tkivih obmodka. Poznejše študije so pokazale izražanje HE4 markerja v številnih tkivih zunaj moškega reproduktivnega sistema. Z uporabo northern hibridizacije je Bingle detektiral HE4 mRNA, ki se je izražala v pljučih, ledvicah in žlezah slinavkah. Galgano je analiziral izražanje HE4 vzorcev pri normalnih in malignih tkivih z uporabo cDNA .

#### ***1.3.3.2 IZRAŽANJE HE4***

HE4 gen kodira vrsto proteina 4 disulfida, ki ima vlogo v naravni odpornosti. Veliko študij je opredelilo izražanje gena HE4 pri karcinomu jajčnika, vendar izražanje gena pri normalnih in malignih tkivih ni bila podrobno preučena. Izražanje HE4 gena je bilo največje v sapniku in žlezah slinavkah in najmanjše v pljučih, prostati, ščitnici, hipofizi in ledvicah. V 175 serijah človeških odraslih tumorjev, je bilo največje izražanje gena pri ovarijskih seroznih karcinomih. Vendar je tudi pri adenokarcinomih pljuč in karcinomih trebušne slinavke visoko ali zmerno izražanje HE4 gena. Imunska reaktivnost gena HE4 je bila izražena pri normalnem ženskem epiteliju genitalnega trakta, v semenovodu, pri respiratornem epiteliju, distalnem ledvičnem tubulu, sluznici črevesja in žlezah slinavkah.. Poznavanje izražanja vzorcev HE4 je koristno za uporabo v histopatološki diagnozi in je

*Andoljšek A.*

***Določanje tumorskega označevalca HE4 pri raku jajčnika oziroma endometrija***

treba upoštevati v prihodnjih študijah, pri preučevanju vloge HE4 kot serološkega biološkega označevalca tumorja ali kot cilj na podlagi genskega zdravljenja (38).

***Preglednica II: Izražanje HE4 pri normalnih tkivih z uporabo imunohistokemije***

<b><i>Aerodigestivi</i></b>	<b><i>Placenta</i></b>
Alveoli	Amnijska ovojnica
Bronhialna epitelija	Horijonske resice
Žleze slinavke, parotidne in manjše	Popkovina
Ploščatocelične sluznice žrela	Vulva
<b><i>Endokrini sistem</i></b>	Kostni mozeg
Nadledvični korteks	Limfni vozle
Nadledvična sredica	Vranica
Obščitnica	Timus
Ščitnica	Tonzile
<b><i>Gastrointestinalni trakt</i></b>	<b><i>Hepatični in pankreatični sistem</i></b>
Anus	Žolčevodi
Apendiks	Jetra
Črevo	Žolčnika
Dvanajstnik	Trebušna slinavka
Požiralnik	
Vito črevo (ileum)	
<b><i>Živčni sistem</i></b>	<b><i>Mišični skelet</i></b>
Žilni pleksus	Hrustanec
Ependim	Skeletne mišice
Gangliji	Sinovialna tekočina
Meninge	
Periferni živci	<b><i>Koža in lakrimalne žleze</i></b>
Motorični nevroni	Dermis in epidermis
Purkinjeve celice	Lakrimalne žleze

<b><i>Ginekologija in dojke</i></b>	<b><i>Sečila</i></b>
Dojke	Mehur
Ektocerviks	Obmodek
Endocerviks	Ledvice
Endometrij	Prostata
Jajcevod	Semenski mešički
Miometrij	Seminiferni tubuli
	Semenovod
<b><i>Jajčnik</i></b>	<b><i>Žilni sistem</i></b>
Corpus luteum (rumeno telesce)	Aorta
Primarni oocit	Srce
Površinski epitelij	Limfa
Stroma	Pljučne arterije
	Majhne vene črevesja

***Preglednica III: Izražanje HE4 pri neoplazmah***

	<i>Negativno</i>	<i>Šibko</i>	<i>Močno</i>
Mehur in sečevod, prehodno celični karcinom	23	7	2
Dojke, invazivni karcinom	14	9	3
Karcinom endometrija	2	3	11
<b><i>Gastrointestinalni, hepatični in pankreatični sistem</i></b>	21	6	0
Kolorektalni karcinom	5	0	0
Hepatocelularni karcinom	1	3	4
Karcinom trebušne slinavke	15	2	0
Karcinom zgornjega gastrointestinalnega trakta			
<b><i>Ledvice</i></b>	25	1	0
Renalni celični karcinom	7	1	5
Renalni celični karcinom, papilarni tip	4	5	4
Kromofobni karcinom	4		5

Onkocitom		3	
<b>Pljuča</b>	9		7
Adenokarcinom	6	5	0
Skvamozno celični karcinom		3	
<b>Mezotelij</b>	12		8
Epiteloidna vrsta		8	
<b>Jajčnik</b>			
Papilarni karcinom	0	6	26
Endometrioidni karcinom	2	3	5
Slabo diferenciran karcinom	0	3	1
Mucinozni tumor	6	1	0
Germinalno celični tumor	5	0	0
Gastrointestinalne metastaze	1	3	1
Prostatični adenokarcinom	20	0	0
Žleze slinavke, različne	0	12	12
Koža, bazalno celični karcinom	10	1	0
Ščitnice, različne	13	12	10

### **1.3.3.3 IMUNOHISTOKEMIJA**

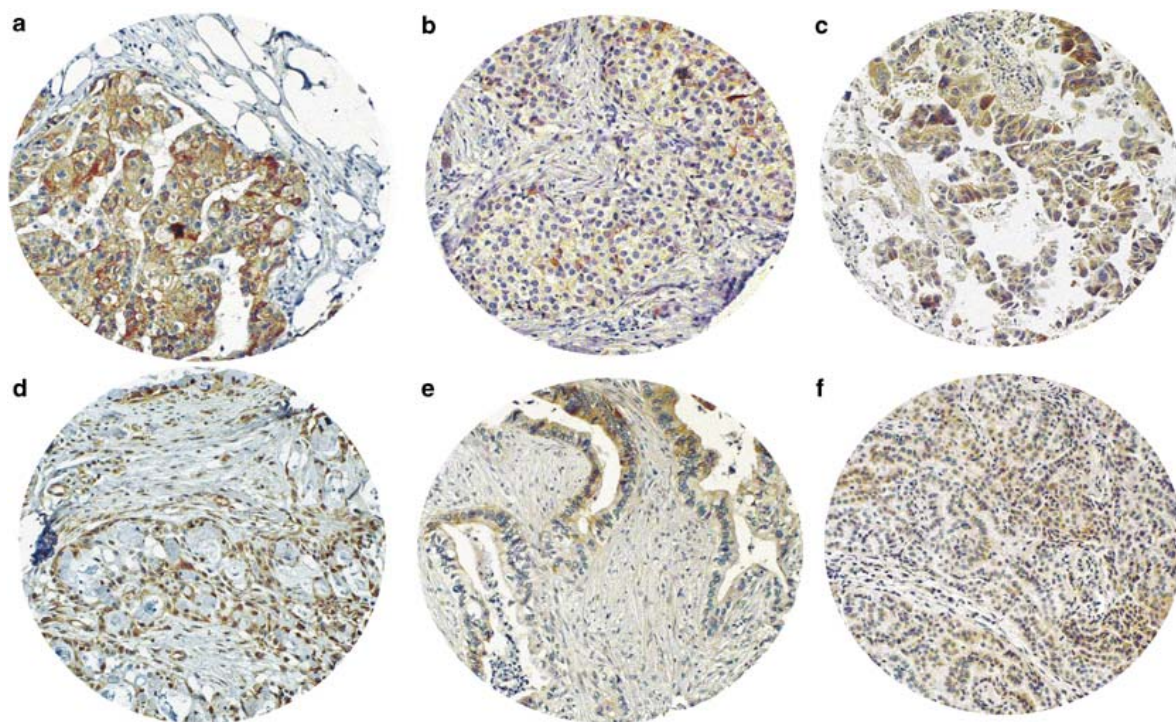
Je prepoznavanje antigenov v tkivnih rezinah s pomočjo specifičnih protiteles.

Z imunohistokemijskimi metodami dokazujemo fiziološke in patološke sestavine celic in medceličnine. S specifičnimi protitelesi dokazujemo telesu tuje snovi/antigene (mikroorganizmov, antigene pri avtoimunskih boleznih) in antigene/celične označevalce (markerje), ki so značilni ne samo za različna normalna tkiva ampak tudi za novotvorbe, iz katerih nastajajo. Poleg novotvorb je imunohistokemija pomembna tudi v diagnostiki drugih bolezni, npr. ledvic, kože in pljuč. Mikroskopsko jih prikažemo tako, da protitelesa označimo ali s fluorescentnimi molekulami (barvili) ali z encimom (npr. redkveno peroksidazo, alkalno fosfatazo). Fluorescentne molekule pod vplivom ultravijolične svetlobe v posebej prirejenem mikroskopu svetijo (emitirajo svetlobo) določene valovne dolžine. Imunofluorescenco uporabljamo v diagnostiki nekaterih ledvičnih bolezni.

*Andoljšek A.*

***Določanje tumorskega označevalca HE4 pri raku jajčnika oziroma endometrija***

Ugotavljamo npr. podlago imunskih kompleksov (antigen in nanj vezano protitelo) v glomerulih pri imunsko pogojenem glomerulonefritisu. S fluorescentnimi molekulami označujemo tudi protitelesa za imunofenotipizacijo novotvorb limfatičnega in krvotvornega sistema s pretočnim citometrom. Pri encimatski imunohistokemiji se z encimom označeno protitelo veže na antigen na celični membrani ali v citoplazmi ali v jedru. Dodamo snov (kromogen), ki ima to lastnost, da ga na protitelo vezan encim cepi v barvni produkt. Tako lahko antigen v celici mikroskopsko lokaliziramo (40).



***Slika 13: Primeri imunske reaktivnosti HE4 označevalca na mikroploščah***

a.) ovarijski serozni karcinom b.) invazivni duktalni karcinom dojke c.) adenokarcinom pljuč d.) mukozno epidermoidni karcinom e.) karcinom trebušne slinavke f.) epitelioidni maligni mezotelijom

## **2. NAMEN DELA**

Tumorski označevalec HE4 je pomemben označevalec pri raku jajčnika in endometrija. Pri neki raziskavi je bil HE4 najbolj učinkovit od vseh devetih biomarkerjev, ki so jih primerjali zato bi lahko bil boljši od CA 125, ki je trenutno najbolj razširjeni serumski biomarker za odkrivanje raka na jajčnikih. Serumski HE4 je imel največjo občutljivost in specifičnost za prepoznavanje malignomov, ko pa je bil v kombinaciji z CA 125 se mu je občutljivost še povečala zato bi lahko bil obetavni marker pri diagnostiki raka jajčnika in endometrija. Opredeliti želimo tudi uporabnost markerja HE4 pri razlikovanju raka jajčnika in endometrija od benignih tumorjev in cist.

V okviru projekta imamo 46 pacientk, ki so prišle na operativni poseg zaradi suma na karcinom ovarija ali endometrija. V diplomski nalogi bomo statistično ovrednotili rezultate meritev koncentracij HE4 in CA 125 v serumu z namenom, da ugotovimo:

- Ali je tumorski označevalec HE4 bolj učinkovit označevalec od CA 125 za odkrivanje raka na jajčnikih in endometrija?
- Ali z dodatno analizo HE4 izboljšamo detekcijo v primerjavi z določanjem samo CA 125?
- Ali je HE4 označevalec uspešen označevalec pri razlikovanju karcinomov ovarija in endometrija od benignih sprememb?

### **3. EKSPERIMENTALNI DEL**

#### **3.1 VZORCI**

Analizirali smo rezultate koncentracij tumorskega označevalca HE4 in CA 125 v vzorcih seruma pri ženskah, vzorci so bili vzeti v letu 2009 na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo, Njogoševa 4/I, Ljubljana. Obravnavali smo skupino 46 pacientk, ki so prišle na operativni poseg zaradi suma na karcinom ovarija (n=6) ali endometrija (n=5). Povprečna starost žensk je bila 55 let in razdelili smo jih v dve skupini, skupino s karcinomom (ovarij, endometrij) in skupino z benignimi spremembami (serozne ciste, folikularne ciste, serozni cistadenofibrom, atrtični folikli, endometriotične ciste, endometrioza jajčnika, polipi in zgodnji sekrecijski endometrij, endometrioza, Morganijeva hidatida).

#### **3.2 METODA**

Tumorski označevalci imajo v telesnih tekočinah nizke koncentracije in za njihovo dokazovanje potrebujemo visoko občutljivo tehnologijo. Metode, ki jih uporabljamo, temeljijo bolj ali manj na podobnem principu, to je na določanju kompleksov antigena in protiteles. Vse metode so prilagojene dokazovanju izredno nizkih koncentracij antigena, tako da velikih razlik v njihovi senzitivnosti ni. Specifičnost metod je v veliki meri odvisna od kvalitete protiteles ter od specifičnosti protiteles za posamezen antigen oziroma tumorski označevalec (51). Pri določanju tumorskega označevalca HE4 uporabljamo metodo ELISA.

### **3.2.1 ENCIMSKO-IMUNSKA METODA (ELISA)**

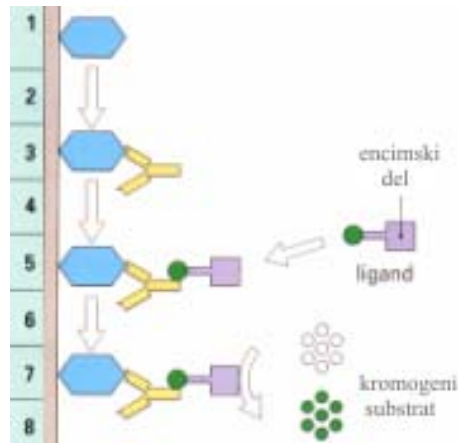
ELISA je ena izmed najbolj uporabnih metod za določanje prisotnosti antigenov ali specifičnih protiteles v testiranih vzorcih. Kadar v vzorcu določamo specifična protitelesa, govorimo o posredni (indirektni) ELISI, kadar pa določamo prisotnost antigena, govorimo o sendvič ELISI. Testi se izvajajo v mikrotitrskih ploščah. Encimi, ki jih pri ELISI najpogosteje uporabljamo, so: hrenova peroksidaza (HRP), alkalna fosfataza (AP) in  $\beta$ -D-galaktozidaza ( $\beta$ -GAL). Nastale komplekse po dodatku kromogenega substrata določimo spektrofotometrično. Kromogen je brezbarvni substrat, na katerega deluje encim, zaradi česar se pojavi obarvan produkt. Količina razgrajenega substrata je sorazmerna količini encima, vezanega na kompleks Ag – Ab.



**Slika 14: Shema reakcije substrata na katerega deluje encim**

Pri testu ELISA za določanje specifičnih protiteles na mikrotitrsko ploščo najprej vežemo plast antigena (*Slika*). Nevezan antigen speremo, nato pa v vdolbinice dodamo vzorec, ki vsebuje protitelesa proti vezanemu antigenu. V zadnji stopnji vezana protitelesa označimo s sekundarnimi protitelesi ali drugimi specifičnimi ligandi (npr. proteinom A), ki imajo kovalentno vezan encim. Po dodatku kromogenega substrata pride do nastanka obarvanega produkta.

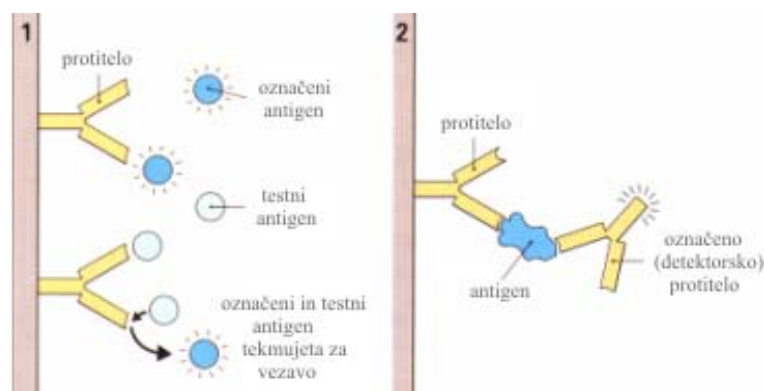




**Slika 15: Shema izvedbe testa ELISA za določanje protiteles**

(1) vezava antigena, (2) spiranje, (3) vezava testnih protiteles, (4) spiranje, (5) vezava liganda, (6) spiranje, (7) dodatek kromogenega substrata, (8) razvijanje barve.

Pri testu ELISA za določanje prisotnosti antigena (sendvič ELISA) je potrebno pripraviti vsaj dve monoklonski protitelesi, ki prepoznata različna epitopa na površini antigena (*Slika*). Imunska reakcija poteka v dveh stopnjah. V prvi stopnji na površino mikrotitrne ploščice adsorbiramo protitelo, ki mora biti tako specifično, da v izbranem vzorcu selektivno veže le antigen, ki nas zanima. Protitelo mora imeti tudi veliko afiniteto za antigen, da je test čimbolj občutljiv. Nato dodamo izbran vzorec (antigen), v drugi stopnji pa z encimom označeno drugo protitelo, ki je prav tako specifično za antigen (detektorsko protitelo).



**Slika 16: Shema testa ELISA za določanje antigena**

Leva slika prikazuje kompetitivni test ELISA (1), desna pa t. i. sendvič ELISA test (2).

### **3.2.1.1 NAMEMBNOST METODE**

ELISA je encimsko imunski test za kvantitativno določanje HE4 v človeškem serumu. Test se uporablja kot pomoč pri spremljanju odgovora terapije pri bolnikih z invazivnim epiteljskim rakom jajčnikov. Serijsko testiranje vrednosti HE4 naj se uporablja v povezavi z drugimi uporabljenimi kliničnimi metodami za spremljanje raka jajčnikov. Namenjena je tudi kot pomoč pri ocenjevanju tveganja epiteljskih rakov jajčnikov pri premenopavzalnih in postmenopavzalnih ženskah. Rezultate je treba interpretirati v povezavi z drugimi metodami in v skladu z standardnimi kliničnimi smernicami za upravljanje.

### **3.2.1.2 PRINCIP METODE**

Metoda se izvaja na trdni fazi, je nekompetitivni imunski test, temelji na direktni sendvič tehniki z uporabo dveh mišjih monoklonskih protiteles, 2H5 in 3D8, usmerjenih proti dvema epitopoma na področju C-WFDC HE4. Kalibratorji, kontrole in bolnikovi vzorci so inkubirani skupaj z biotinskim Anti-HE4 monoklonskim protitelesom (Mab) 2H5. Prisotnost HE4 v kalibratorjih ali vzorcih je adsorbirana na streptavidinskih prevlečenih mikrotrakovih pri biotinskih anti-HE4 monoklonskih protitelesih med inkubacijo. Trakove, se nato opere in inkubira z HRP označenimi Anti-HE4 monoklonskimi protitelesi 3D8. Po spiranju se doda substrat / kromogeni reagent (vodikov peroksid in 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidin) v vsako vdolbinico in encimska reakcija lahko poteka. Med encimsko reakcijo se razvije modra barva, če je prisoten antigen. Intenzivnost barve je sorazmerna količini HE4 v vzorcih. Intenzivnost barve je določena v mikroplošči spektrofotometra pri 620 nm (ali pri 405 nm po dodatku končne raztopine). Umeritvene krivulje so izdelane za vsak preskus, tako da se nanaša vrednosti koncentracije absorbance za vsak kalibrator. Koncentracije HE4 v vzorcih pacientov se nato odčita iz umeritvene krivulje.

### **3.2.1.3 POSTOPEK METODE**

- 1) Na trdni nosilec vežemo znano protitelo za antigen, ki ga določamo.
- 2) Dodamo vzorec, ki vsebuje preiskovan antigen, ta se veže na pritrjeno protitelo.
- 3) Speremo nosilec, da odstranimo nevezane antigene.
- 4) Dodamo protitelesa, specifična za vezan antigen, ki so označena z encimom.
- 5) Speremo ploščo, da odstranimo nevezana protitelesa.
- 6) Dodamo substrat, ki ob prisotnosti encima razvije barvo.
- 7) Detektiramo intenzivnost barve.



*Slika 17: Postopek metode ELISA*

### **3.2.1.4 NATANČNOST METODE**

Metoda za natančnost tumorskega označevalca HE4 predstavlja  $\leq 15\%$  celotnega koeficienta variacije. Plošča štirih vzorcev seruma je bila preizkušena, z uporabo dveh serij reagentov, v dveh ponovitvah, v dveh ločenih časih na dan, 20 dni.

*Andoljšek A.*

*Določanje tumorskega označevalca HE4 pri raku jajčnika oziroma endometrija*

*Preglednica IV: Natančnost metode ELISA*

<i>Vzorec</i>	<i>Serije reagentov</i>	<i>n</i>	<i>Povprečna koncentracija (pM)</i>	<i>SD znotraj serije (pM)</i>	<i>CV znotraj serije (%)</i>	<i>Celotna SD (pM)</i>	<i>Celotni CV (%)</i>
<b>1</b>	<b>1</b>	<b>80</b>	<b>50.3</b>	<b>0.81</b>	<b>1.6</b>	<b>2.34</b>	<b>4.7</b>
	<b>2</b>	<b>80</b>	<b>48.0</b>	<b>0.69</b>	<b>1.4</b>	<b>2.17</b>	<b>4.5</b>
<b>2</b>	<b>1</b>	<b>80</b>	<b>75.3</b>	<b>1.81</b>	<b>2.4</b>	<b>2.96</b>	<b>3.9</b>
	<b>2</b>	<b>80</b>	<b>72.4</b>	<b>1.73</b>	<b>2.4</b>	<b>4.70</b>	<b>6.5</b>
<b>3</b>	<b>1</b>	<b>80</b>	<b>255</b>	<b>5.68</b>	<b>2.2</b>	<b>12.0</b>	<b>4.7</b>
	<b>2</b>	<b>80</b>	<b>242</b>	<b>5.21</b>	<b>2.2</b>	<b>12.8</b>	<b>5.3</b>
<b>4</b>	<b>1</b>	<b>80</b>	<b>407</b>	<b>6.22</b>	<b>1.5</b>	<b>14.5</b>	<b>3.6</b>
	<b>2</b>	<b>80</b>	<b>385</b>	<b>8.71</b>	<b>2.3</b>	<b>21.6</b>	<b>5.6</b>

**SD** – Standardna deviacija

**CV** – Koeficient variacije

### **3.2.1.5 MEJA DETEKCIJE**

Meja detekcije tumorskega označevalca HE4 pri metodi je <15 pM. Meja zaznavnosti (LOD) ustreza zgornji meji 95% intervala in predstavlja najnižjo koncentracijo antigena HE4, ki se lahko razlikuje od nič. LOD je bil izračunan na naslednji način:

$$\text{LOD (pM)} = 5.0 \text{ pM} \times (1,65 \times \text{SD}_0 + 1.65 \times \text{SD}_5) / (\text{OD}_5 - \text{OD}_0)$$

Meja detekcije metode za določanje HE4 je bila izračunana < 2.5 pM.

### **3.2.1.6 OBČUTLJIVOST METODE**

Občutljivost metode za določanje HE4 je ≤ 25 pM. Občutljivost se izraža kot koncentracija analita, pri kateri je koeficient variacije 20%. Občutljivost metode je določena za HE4 in je ugotovljena < 5 pM.

**3.2.1.7 PRIDOBITEK DODATKA (RECOVERY)**

Povprečni pridobitek dodatka metode za določanje HE4 je  $100 \pm 15\%$ . Študija je bila opravljena po razredčitvi vzorca bolnika z znanimi koncentracijami tumorskega označevalca HE4, pri katerim so bili dodani človeški vzorci seruma. Koncentracija HE4 je bila določena z uporabo metode in odstotek pridobitka dodatka je bil izračunan.

*Preglednica V: Pridobitek dodatka (recovery) metode*

<i>Vzorec</i>	<i>Notranje vrednosti metode (pM)</i>	<i>Dodatek antigena HE4 (pM)</i>	<i>Vrednosti metode za določanje HE4 (pM)</i>	<i>Odstotek pridobitka dodatka (recovery) %</i>
<b>1</b>	<b>44,6</b>	<b>15</b>	<b>60,6</b>	<b>102</b>
		<b>75</b>	<b>96,0</b>	<b>89</b>
		<b>350</b>	<b>397</b>	<b>96</b>
		<b>650</b>	<b>686</b>	<b>96</b>
<b>2</b>	<b>41,1</b>	<b>15</b>	<b>55,7</b>	<b>99</b>
		<b>75</b>	<b>95,2</b>	<b>91</b>
		<b>350</b>	<b>400</b>	<b>98</b>
		<b>650</b>	<b>657</b>	<b>93</b>
<b>3</b>	<b>40,6</b>	<b>15</b>	<b>54,0</b>	<b>97</b>
		<b>75</b>	<b>95,1</b>	<b>91</b>
		<b>350</b>	<b>403</b>	<b>98</b>
		<b>650</b>	<b>680</b>	<b>96</b>
<b>4</b>	<b>46,6</b>	<b>15</b>	<b>63,3</b>	<b>103</b>
		<b>75</b>	<b>106</b>	<b>97</b>
		<b>350</b>	<b>410</b>	<b>99</b>
		<b>650</b>	<b>645</b>	<b>90</b>
<b>5</b>	<b>40,2</b>	<b>15</b>	<b>56,5</b>	<b>102</b>
		<b>75</b>	<b>102</b>	<b>98</b>
		<b>350</b>	<b>402</b>	<b>99</b>
		<b>650</b>	<b>676</b>	<b>96</b>

***Andoljšek A.***

***Določanje tumorskega označevalca HE4 pri raku jajčnika oziroma endometrija***

Povprečna točnost pri štirih ločenih koncentracijah je 97%.

% Pridobitek dodatka = Koncentracija metode za določanje HE4 (pM) / Notranja vrednost metode HE4(pM) + Dodatek antigena HE4 (pM).

***3.2.1.8 LINEARNOST REDČENJA***

Pri metodi za določanje HE4 je linearnost redčenja  $100 \pm 15\%$ . Serumi vzorcev z povišanimi vrednostmi HE4 so bile razredčeni z HE4 kalibratorjem A (nič). Koncentracija HE4 je bila določena za vsako razredčitev in odstotek (%) izkoristka je bil izračunan.

*Preglednica VI: Linearost redčenja metode*

<i>Vzorec</i>	<i>Končni razredčitveni faktor</i>	<i>Izmerjene vrednosti (pM)</i>	<i>Pričakovane vrednosti (pM)</i>	<i>Odstotek pridobitka dodatka (%)</i>
<b>1</b>	<b>Nerazredčeno</b>	<b>889,6</b>	<b>889,6</b>	<b>100</b>
	<b>1:1,25</b>	<b>720,0</b>	<b>711,7</b>	<b>101</b>
	<b>1:1,7</b>	<b>543,1</b>	<b>533,8</b>	<b>101</b>
	<b>1:2</b>	<b>450,6</b>	<b>444,8</b>	<b>101</b>
	<b>1:2,5</b>	<b>345,9</b>	<b>355,8</b>	<b>97,2</b>
	<b>1:5</b>	<b>183,6</b>	<b>177,9</b>	<b>103</b>
	<b>1:10</b>	<b>97,6</b>	<b>89,0</b>	<b>109</b>
	<b>1:20</b>	<b>49,1</b>	<b>44,5</b>	<b>110</b>
	<b>1:40</b>	<b>25,9</b>	<b>22,2</b>	<b>116</b>
<b>2</b>	<b>Nerazredčeno</b>	<b>697,0</b>	<b>697,0</b>	<b>100</b>
	<b>1:1,25</b>	<b>544,9</b>	<b>557,6</b>	<b>97,7</b>
	<b>1:1,7</b>	<b>429,8</b>	<b>418,2</b>	<b>103</b>
	<b>1:2</b>	<b>361,1</b>	<b>348,5</b>	<b>104</b>
	<b>1:2,5</b>	<b>275,9</b>	<b>278,8</b>	<b>99,0</b>
	<b>1:5</b>	<b>134,5</b>	<b>139,4</b>	<b>96,5</b>
	<b>1:10</b>	<b>74,4</b>	<b>69,7</b>	<b>107</b>
	<b>1:20</b>	<b>39,1</b>	<b>34,9</b>	<b>112</b>
	<b>1:40</b>	<b>21,0</b>	<b>17,4</b>	<b>120</b>
<b>3</b>	<b>Nerazredčeno</b>	<b>680,2</b>	<b>680,2</b>	<b>100</b>
	<b>1:1,25</b>	<b>499,7</b>	<b>544,2</b>	<b>91,8</b>
	<b>1:1,7</b>	<b>354,4</b>	<b>408,1</b>	<b>86,8</b>
	<b>1:2</b>	<b>296,7</b>	<b>340,1</b>	<b>87,2</b>
	<b>1:2,5</b>	<b>247,2</b>	<b>272,1</b>	<b>90,9</b>
	<b>1:5</b>	<b>124,9</b>	<b>136,0</b>	<b>91,8</b>
	<b>1:10</b>	<b>61,7</b>	<b>68,0</b>	<b>90,7</b>
	<b>1:20</b>	<b>34,6</b>	<b>34,0</b>	<b>102</b>
	<b>1:40</b>	<b>18,4</b>	<b>17,0</b>	<b>109</b>

Povprečna točnost skozi tri razredčene vzorce = 101%

% Pridobitka dodatka = Izmerjena koncentracija HE4 x Faktor redčenja / nerazredčena koncentracija HE4.

### **3.2.1.9 ANALITIČNA SPECIFIČNOST**

Metoda analitične specifičnosti pomeni da je metoda specifična  $100 \pm 15\%$ . Študije so bile izvedene, da se primerjajo s serumi, ki vsebujejo naslednje sestavine na navedenih koncentracijah z serumi nadzora. Naslednje snovi in koncentracije so bile testirane in ugotovljeno je bilo, da ne motijo metodo.

*Preglednica VII: Analitična specifičnost metode*

<i>Endogene motnje seruma</i>	<i>Koncentracija metode</i>
<b>Trigliceridi</b>	<b>30 mg/mL</b>
<b>Bilirubin</b>	<b>0,2 mg/mL</b>
<b>Hemoglobin</b>	<b>10 mg/mL</b>
<b>Celokupni proteini</b>	<b>120 mg/mL</b>
<i>Kemoterapevtične motnje zdravil</i>	<i>Koncentracija metode</i>
<b>Karboplatin</b>	<b>500 µg/mL</b>
<b>Cisplatin</b>	<b>165 µg/mL</b>
<b>Klotrimazol</b>	<b>0,3 µg/mL</b>
<b>Ciklofosfamid</b>	<b>500 µg/mL</b>
<b>Deksametazon</b>	<b>10 µg/mL</b>
<b>Doksorubicin</b>	<b>1,16 µg/mL</b>
<b>Levkovorin</b>	<b>2,68 µg/mL</b>
<b>Melfalan</b>	<b>2,8 µg/mL</b>
<b>Metotreksatom</b>	<b>45 µg/mL</b>
<b>Paklitaksel</b>	<b>3,5 ng/mL</b>



*Andoljšek A.*

*Določanje tumorskega označevalca HE4 pri raku jajčnika oziroma endometrija*

### **3.2.1.10 POTENCIALNO MOTEČA KLINIČNA STANJA**

Metoda za določanje tumorskega označevalca HE4 je bila ovrednotena pri vzorcih z HAMA in revmatoidnim faktorjem (RF) za nadaljnjo oceno specifičnosti metode. Pet pozitivnih vzorcev HAMA in pet pozitivnih vzorcev za RF je bilo ocenjenih z izkoristkom v % z antigenom HE4, v vsakem vzorcu na približno 50 in 450 pM.

***Preglednica VIII: Potencialno moteča klinična stanja***

<i>Klinični pogoji</i>	<i>Število vzorcev</i>	<i>Povprečni izkoristek</i>
<b>HAMA</b>	<b>5</b>	<b>101</b>
<b>RF</b>	<b>5</b>	<b>95</b>

**4. REZULTATI**

**Preglednica IX: Rezultati meritev koncentracij tumorskega označevalca CA 125 in HE4**

<i>Številka preiskovanke</i>	<i>Starost</i>	<i>Diagnoza</i>	<i>S-CA 125</i>	<i>S-HE4</i>
1	47	serozna cista	90,1	27,7
2	51	serozna cista	18,5	27,7
3	53	serozna cista	5,1	42,6
4	47	serozna cista	21,4	26,8
5	69	serozna cista	8,1	30,9
6	74	ni ovarija, redkoceličen fibromielom	39,0	64,4
7	79	serozna cista	10,4	31,8
8	55	cystis seroza	7,4	27,7
9	59	Endometrioidni adenokarcinom	42,7	37,7
10	46	serozna cista	4,4	25,9
11	46	ni ovarij	24,7	33,2
12	87	folikularna cista	23,0	56,4
13	35	serozna cista	11,6	30,5
14	62	serozni cistadenofibrom - benigni	35	37,2
15	59	serozna cista	32,3	31,8
16	62	fibrothecoma ovarii	31,0	43
17	56	serozna cista	8,1	38,1
18	50	atritični folikli	37,9	33,6
19	30	endometriotične ciste	122,5	47,9
20	50	ni ovarij	198,6	39,4
21	65	serozna cista	9,7	33,6
22	53	endometriosis ovarii	14,3	50,6
23	51	polip in zgodnji sekrecijski endometrij	26,5	33,6
24	70	CA ovarija	1315,0	75,5
25	35	endometriosis ovarii	17,7	38,1
26	51	cystis seroza	11,3	27,7
27	51	serozna cista	9,2	25,9
28	48	Endometrioidni adenokarcinom	42,0	51,9
29	67	CA endometrij	367,2	287,7
30	42	endometrioza	42,9	35,4
31	38	endometrioza	7,6	68,8
32	61	serozna cista	6,7	42,1
33	63	CA endometrij	9,7	43,5
34	50	endometrioza	6,4	51,9
35	58	serozna cista	10,8	40,8
36	61	Endometrioidni adenokarcinom	6,3	32,7
37	47	struma ovarii	7,1	26,4

**Andoljšek A.**

**Določanje tumorskega označevalca HE4 pri raku jajčnika oziroma endometrija**

38	46	serozna cista	0,2	35,4
39	55	Morganijeva hidatida - benigno	17,2	45,3
40	63	Mejno maligni CA ovarija	60,4	60,4
41	60	CA slepiča	16,0	37,6
42	35	serozna cista	27,0	25,9
43	57	serozna cista	18,7	49,3
44	26	CA ovarija	699,6	64,8
45	72	serozni cistadenofibrom - benigni	45,8	45,3
46	70	CA ovarija	1422	1113,4

**Preglednica X: Serumske koncentracije CA 125 pri bolnicah z rakom jajčnika in endometrija**

<i>Bolezen</i>	<i>Število primerov</i>	<i>AM (kU/L)</i>	<i>SD (kU/L)</i>	<i>SE (kU/L)</i>	<i>M (kU/L)</i>	<i>CV (%)</i>	<i>Odstotek primerov nad 35.0 kU/L*</i>
<b>Rak jajčnika in endometrija</b>	<b>11</b>	<b>1060,8</b>	<b>510,8</b>	<b>154,0</b>	<b>1060,8</b>	<b>48,1</b>	<b>30,4</b>

**AM** – Aritmetična sredina

**SD** – Standardna deviacija

**SE** – Standardna napaka

**M** – Srednja vrednost (mediana)

**CV** – Koeficient variacije

\* - Odstotek primerov s serumskimi koncentracijami CA 125 večjimi od 35,0 kU/L

Bolnice z rakom jajčnika in endometrija, ki smo jih vključili v raziskavo, so imele povišane vrednosti serumskih koncentracij CA 125 (AM=1060,8 kU/L). V skupini bolnic z rakom jajčnika in endometrija je imelo samo 30,4% žensk serumske koncentracije CA 125 nad vrednostjo 35 kU/L. Serumske koncentracije CA 125 so bile povišane le v nekaterih primerih (14/46 bolnic), srednja vrednost oz. mediana znaša 1060,8 kU/L. CA 125 se pri nekaterih bolnicah z rakom jajčnika in endometrija tvori v večjih količinah in so zato serumske koncentracije CA 125 označevalca povečane nad 35 kU/L (14/46 bolnic), ker pa

*Andoljšek A.*

*Določanje tumorskega označevalca HE4 pri raku jajčnika oziroma endometrija*

so bile serumske vrednosti CA 125 povišane le pri nekaterih bolnicah je to rezultat slabe zanesljivosti označevalca.

*Preglednica XI: Serumske koncentracije HE4 pri bolnicah z rakom jajčnika in endometrija*

<i>Bolezen</i>	<i>Število primerov</i>	<i>AM (pmol/L)</i>	<i>SD (pmol/L)</i>	<i>SE (pmol/L)</i>	<i>M (pmol/L)</i>	<i>CV (%)</i>	<i>Odstotek primerov nad 70 pmol/L*</i>
<b>Rak jajčnika in endometrija</b>	<b>11</b>	<b>169,9</b>	<b>321,1</b>	<b>96,8</b>	<b>51,9</b>	<b>188</b>	<b>6,5</b>

**AM** – Aritmetična sredina

**SD** – Standardna deviacija

**SE** – Standardna napaka

**M** – Srednja vrednost (mediana)

**CV** – Koeficient variacije

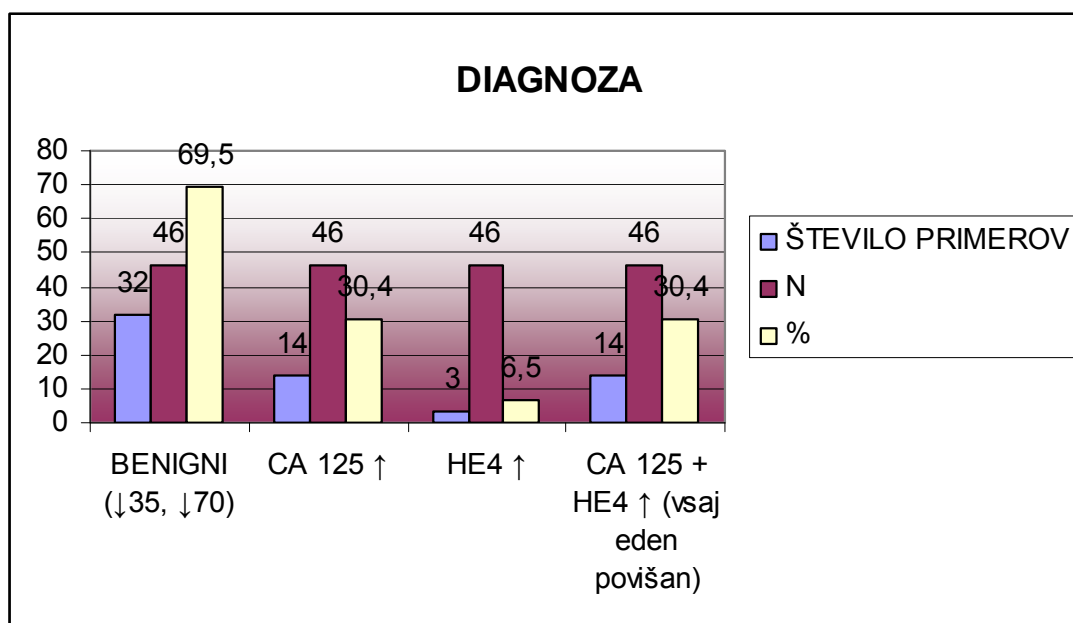
\* - Odstotek primerov s serumskimi koncentracijami HE4 večjimi od 70 pmol/L

Bolnice z rakom jajčnika in endometrija so imele povišane vrednosti serumskih koncentracij HE4 (AM=169,9 pmol/L). V skupini bolnic z rakom jajčnika in endometrija je imelo samo 6,5% žensk serumske koncentracije HE4 nad vrednostjo 70 pmol/L. Serumske koncentracije HE4 so bile povišane le v treh primerih (3/46 bolnic), srednja vrednost oz. mediana znaša 51,9 pmol/L. Serumske vrednosti HE4 so bile povišane le pri treh bolnicah in to je rezultat slabe zanesljivosti označevalca.

Preglednica XII: Število primerov pacientk glede na diagnozo

DIAGNOZA	ŠTEVILO PRIMEROV	N	%
BENIGNI (↓35, ↓70)	32	46	69,5
CA 125 ↑	14	46	30,4
HE4 ↑	3	46	6,5
CA 125 + HE4 ↑ (vsaj eden povišan)	14	46	30,4

N – Celotna skupina pacientk



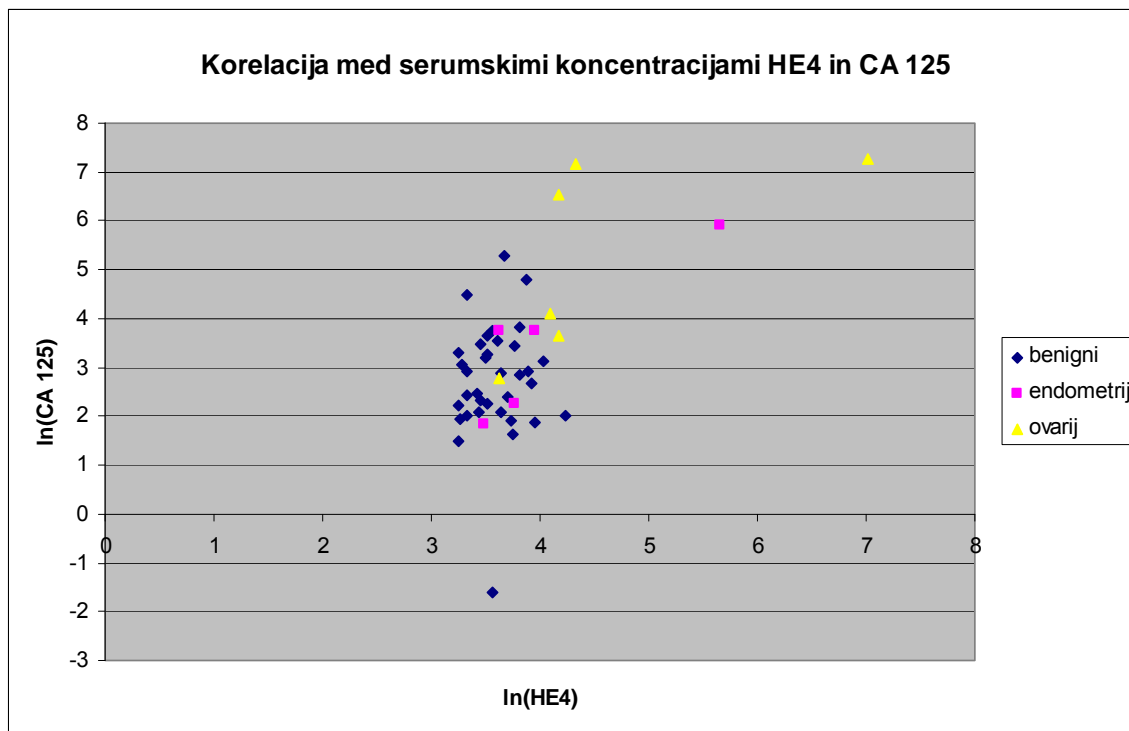
Slika 18: Grafični prikaz s katerim smo prikazali diagnozo pacientk

Pri bolnicah s karcinomom jajčnika in endometrija je bilo od celotne skupine 46 pacientk, benignih primerov 32, in sicer 69,5%. To potrди dejstvo, da je tumorski označevalec HE4 uspešen označevalec pri razlikovanju karcinomov ovarija in endometrija od benignih sprememb. Tumorski označevalec CA 125 je bil povišan pri 14 bolnicah, to znaša 30,4% in je boljši pokazatelj procesa za odkrivanje raka na jajčnikih in endometrija kot HE4, ki je

**Andoljšek A.**

**Določanje tumorskega označevalca HE4 pri raku jajčnika oziroma endometrija**

bil povišan samo pri treh bolnicah (6,5%). Pri 14 pacientkah (30,4%) je bil vsaj en tumorski označevalec povišan in s tem ne izboljšamo detekcije v primerjavi z določanjem samo CA 125.



**Slika 19: Grafični prikaz korelacije rezultatov med serumskimi koncentracijami HE4 in CA 125**

## **5. RAZPRAVA**

V diplomski nalogi smo želeli preizkusiti nov tumorski označevalec HE4, ki naj bi bil bolj občutljiv kot do sedaj uporabljeni CA 125. V ta namen smo uvedli določanje tumorskega označevalca HE4 in skušali oceniti klinično učinkovitost označevalca HE4 v primerjavi z CA 125 za odkrivanje raka na jajčnikih in endometrija. Ugotoviti smo tudi hoteli, če z dodatno analizo izboljšamo detekcijo v primerjavi z določanjem samo CA 125 in če je tumorski označevalec HE4 uspešen označevalec pri razlikovanju karcinomov ovarija in endometrija od benignih sprememb. Vendar smo obravnavali izredno majhno skupino bolnic z rakom jajčnika oz. endometrija zato tudi nismo dobili pričakovanih rezultatov in šele nadaljnje raziskave bodo pokazale pravo vrednost tumorskega označevalca HE4.

V serumih pacientk iz ginekološke klinike, ki so se zdravile zaradi raka jajčnika oz. endometrija smo določali človeški obmodni protein 4 (HE4), ki je tumorski označevalec pri raku jajčnika in endometrija. HE4 je bil najbolj učinkovit od vseh devetih označevalcev, ki so jih primerjali zato so raziskovalci ocenili, da bi bil lahko boljši od CA125, ki je trenutno najbolj razširjeni serumski označevalec za odkrivanje raka na jajčnikih in velja za zlati standard. Serumski HE4 je imel največjo občutljivost in specifičnost za prepoznavanje malignomov. Ko pa je bil v kombinaciji z CA 125 se mu je občutljivost še povečala. Raziskave so pokazale, da označevalec HE4 v kombinaciji z CA 125 izboljša specifičnost diagnostike in je zelo uspešen označevalec pri razlikovanju raka jajčnika oz. endometrija od benignih tumorjev in cist. HE4 je majhen cirkulirajoči peptid, serumska koncentracija tumorskega markerja HE4 je povišana pri bolnicah s karcinomom jajčnika in endometrija. Protein HE4 potuje iz rakastih celic jajčnika v krvni obtok, kjer ga lahko detektiramo. Izražanje HE4 pri normalnih tkivih jajčnika ali benignih tumorjih je zelo nizka. Zadnje študije so pokazale, da je HE4 najboljši marker pri I stopnji raka jajčnika, zato pa se uporablja za detekcijo v zgodnji fazi bolezni in pri bolnicah z velikim tveganjem za nastanek raka jajčnika in endometrija.

V raziskavo smo vključili 46 bolnic, ki so prišle na operativni poseg zaradi suma na karcinom ovarija ali endometrija. Po podatkih proizvajalca reagentov za določanje HE4 je zgornja mejna vrednost tega označevalca v serumih zdravih ljudi nad 70 pmol/L. Vse vrednosti, ki so bile višje od 70 pmol/L smo obravnavali kot pozitiven HE4 testni rezultat. Pri bolnicah, ki so bile vključene v raziskavo so bile serumske koncentracije HE4

povečane nad zgornjo mejno vrednostjo 70 pmol/L pri samo 6,5% (3/46) primerov. Ker so bile serumske koncentracije označevalca HE4 povišane le pri nekaterih bolnicah (3/46), lahko iz teh rezultatov sklepamo, da je HE4 slabo zanesljiv tumorski označevalec za odkrivanje raka jajčnika oz. endometrija.

V primerjavi s HE4 je CA 125 boljši označevalec za odkrivanje raka jajčnikov in endometrija, saj so bile serumske koncentracije povišane pri 30,4% bolnic (14/46). Vendar pa se moramo zavedati, da lahko zvišane vrednosti CA 125 opazimo tudi pri bolnicah z benignimi in malignimi ginekološkimi boleznimi (ciste na jajčnikih, rak materničnega vratu), kot tudi pri bolnicah z ne ginekološkimi malignimi boleznimi (rak pljuč, rak dojke...). Pri 14 pacientkah (30,4%) pa je bil vsaj en tumorski označevalec povišan in s tem ne izboljšamo detekcije v primerjavi z določanjem samo CA 125, saj je bilo pri določanju CA 125 enako število bolnic s povišanimi serumskimi koncentracijami (30,4%). Ugotovili smo tudi, da je tumorski označevalec uspešen označevalec pri razlikovanju karcinomov ovarija in endometrija od benignih sprememb, saj je bilo od celotne skupine 46 pacientk, benignih primerov 32, in sicer 69,5%. To lahko upravičimo tudi z dejstvom, da je pri raziskavi imel serumski HE4 največjo občutljivost (72,9%) in specifičnost (95%) za prepoznavanje malignomov. Iz tega je razvidno, da je tumorski označevalec HE4 zelo specifičen in občutljiv za odkrivanje raka jajčnikov oz. endometrija.

Iz literature je razvidno, da so serumske koncentracije tumorskega označevalca odvisne od količine oz. velikosti tumorske mase, zrelosti tumorja in diferenciacije tumorja (33). Pri naši raziskavi nismo imeli podatkov o stadiju tumorja, zato smo se osredotočili na biokemično določanje uporabnosti označevalca HE4 pri raku jajčnika oz. endometrija.

Rak jajčnikov in endometrija sta zelo pomembni obliki raka pri ženskem reproduktivnem sistemu. Rak endometrija je najpogostejši malignom ženskih spolovil, rak jajčnikov pa je po podatkih Registra raka za Slovenijo na tretjem mestu in že mnoga leta tisti, zaradi katerega umre največ bolnic. Vzrok visoke umrljivosti pri raku jajčnikov in endometrija je odkritje bolezni v že napredovali obliki (stadij III ali IV), pri večinoma starejših bolnicah nad 50 let. Zato je zelo pomemben razvoj diagnostičnih metod in čim prejšnje in uspešnejše odkrivanje zgodnjega raka jajčnikov in endometrija. Pri tem pa imajo velik pomen tumorski označevalci. Tumorski označevalci nam omogočajo učinkovito spremljanje odzivnosti tumorjev na zdravljenje in zgodnje odkrivanje bolezni v kombinaciji z drugimi metodami. Idealni tumorski označevalec bi se moral izločati vedno



kadar je tumor prisoten in ne bi ga smeli dokazati pri benignih boleznih. Vendar pa poznamo številne pomanjkljivosti tumorskih označevalcev, to so nezadostna specifičnost za vrsto rakave bolezni, tvorba označevalcev v visokih koncentracijah pri nemalignih boleznih (vnetja, nemaligne bolezni jeter...), različna fiziološka stanja (nosečnost, menstruacija, laktacija) in tvorba v povsem zdravih tkivih. Raziskave na področju tumorskih označevalcev slonijo na odkritju idealnih, novih, specifičnih označevalcev za maligne celice, ki naj bi bili po svojih lastnostih čimbolj podobni idealnemu tumorskemu označevalcu, ki bo omogočil zgodnjo diagnozo in bo zadostil kriterijem, potrebnim za presejanje.

Povzamemo lahko, da ima tumorski označevalec HE4 zelo pomembno klinično vlogo v onkologiji, vendar ga ne moremo uporabljati kot samostojno diagnostično metodo za odkrivanje raka jajčnikov in endometrija, saj je še vedno ključnega pomena ginekološki pregled in vaginalna ultrazvočna preiskava.

## **6. SKLEP**

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti ali je tumorski označevalec HE4 bolj učinkovit označevalec od CA 125 za odkrivanje raka na jajčnikih in endometrija.

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo naslednje:

- Tumorski označevalec HE4 je manj učinkovit označevalec od CA 125 za odkrivanje raka na jajčnikih in endometrija, saj je bil povišan samo pri treh bolnicah (6,5%). Zaradi tega dejstva ga uporabljamo v kombinaciji z drugimi diagnostičnimi metodami.
- Tumorski označevalec CA 125 je boljši pokazatelj procesa za odkrivanje raka jajčnika oz. endometrija, saj je bil povišan pri 14 bolnicah (30,4%).
- Pri 14 pacientkah (30,4%) je bil vsaj en tumorski označevalec povišan in s tem ne izboljšamo detekcije v primerjavi z določanjem samo CA 125.
- Označevalec HE4 je specifičen, zanesljiv označevalec pri razlikovanju karcinomov ovarijskega in endometrijskega izvora od benignih cist, saj je bilo od celotne skupine 46 pacientk, benignih primerov 32, in sicer 69,5%.

Obravnavali smo izredno majhno skupino bolnic z rakom jajčnika oz. endometrija zato tudi nismo dobili pričakovanih rezultatov in šele nadaljnje raziskave bodo pokazale pravo vrednost tumorskega označevalca HE4.

## **7. LITERATURA**

1. Zadnik V. Preživetje bolnic z rakom jajčnikov, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana 1998: 9-12.
2. Fležar M. Doktorsko delo; Jedrne značilke seroznih tumorjev jajčnika, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana 2000: 1-8.
3. But I. Doktorsko delo; DNA ploidija in CA 125 pri seroznem raku jajčnika, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana 1998: 18-28.
4. Požlep B. Magistrska naloga; Induktorji ovulacije in rak jajčnika, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Katedra za ginekologijo in porodništvo, Ljubljana 1998: 13-18.
5. Žakelj A, Rakar S., Gašperšič Oblak T. Priročnik za ženske z rakom na jajčnikih, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana 2001: 7.
6. Onkologija/klinično-patološka konferenca. Prikaz bolnice z rakom jajčnikov s komentarji (dostopano: 22.12.2010).  
URL=«<http://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/dokumenti/1-2001-vrscaj.pdf>».
7. Vizita.si. Rak jajčnikov (dostopano: 20.12.2010).  
URL=«<http://vizita.si/clanek/leksikon/rak-jajcnikov.html>».
8. Splošna bolnišnica Novo mesto. Preiskave raka na jajčniku (dostopano: 20.12.2010).  
URL=«[http://www.sb-nm.si/preiskave/c/ca\\_125.aspx](http://www.sb-nm.si/preiskave/c/ca_125.aspx)».
9. Tortolero-Luna G, Mitchell MF, Rhodes-Morris HE. Epidemiology and screening of ovarian cancer, *Obstet Gynecol Clin, North Am* 1994; 21: 1-2.
10. Whittemore AS, Harris R, Itnyre J, Halpern J. The Collaborative Ovarian cancer Group. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US-case control studies. *Am J Epidemiol* 1992; 36: 1175-220.
11. Stadel BV. The etiology and prevention of ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1975; 123: 772-3.
12. Cramer DW, Hutchinson GB, Welch WR, Scully RE, Knapp RC. Factors affecting the association of oral contraceptives and ovarian cancer. *N Engl J Med* 1982; 307: 1047-51.
13. Mosgaard BJ, Lidegaard O, Andersen AN. Infertility, fertility drugs and invasive ovarian cancer. A case control study. *Fertil Steril* 1997, 67: 1005-12.

14. Hartge P, Schiffman M, Hoover R, McGowan L, Leshner L, Norris H. A case control study of epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161: 10-6.
15. Fathalla MF. incessant ovulation- a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 1971; 2: 163.
16. Shoham Z. Epidemiology, etiology and fertility drugs in ovarian epithelial cancer: Where are we today? *Fertil Steril* 1994; 62: 433-8.
17. Zajicek J. Prevention of ovarian cystomas by inhibition of ovulation, a new concept. *J Reprod Med* 1978; 2: 114.
18. Lowry S, Russel H, Hickey I, Atkinson R. Incessant ovulation and ovarian cancers. *Lancet* 1991; 337: 1544-5.
19. Balash J, Barri PN. Follicular stimulation and ovarian cancer? *Hum Reprod* 1993; 8: 990-6.
20. Casagrande JT, Pike ML, Ross RK, Louis EW, Roy S, Henderson BE: Incessant ovulation and ovarian cancer. *Lancet* 1979, 2: 170-2.
21. Stadel BV. The etiology and prevention of ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1975; 123: 772-3.
22. Cramer DW, Hutchinson GB, Welch WR, Scully RE, Knapp RC. Factors affecting the association of oral contraceptives and ovarian cancer. *N Engl J Med* 1982; 307: 1047-51.
23. Artini PG, Fasciani A, Cela V eds. Fertility druds and ovarian cancer. *Gynecol Endocrinol* 1997; 11: 59-68.
24. Kaufmann SC, Spirtas R, Face PH, Aleksander NJ. Do fertility drugs cause ovarian tumours? *J Womens Health* 1995; 4: 247-59.
25. Staufer RL, Grodin MS, Davis JR, Surwit EA. Investigation of binding sites for follicle stimulating hormone and chorionic gonadotropin in human ovarian cancers. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 59: 441-6.
26. Kuroda. H, Konishi I, Mandai M, Nanbu K, Rao Chv, Mori T. Ovarian cancer in infertile women during or after ovulation induction therapy: expression of LH/hCG receptors and sex steroid receptors. *Int J Gynecol Cancer* 1997; 7: 451-457.
27. Matzuk MM, Finegold MJ, Su JJ, Hsueh AJW, Bradley A. A alfa- inhibin is a tumor supressor gene eith gonadal specificity in mice. *Nature* 1992; 360: 313 -9.
28. Kumar TR, Wang Y, Matzuk MM. Gonadotropins are essential modifier factors for gonadal tumor development in inhibin deficient mice. *Endocrinology* 1996; 137: 4210-6.

**Andoljšek A.**

***Določanje tumorskega označevalca HE4 pri raku jajčnika oziroma endometrija***

29. Fleisher AC. Ovarian masses.V: Fleischer AC. Kepple DM. Transvaginal sonography: A Clinical Atlas. Philadelphia, 1995: 131-4.
30. Pettersson F. Annual Report on the results of treatment in gynecological cancer Vol. 22 Stockholm: FIGO, 1994: 38-43, 83-103.
31. Uršič-Vrščaj M. Rak jajčnika In: Fras PA. Onkologija, Ljubljana: Onkološki inštitut, 1994: 305-9.
32. National Cancer Institute. Screening for ovarian cancer (dostopano: 10.1.2010)  
URL: <http://imsdd.meb.uni-bonn.de/cancernet/305145.html>
33. Kostrevc S; diplomska naloga. Določanje tumorskega označevalca CA 125 pri raku jajčnika, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2003, 20-24.
34. Imunokemijske metode. Radioimunska metoda (dostopano: 10.1.2010)  
URL: <http://www.google.si/#hl=sl&source=hp&q=radioimunska+metoda&btnG=Iskanje+Google&meta=&aq=f&oq=radioimunska+metoda&fp=c77c2aa6da072987>.
35. Wikipedia. CA-125 (dostopano: 24.1.2010)  
URL: <http://eu.wikipedia.org/wiki/CA-125>.
36. Fleuren GJ, Nap M, Aalders JG, Trimbos JB, Bruijn Hwa. Explanation of the limited correlation between tumor CA 125 content and serum CA 125 antigen levels in patients with ovarian tumors. Cancer 1987; 60: 2437-42.
37. Cancer of the ovary and HE4 a promising screening test. (dostopano: 2.2.2010)  
URL: <http://ezinearticles.com/?Cancer-of-the-Ovary-and-HE4---A-Promising-Screening-Test&id=891511>
38. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. (dostopano: 2.2.2010)  
URL: <http://www.nature.com/modpathol/journal/v19/n6/full/3800612a.html>
39. HE4 as a biomarker for ovarian and endometrial cancer management: (dostopano: 2.2.2010)  
URL: <http://www.expert-reviews.com>
40. Uvod v patologijo.(dostopano: 27.2.2010)  
URL: [www.rafter.si/F-Z-V/1.../PATOLOGIJA/01%20Uvod%20v%20patol.doc](http://www.rafter.si/F-Z-V/1.../PATOLOGIJA/01%20Uvod%20v%20patol.doc)
41. Šmuc T. Doktorska disertacija; Uravnavanje delovanja estrogenov in progesterona pri endometriozni in raku endometrija, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana 2009: 13-15
42. Akhmedkhanov A, Zeleniuch-Jacquotte A, Toniolo P. Role of exogenous and endogenous hormones in endometrial cancer, Ann N Y Acad Sci 2001; 11: 339-48.
43. Olive DL, Barrie Schwartz L: Endometriosis. New Eng J Med 1993; 328: 1759-69.

44. Berkley KJ, Rapkin AJ, Papka RE. The pains of endometriosis. *Science* 2005; 308: 1587-9.
45. Nisolle M, Donnez J. Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal are three different entities. *Fertil Steril* 1997; 68: 585-96.
46. Gergolet M. Magistrsko delo; Pomen razvojnih nepravilnosti maternice v etiologiji spontanega splava pri bolnicah z endometriozo, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana 2008: 14
47. Endometriosis and Endometrial Cancer. Preparation of in vitro Model and Identification of Novel Drug Targets: (dostopano: 15.3.2010)  
URL: <http://sicris.izum.si/search/prj.aspx?lang=slv&id=4059>
48. Pomen limfadenektomije pri raku endometrija (pregledni prispevek). (dostopano: 15.3.2010)  
URL: <http://vestnik.szd.si/st3-s2/043-046.pdf>
49. Medeno srce. Ginekološki raki: (dostopano: 16.3.2010)  
URL: <http://www.medenosrce.net/pogled.asp?ID=297>
50. Wikipedija. Endometrioza: (dostopano: 21.3.2010)  
URL: <http://sl.wikipedia.org/wiki/Endometrioza>
51. Jarkovič M. Diplomaska naloga; Klinični pomen določanja alfafetoproteina pri hepatocelularnem karcinomu različne etiologije, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2009: 18
52. Osredkar J. Seminarska naloga; Vrednotenje tumorskega označevalca HE4 pri raku ovarija in endometrija