

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA ŠTIRN

**UPORABNOST ALGORITMA ZA UGOTAVLJANJE TVEGANJA  
OVARIJSKEGA RAKA NA OSNOVI TUMORSKIH  
OZNAČEVALCEV CA 125 IN HE4**

**USEFULNESS OF THE RISK OF OVARIAN MALIGNANCY  
ALGORITHM BASED ON TUMOR MARKERS CA 125 AND HE4**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom mag. Barbare Možina, mag. farm., spec. med. biokem.

Praktični del diplomske naloge sem v celoti opravila na Oddelku za laboratorijske dejavnosti na Onkološkem inštitutu Ljubljana.

## **Zahvala**

Za vso strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi diplomske naloge se iskreno zahvaljujem mentorju prof. dr. Borutu Božiču, mag. farm., spec. med. biokem.

Iskrena hvala tudi somentorici mag. Barbari Možina, mag. farm., spec. med. biokem., ki mi je omogočila opravljanje diplomske naloge na Oddelku za laboratorijske dejavnosti na Onkološkem inštitutu Ljubljana, ter za vso strokovno pomoč in koristne napotke.

Zahvaljujem se Mariji Zalar za pomoč pri zbiranju vzorcev.

Največja zahvala gre mojim staršem, ki so mi omogočili študij, verjeli vame ter me spodbujali in podpirali. Hvala tudi Gregorju, ter vsem prijateljem, ki so mi tekom študija stali ob strani.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom mag. Barbare Možina, mag. farm., spec. med. biokem..

Mateja Štirn

Predsednica diplomske komisije: Prof. dr. Irena Mlinarič Raščan, mag. farm.

Član diplomske komisije: Asist. Nejc Horvat, mag. farm.

## KAZALO VSEBINE

|                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| POVZETEK .....                                                                           | III |
| KAZALO SLIK.....                                                                         | IV  |
| KAZALO PREGLEDNIC.....                                                                   | V   |
| SEZNAM OKRAJŠAV .....                                                                    | VI  |
| 1. UVOD.....                                                                             | 1   |
| 1.1. JAJČNIKI .....                                                                      | 1   |
| 1.2. RAK JAJČNIKOV .....                                                                 | 1   |
| 1.3. EPIDEMIOLOGIJA RAKA JAJČNIKOV .....                                                 | 3   |
| 1.4. TUMORSKI OZNAČEVALCI.....                                                           | 4   |
| 1.4.1. DOLOČANJE TUMORSKIH OZNAČEVALCEV .....                                            | 4   |
| 1.4.2. LASTNOSTI TUMORSKIH OZNAČEVALCEV .....                                            | 5   |
| 1.5. TUMORSKI OZNAČEVALCI RAKA JAJČNIKOV .....                                           | 6   |
| 1.5.1. TUMORSKI OZNAČEVALEC CA 125 .....                                                 | 6   |
| 1.5.2. METODE DOLOČANJA TO CA 125.....                                                   | 7   |
| 1.5.3. TUMORSKI OZNAČEVALEC HE4 .....                                                    | 8   |
| 1.5.4. METODE DOLOČANJA TO HE4.....                                                      | 9   |
| 1.6. AVTOMATIZIRANE METODE MERJENJA TO CA 125 IN HE4.....                                | 10  |
| 1.6.1. HETEROGENA NEKOMPETITIVNA ELEKTROKEMILUMINISCENTNA<br>IMUNOKEMIJSKA TEHNIKA ..... | 10  |
| 1.6.2. NEKOMPETITIVNA KEMILUMINISCENTNA IMUNOTEHNIKA Z<br>MIKRODELICI .....              | 11  |
| 1.7. ALGORITEM ZA UGOTAVLJANJE TVEGANJA OVARIJSKEGA RAKA.....                            | 12  |
| Izračun napovednega indeksa.....                                                         | 14  |
| Izračun vrednosti ROMA .....                                                             | 14  |

|                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| Indeks malignega tveganja .....                                               | 14 |
| 2. NAMEN DELA.....                                                            | 16 |
| 3. MATERIALI IN METODE .....                                                  | 17 |
| 3.1. ZBIRANJE VZORCEV .....                                                   | 17 |
| 3.2. ANALIZA VZORCEV .....                                                    | 18 |
| 3.2.1. PRIPRAVA VZORCEV .....                                                 | 18 |
| 3.2.2. POSTOPEK MERJENJA TO CA 125 V SERUMU .....                             | 18 |
| 3.2.3. POSTOPEK MERJENJA TO HE4 V SERUMU .....                                | 20 |
| 3.2.4. KALIBRATORJI IN KONTROLE .....                                         | 22 |
| 3.2.5. REAGENTI ZA DOLOČANJE TO CA 125 .....                                  | 23 |
| 3.2.6. REAGENTI ZA DOLOČANJE TO HE 4 .....                                    | 23 |
| 3.2.7. OSTALI REAGENTI IN POTROŠNI MATERIAL .....                             | 24 |
| 3.3. OPREMA .....                                                             | 24 |
| 3.4. IZRAČUN VREDNOSTI ROMA .....                                             | 24 |
| Pražne vrednosti ROMA .....                                                   | 25 |
| 4. REZULTATI IN RAZPRAVA .....                                                | 26 |
| 4.1. Sprejemljivost nove metode merjenja TO CA 125 .....                      | 26 |
| 4.2. Primerjava rezultatov dveh avtomatiziranih metod merjenja TO CA 125..... | 27 |
| 4.3. Primerjava pozitivnih vrednosti TO CA 125 in HE4.....                    | 30 |
| 4.4. Primerjava izračunanih vrednosti ROMA.....                               | 31 |
| 4.5. Zaključki.....                                                           | 33 |
| 5. SKLEP .....                                                                | 34 |
| VIRI IN LITERATURA .....                                                      | 35 |
| PRILOGA.....                                                                  | 38 |

## POVZETEK

Maligni rak jajčnikov je nevarna ginekološka bolezen, ki se jo v začetni fazi razvoja težko prepozna, kasneje pa so možnosti za ozdravitev zelo slabe. Z namenom, da bi izboljšali diagnostično specifičnost in občutljivost zaznavanja malignega epiteljskega raka jajčnikov v zgodnji fazi, je Fujirebio Diagnostics razvil algoritem za izračun tveganja ovarijskega raka (ROMA). V enačbo ROMA sta vključeni koncentraciji tumorskih označevalcev CA 125 in HE4, za katera so dokazali, da sta skupaj učinkovitejši napovedni dejavnik tveganja za pojav malignega obolenja na jajčnikih.

Namen našega dela je bil ugotoviti ujemanje koncentracij tumorskega označevalca CA 125, dobljenih z dvema različnima avtomatiziranimi metodama določanja. Zanimalo nas je, če lahko za izračun vrednosti ROMA namesto CA 125 izmerjenega z Abbottovo metodo, uporabimo CA 125 izmerjen z Rochevo metodo. Meritve smo opravili na Oddelku za laboratorijske dejavnosti na Onkološkem inštitutu Ljubljana.

V diplomski nalogi smo uporabili enačbo ROMA, ki vključuje z Abbottovo avtomatizirano metodo izmerjeni vrednosti tumorskih označevalcev CA 125 in HE4, ter pripadajoči Abbottovi prazni vrednosti za predmenopavzne in pomenopavzne bolnice.

V raziskavo smo vključili 226 serumskih vzorcev onkoloških bolnic, ki so imele naročeno rutinsko preiskavo tumorskega označevalca CA 125, ki jo izvajamo na analizatorju Modular Analytics E170 (Roche). V serumih smo nato določili še koncentracijo tumorskih označevalcev CA 125 in HE4 na analizatorju Architect i1000 (Abbott). Abbottova metoda deluje na principu kemiluminiscentne imunotehnike z mikrodelci (CMIA) za kvantitativno določitev antigena HE4 ali CA 125 v humanem serumu. Za vsak vzorec smo izračunali dve vrednosti ROMA. Prvič smo v enačbi uporabili tumorski označevalec CA 125 izmerjen z Abbottovo metodo (ROMA 1), ter drugič z Rochevo metodo (ROMA 2).

S statistično primerjavo dobljenih vrednosti CA 125, izmerjenih z Rochevo in Abbottovo metodo smo ugotovili, da se vrednosti med seboj zadovoljivo ujemajo ( $r = 0,9925$ ). Z Wilcoxonovim testom predznačenih rangov smo dokazali, da se vrednosti CA 125 statistično značilno ne razlikujejo ( $p = 0,408$ ). S statistično analizo vrednosti ROMA 1 in ROMA 2 smo ugotovili, da imajo vrednosti zelo dobro linearno povezavo s korelacijskim koeficientom 0,999. Zelo dobro so se ujemale tudi opisne mere variabilnosti in srednje vrednosti ROMA 1 in ROMA 2. Iz vseh ugotovitev smo sklenili, da lahko za izračun vrednosti ROMA uporabimo tudi tumorski označevalec CA 125 izmerjen z Rochevo metodo (Modular Analytics E170) in upoštevamo Abbottovi prazni vrednosti ROMA.

## KAZALO SLIK

|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Slika 1:</b> Prikaz ženskih spolnih organov. ....                                                                   | 1  |
| <b>Slika 2:</b> Najpogostejše lokacije raka pri ženskah, Slovenija 2007(8). ....                                       | 3  |
| <b>Slika 3:</b> Princip heterogene nekompetitivne elektrokemiluminiscentne imunotehnike (ECLIA) .....                  | 11 |
| <b>Slika 4:</b> Princip nekompetitivne kemiluminiscentne imunotehnike z mikrodenci (CMIA)...                           | 12 |
| <b>Slika 5:</b> Prikaz pripravljenih vzorcev v stojalih pred analizo. ....                                             | 18 |
| <b>Slika 6:</b> Analizator Architect i1000SR na katerem smo izvedli meritve tumorskih označevalcev CA 125 in HE4. .... | 19 |
| <b>Slika 7:</b> Prikaz notranjosti analizatorja Architect i1000. ....                                                  | 22 |
| <b>Slika 8:</b> Reagentna kompleta Architect CA 125 II in HE4. ....                                                    | 23 |
| <b>Slika 9:</b> Prikaz razporeditve vrednosti tumorskega označevalca CA 125 okrog prazne vrednosti (35 kU/L). ....     | 28 |
| <b>Slika 10:</b> Prikaz odnosa med tumorskima označevalcema CA 125, izmerjenima z rutinsko in novo metodo. ....        | 29 |
| <b>Slika 11:</b> Prikaz odnosa med vrednostmi ROMA 1 in ROMA 2 ter regresijska premica. ..                             | 32 |

## KAZALO PREGLEDNIC

|                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b><i>Preglednica I:</i></b> Prikaz predmenopavznih in pomenopavznih skupin ter pozitivnih in negativnih skupin. ....                                                          | 17 |
| <b><i>Preglednica II:</i></b> Primerjava rutinske in nove metode merjenja tumorskega označevalca CA 125. ....                                                                  | 26 |
| <b><i>Preglednica III:</i></b> Opisne mere za vrednosti obeh avtomatiziranih metod merjenja tumorskega označevalca CA 125. ....                                                | 27 |
| <b><i>Preglednica IV:</i></b> Število pozitivnih rezultatov tumorskih označevalcev CA 125 (rutinska metoda) in HE4 v predmenopavzni in pomenopavzni skupini bolnic. ....       | 31 |
| <b><i>Preglednica V:</i></b> Opisne mere za vrednosti ROMA 1 in ROMA 2. ....                                                                                                   | 32 |
| <b><i>Preglednica VI:</i></b> Prikaz dobljenih koncentracij tumorskih označevalcev CA 125 in HE4 ter izračuna vrednosti ROMA1 in ROMA 2 za predmenopavzno skupino bolnic. .... | 38 |
| <b><i>Preglednica VII:</i></b> Prikaz dobljenih koncentracij tumorskih označevalcev CA 125 in HE4 ter izračuna vrednosti ROMA1 in ROMA 2 za pomenopavzno skupino bolnic. ....  | 40 |
| <b><i>Preglednica VIII:</i></b> Kontrolne vrednosti tumorskega označevalca HE4. ....                                                                                           | 43 |
| <b><i>Preglednica IX:</i></b> Kontrolne vrednost tumorskega označevalca CA 125. ....                                                                                           | 44 |

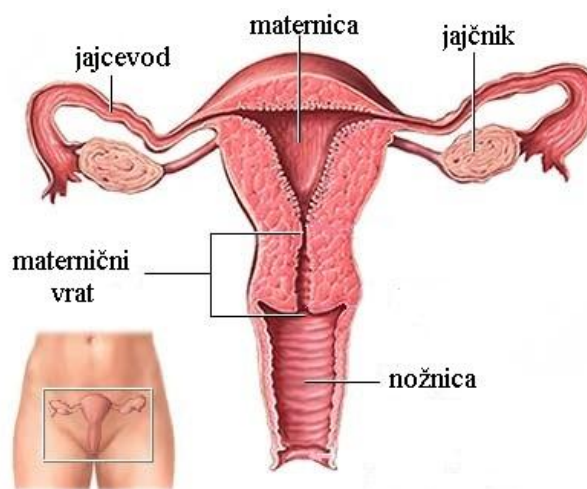
## SEZNAM OKRAJŠAV

| <i>OKRAJŠAVA</i> | <i>RAZLAGA OKRAJŠAVE</i>                                                                                                                      |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AFP              | alfafetoprotein                                                                                                                               |
| $\beta$ hCG      | Beta humani horionski gonadotropin                                                                                                            |
| CA 125           | karbohidratni antigen 125                                                                                                                     |
| CE certifikat    | Evropski certifikat ustreznosti<br>(Conformité Européenne)                                                                                    |
| CEA              | karcioembrionalni antigen                                                                                                                     |
| CMIA             | kemiluminiscentna imunotehnika z<br>mikrodelci ( <u>c</u> hemiluminescent<br><u>m</u> icroparticle <u>i</u> mmuno <u>a</u> ssay)              |
| EIA              | encimskoimunska tehnika                                                                                                                       |
| FDA              | Združenje za hrano in zdravila (Food<br>and Drug Association)                                                                                 |
| HE4              | humani nadmodni (epididimalni)<br>protein 4                                                                                                   |
| HAMA             | humano anti-mišje protitelo (human<br>anti-mouse antibody)                                                                                    |
| MPt              | monoklonsko protitelo                                                                                                                         |
| Pt               | protitelo                                                                                                                                     |
| ROMA             | algoritem za ugotavljanje tveganja<br>ovarijskega raka (the <u>r</u> isk of <u>o</u> varian<br><u>m</u> alignancy <u>a</u> lgorithm)          |
| TO               | tumorski označevalec                                                                                                                          |
| WFDC             | strženski kisli sirotkini proteini s 4-<br>disulfidnimi vezmi ( <u>w</u> hey acidic <u>f</u> our-<br><u>d</u> isulfide <u>c</u> ore proteins) |

## 1. UVOD

### 1.1. JAJČNIKI

Jajčnika sta ovalni ženski spolni žlezi, ki ležita levo in desno ob maternici v mali medenici. Na eni strani sta pritrjena na zunanji zgornji del maternice, na drugi pa na steno medenice (Slika 1). V ženskem reprodukativnem obdobju meri jajčnik približno 35 x 25 x 15 milimetrov in ima obliko sploščene slive. Sestavlja ga sredica in skorja ter obdaja bela čvrsta vezivna ovojnica. V sredici je vezivno tkivo z žilami in živci, v skorji pa številni folikli, v katerih dozorevajo jajčeca. Osnovna funkcionalna enota jajčnika je jajčni folikel z jajčecem, ki po puberteti dozori približno na vsakih osemindvajset dni. Na dozorevanje folikla vpliva folikle stimulirajoči hormon (FSH) iz adenohipofize. Jajčnik proizvaja estrogene, androgene in progesteron, ter sprošča jajčeca, kar imenujemo ovulacija (1, 2).



*Slika 1: Prikaz ženskih spolnih organov.*

### 1.2. RAK JAJČNIKOV

Rak je bolezen, za katero je značilna neprekinjena rast in delitev patoloških celic brez nadzora ter invazija oziroma rast v drugo tkivo. Celice postanejo rakaste zaradi poškodbe jedrne DNA. Rakaste celice se množijo ter tvorijo tkivo, ki mu pravimo tumor. Rak dobi ime po tkivu, kjer je prvotno nastal, ne glede na to, kam se je kasneje razširil.

Maligni rak jajčnikov je med vsemi ginekološkimi raki najnevarnejši in najsmrtonosnejši, predvsem zaradi neuspešnega prepoznavanja in diagnosticiranja v zgodnjem stadiju bolezni. Pojavlja se v vseh starostnih obdobjih. Pri bolnicah, mlajših od 20 let, so najpogostejši tumorji jajčnikov zarodnega epitelija, pri bolnicah starejših od 50 let, pa epiteljski raki jajčnikov (3).

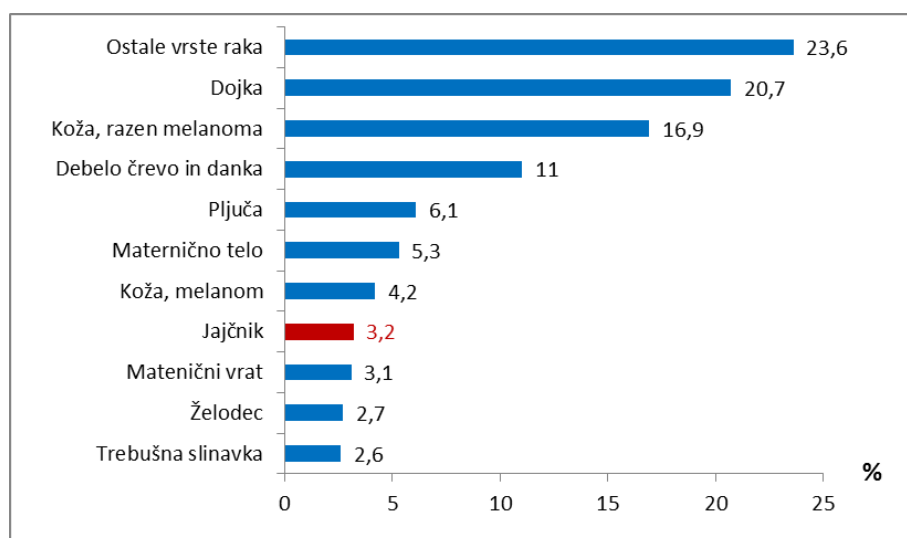
Tumorji jajčnikov so benigni ali maligni. Maligni se zelo hitro širijo z enega jajčnika na drug jajčnik, po trebušni votlini in na druga tkiva po telesu. Zdravljenje teh je težje in bolj zapleteno. Tumorje jajčnikov imenujejo glede na vrsto celic iz katerih nastanejo, ter glede na to ali so benigni, delno maligni ali maligni. Histološko jih delimo na epiteljske in neepiteljske. Med neepiteljske tumorje spadajo germinalni in stromalni tumorji. Epiteljski tumorji so najpogostejši, germinalni in stromalni pa se pojavljajo redkeje (1, 5).

Kljub večletnim naporom in raziskavam dobrega presejalnega testa še niso odkrili. Ugotovili so, da je rak jajčnikov klonska bolezen, ki v več kot 90% vznikne iz enake vrste celic. Da pride do maligne transformacije, pa so potrebne številne genetske spremembe v epiteliju jajčnikov. Genetsko prirojeni dejavniki se pojavijo v 5-10 %. Pri teh bolnicah so opazili hitrejši potek bolezni in slabše preživetje. Uspešnost zdravljenja je odvisna od zgodnje diagnoze. Vendar rak jajčnikov v zgodnji fazi ne povzroča značilnih bolezenskih znakov, zato se kar v dveh tretjinah primerov ugotovi v III. in IV. stadiju (3). Večja uspešnost diagnosticiranja je pri ženskah, ki imajo glede na dejavnike visoko tveganje za razvoj raka jajčnikov. To so ženske z obremenilno družinsko anamnezo in ženske z mutiranimi geni za rak dojke (BRCA1 in BRCA2). Za te ženske se priporoča ginekološki pregled, vaginalni ultrazvok in določanje tumorskega označevalca CA 125 na pol leta.

V kombinaciji diagnostičnih postopkov za prepoznavanje raka jajčnikov lahko ženske opravijo več različnih preiskav: splošni ginekološki pregled, ultrazvok trebuha, transvaginalni ultrazvok, določitev vrednosti tumorskega označevalca CA 125 v serumu in laparaskopsko ali laparatomsko operacijo z biopsijo. Pri mlajših bolnicah se priporoča še določanje tumorskih označevalcev beta horionskega gonadotropina ( $\beta$ hCG), alfafetoproteina (AFP) in karcioembrionalnega antigena (CEA), da se izključi tumorje zarodnih celic (4).

### 1.3. EPIDEMIOLOGIJA RAKA JAJČNIKOV

Vsako leto po svetu za rakom jajčnikov zbolijo več kot 200.000 žensk. Med ginekološkimi raki je rak jajčnikov najnevarnejši in se najpogosteje konča s smrtnim izidom. Glede na umrljivost je na četrtem mestu med vsemi rakavimi obolenji. Vzrok je v tem, da ta vrsta raka v zgodnjem stadiju poteka prikrito, brez očitnih znakov, ali pa so znaki zelo nespecifični, zato se ga zelo težko odkrije. Ko pa bolezen napreduje v poznejše maligne stadije in se pojavijo očitnejši znaki, pa je napoved za ozdravitev in preživetje zelo slaba (6, 7). Rak jajčnikov se najpogosteje pojavlja pri starejših belopolnih ženskah. Približno polovica žensk je starih 60 let in več. Pet-letno preživetje bolnic s stadijem I ali II je 80 % do 93 %, s stadijem III ali IV pa le 5 % do 37 %. Bolnice mlajše od 65 let imajo boljšo napoved ozdravitve, kot starejše (5). Približno 75 % rakov jajčnikov je odkritih v napredovanih in le 25 % v zgodnjih stadijih (4). V Sloveniji vsako leto odkrijejo povprečno 168 novih primerov raka jajčnikov (izračun je narejen s podatki od leta 1985 do 2007). V letu 2007 so pri ženskah potrdili 174 primerov. Rak jajčnikov je v Sloveniji pri ženskah na 7. mestu po pojavnosti, takoj za kožnim melanomom (Slika 2). Na dan 31.12.2007 so našli skupno 1.521 vseh bolnic, ki so bile žive na izbrani datum, ne glede na to, kdaj so zbolele. V Sloveniji povprečno vsako leto zaradi raka jajčnikov umre 114 žensk (podatki od leta 1985 do 2007). Leta 2007 jih je umrlo 132 (8).



**Slika 2:** Najpogostejše lokacije raka pri ženskah, Slovenija 2007 (8).

## 1.4. TUMORSKI OZNAČEVALCI

Tumorski označevalci (TO) so snovi v celicah, tkivu in telesnih tekočinah. Določa se jih kvalitativno ali kvantitativno s kemičnimi, imunološkimi ter z molekularno biološkimi metodami. TO nastanejo v malignih celicah ali v normalnih celicah pod vplivom delovanja malignih celic (9). Najpogosteje se jih določa v serumu in plazmi. Loči se jih na snovi, ki so običajno prisotne v veliko manjših koncentracijah, ter na novo sintetizirane snovi. Označevalci, poznani do danes, se redko uporabljajo kot presejalna metoda zaradi nizke specifičnosti za tkivo, organ in vrsto rakave bolezni. Vseh označevalcev se ne uporablja z istim namenom (10). Najpogosteje se jih uporablja za spremljanje terapije, postopka zdravljenja in za ugotavljanje napredovanja bolezni. Ker koncentracije TO v krvi odražajo dinamično stanje, se lahko njihove meritve ponavljajo. Za klinično uporabo TO in tehnološki razvoj metod veljajo mednarodna priporočila, ter vključene zahteve za kakovost in nadzor TO, ki so jih pripravila evropska in ameriška združenja, kot je American Society of Clinical Oncology (ASCO), European Group of Tumor Markers (EGTM), National Academy of Clinical Biochemistry (NACB) in International Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) (11).

TO razvrstimo v deset skupin: encimi, hormoni, onkofekalni antigeni, citokeratini, karbohidratni tumorski označevalci, krvni antigeni, proteini, receptorji in drugi označevalci, genski označevalci ter mešani tumorski označevalci (9).

### 1.4.1. DOLOČANJE TUMORSKIH OZNAČEVALCEV

TO imajo navadno v telesnih tekočinah zelo nizke koncentracije, zato za njihovo dokazovanje uporabljamo visokoobčutljive tehnike:

- radioimunske (RIA),
- encimsko-immunske (ELISA, EIA) in
- luminometrične tehnike (kemiluminiscenca).

Z naštetimi tehnikami se lahko določa zelo majhne koncentracije antigena. Koncentracije TO, ki so izmerjene z različnimi metodami ali z enakimi metodami različnih proizvajalcev, se navadno med seboj razlikujejo. Na to lahko vpliva razlika v kvaliteti in specifičnosti

protiteles, ki so v testnem kompletu usmerjena proti različnim epitopom, ter razlika v različnih označevalcih in kalibratorjih. Uporaba enakih metod in enakih protiteles v testih različnih proizvajalcev, daje pri istem vzorcu različne rezultate. Da se rezultate lažje interpretira, je potrebno narediti več določitev tumorskih označevalcev v različnih stadijih bolezni z enako metodo in po možnosti v istem laboratoriju, ter spremljati gibanje njihovih koncentracij. Prav tako je potrebno upoštevati biološko razpolovno dobo, ki je pri različnih tumorskih označevalcih različna in se giblje od nekaj ur do nekaj tednov. Koncentracija tumorskih označevalcev v telesnih tekočinah je odvisna od različnih dejavnikov, kot je vrsta, velikost in razširjenost tumorja, prekrvljenost in stopnja nekroze tumorskega tkiva ter razpolovni čas TO in vpliv protiteles (11, 12).

#### **1.4.2. LASTNOSTI TUMORSKIH OZNAČEVALCEV**

Z diagnostično specifičnostjo in diagnostično občutljivostjo se natančno opredeli lastnost posameznega tumorskega označevalca. Občutljivost predstavlja delež odkritih obolelih, ki imajo zvišano vrednost tumorskega označevalca v primerjavi z vsemi obolelimi. Čim večji je delež bolnikov z istim tumorjem in z zvišano vrednostjo označevalca, tem bolj je le-ta označevalec občutljiv. Za občutljivost tumorskega označevalca se pričakuje čim manjše število lažno negativnih in čim večje število resnično pozitivnih rezultatov. S kombinacijo dveh ali več tumorskih označevalcev lahko povečamo diagnostično občutljivost. Diagnostična specifičnost pa predstavlja delež zdravih preiskovancev z resnično negativnim rezultatom tumorskega označevalca. Označevalec je tem bolj diagnostično specifičen, čim manjkrat je prisoten pri ljudeh, ki nimajo določene vrste tumorja, oziroma čim manj je lažno pozitivnih in čim več je resnično pozitivnih določitev. Idealni tumorski označevalec naj bi imel 100 % diagnostično specifičnost in diagnostično občutljivost za določeno vrsto raka ter prazno vrednost nič (naj ne bi bil prisoten pri zdravih preiskovancih). Vendar takega označevalca ni. Referenčno območje ali prazna vrednost ni nikoli nič, saj se za tumorske označevalce uporablja snovi, ki so prisotne tudi v drugih celicah. Postavijo jo tako, da je čim manj lažno negativnih in lažno pozitivnih rezultatov. Pri isti vrsti rakave bolezni je mogoče določati več označevalcev hkrati. S kombinacijo se lahko poveča diagnostična občutljivost določanja in zmanjša diagnostična specifičnost. Z izbiro pravih označevalcev, se diagnostična specifičnost minimalno zmanjša, medtem ko se

diagnostična občutljivost pomembno poveča. Primer dobre kombinacije označevalcev sta  $\beta$ hCG in AFP za neseminomske germinalne tumorje ter CA125 in HE4 za epitelijske tumorje jajčnikov (11, 12).

## **1.5. TUMORSKI OZNAČEVALCI RAKA JAJČNIKOV**

Znanih je več vrst TO, ki so jih zaznali v telesnih tekočinah in v tkivu bolnic z rakom jajčnikov. Ti preučevani TO bi lahko v prihodnosti predstavljali obetajoče nove označevalce za diagnosticiranje, spremljanje bolezni in lahko celo za presejanje raka jajčnikov. V današnjem času se v laboratorijski diagnostiki uporablja le TO CA 125. Pred časom se je uveljavil tudi novi TO HE4, za katerega so v letu 2009 predstavili avtomatizirano metodo merjenja Architect HE4. Združenji NACB in EGTM priporočajo uporabo TO CA 125 in HE4 za pomoč pri diagnostiki, za spremljanje terapije in za napoved ponovitve raka jajčnikov. Za vse ostale serumske TO pa združenji ne priporočata uporabe za diagnosticiranje, detekcijo in spremljanje raka jajčnikov, saj so bodisi v fazi ocenjevanja, raziskovanja ali odkrivanja. Ti so Her2/neu, gen AKT2, inhibin, tumor povezani tripsinski inhibitor (TATI), z rakom povezani serumski antigen (CASA), tkivni polipeptidni antigen (TPA), CEA, osteopontin, inhibin, prostasin, lizofosfatna kislina (LPA), hCG, fibrinolitični označevalci PAI-1 in PAI-2, interleukin-6, Rsf-1, NAC-1, mitogeno aktivirana protein kinaza (MAPK) in družina Kallikrein (6).

### **1.5.1. TUMORSKI OZNAČEVALEC CA 125**

Karbohidratni antigen CA 125 je glikoprotein z molekulsko maso večjo od 200.000. TO CA 125 spada v družino mucinskih antigenov (MUC16) in vsebuje 24 % ogljikovih hidratov. V zvišanih koncentracijah nastaja predvsem pri epitelijem raku jajčnikov. Pri odraslih je prisoten v sluznici materničnega vratu, pljučnem parenhimu in v zdravem tkivu jajčnikov. Fiziološka funkcija CA 125 v telesu ni poznana. Monoklonska protitelesa (MPt) OC 125, katera so uporabljena v metodah določanja antigena CA 125, so razvili Bast in sodelavci leta 1981. MPt OC 125 so izolirali s pomočjo celične linije OVCA 433, ki so jih pridobili iz bolnice s seroznim papilarnim cističnim adenokarcinomom jajčnikov. MPt OC

125 prepoznajo epitope na antigenu CA 125. Ta MPt kažejo visoko specifičnost za rak jajčnikov in se lahko uporabljajo v različnih metodah določanja TO CA 125 (6, 9). CA 125 vsebuje tri antigenske domene: A-domena (OC 125), B-domena (M11) in C-domena (OV197) (26).

Serumska pražna vrednost TO CA 125 je 35 kU/L. Zvišane koncentracije se lahko pojavijo tudi pri neovarijskih karcinomih, kot je rak endometrija, pljuč, trebušne slinavke, dojke, debelega črevesa in danke ter pri drugih gastrointestinalnih tumorjih. Prav tako se lahko pojavijo zvišane koncentracije v folikularni fazi menstrualnega ciklusa, pri cirozi, hepatitisu, endometriozi, perikarditisu in v zgodnji nosečnosti. Evropska in ameriška združenja ne priporočajo uporabe TO CA 125 kot presejalni test raka jajčnikov zaradi diagnostično prenizke specifičnosti in slabe občutljivosti. TO CA 125 prav tako ni primeren za razlikovanje raka jajčnikov od ostalih malignih stanj (6, 9).

Pri karcinomu jajčnikov so zasledili zvišane vrednosti TO CA 125 pri 50 % bolnic v I. stadiju, pri 90 % bolnic v II. stadiju ter pri več kot 90 % bolnic v III. in IV. stadiju. Raven TO CA 125 v krvi korelira z velikostjo in stadijem tumorja. Biološka razpolovna doba TO CA 125 je normalno 4,8 dni, vendar se lahko čas razpolovne dobe giblje tudi od 5 do 10 dni (9).

### **1.5.2. METODE DOLOČANJA TO CA 125**

Prva metoda določanja TO CA 125 v serumu je bila Centocorjeva (danes Fujirebio Diagnostics) radioimunska tehnika, ki so jo predstavili leta 1983. Za lovljenje in detekcijo antigena CA 125 so v metodi uporabljali protitelesa OC 125 (6). Danes se v laboratorijski praksi uporablja avtomatizirana imunokemijska tehnika določanja TO CA 125 druge generacije (CA 125 II), ki za lovljenje antigena CA 125 uporablja MPt M11 in kot konjugat označeno MPt OC 125. Ta tehnika je bila odobrena s strani FDA (Food and Drug Administration) za kvantitativno določanje TO CA 125 v serumu bolnic s primarnim malignim epitelijskim rakom jajčnikov. Pražne vrednosti se lahko v testih določanja TO CA 125 pri različnih proizvajalcih razlikujejo zaradi razlik v kalibraciji, testni metodi in specifičnosti reagentov oziroma protiteles. Rezultati meritev so podani v poljubnih enotah kot U(enote)/mL. V laboratoriju podajamo rezultate v kU/L, po enotnem sistemu SI.

Priporoča se določitev CA 125 v serumu čim prej po centrifugiranju venske krvi. Vzorce se lahko hrani pri temperaturi 4 °C (1-5 dni), pri -20 °C (2 tedna - 3 mesece) ali daljši čas pri temperaturi -70 °C (6, 9, 13).

### 1.5.3. TUMORSKI OZNAČEVALEC HE4

Humani nadmodni protein 4 (HE4) je sekretorni protein, ki se aktivno sprošča v telesne tekočine. Uvrščamo ga v skupino proteaznih inhibitorjev strženskih kislih sirotkinih proteinov s 4-disulfidnimi vezmi (WFDC proteins). V dozoreli glikozilirani obliki ima molekulsko maso 20.000-25.000, ter je sestavljen iz enega peptida in dveh WFDC domen (15, 16). Protein HE4 so leta 1991 našli Kirchoff in sodelavci. Izolirali so ga iz nadmodnega tkiva in predvidevali, da kot proteazni inhibitor sodeluje pri dokončnem dozorevanju semenčic (30). Kasneje so Schummer in sodelavci ugotovili, da nastaja tudi v zdravem epitelijskem tkivu ženskih spolnih organov in respiratornem tkivu ter pri malignem raku jajčnikov. Zaznali so zvišane serumske koncentracije proteina HE4 pri bolnicah z rakom jajčnikov (31). HE 4 je postal obetajoči novi tumorski označevalec raka jajčnikov. Hellström in sodelavci so izvedli študijo uporabnosti proteina HE4 kot tumorskega označevalca karcinoma jajčnikov. Ugotovili so, da ima HE4 boljšo sposobnost razlikovanja med bolnicami z malignimi in benignimi boleznimi, kot TO CA 125. Razvili so tudi 2H5 in 3D8 monoklonska protitelesa proti različnim epitopom na antigenu HE4 v humanem serumu (32). V nadaljevalni študiji so primerjali HE4 z različnimi TO raka jajčnikov. Med vsemi TO je imel HE4 najboljšo diagnostično občutljivost za rak jajčnikov. V kombinaciji TO CA 125 in HE4 pa se je diagnostična občutljivost še zvišala (24). Čeprav TO HE4 ni tkivno specifičen, so s študijami dokazali, da je eden najuporabnejših biooznačevalcev karcinoma jajčnikov (24, 25).

Antigen HE4 se v krvi pojavlja v visokih koncentracijah predvsem pri seroznih, endometrioidnih in svetloceličnih epitelijskih tumorjih jajčnikov. V zdravem ovarijskem tkivu se pojavlja v minimalnih koncentracijah. Izraža se neodvisno od TO CA 125, ter v kombinaciji z njim daje še bolj uporabne informacije o raku jajčnikov. Določene vrste raka jajčnikov, kot so mucinozni epitelijski ali germinalni tumorji, redko izražajo HE4. Zato uporaba TO HE4 za spremljanje bolnic z znanimi mucinoznimi in germinalnimi tumorji jajčnikov ni priporočljiva. Ker se HE4 lahko pojavlja tako pri malignih kot pri nemalignih

obolenjih, se ga ne sme uporabljati kot presejalni ali samostojen diagnostični test (15). Anastasi in sodelavci so v študiji potrdili, da je HE4 dober zgodnji označevalec ponovitve raka na jajčnikih, saj je serumska koncentracija presegla prazno vrednost od 5 do 8 mesecev pred povišanjem serumske koncentracije TO CA 125 (18).

#### **1.5.4. METODE DOLOČANJA TO HE4**

Leta 2002 so pripravili HE4 monoklonska protitelesa in prototip HE4 encimskoimunске metode EIA, ter predstavili HE4 kot novi TO raka jajčnikov. V letu 2007 so Moore in sodelavi s študijo dokazali, da je HE4 zelo dober TO v zgodnji fazi epiteljskega raka jajčnikov (24). V tem času so pripravili tudi napovedni algoritem za ugotavljanje tveganja ovarijskega raka (ROMA). Prva metoda kvantitativnega določanja TO HE4 je bila encimskoimunska tehnika EIA, ki je bila leta 2008 odobrena s strani FDA, pridobila pa je tudi CE (Conformité Européenne) certifikat (16). Metoda je namenjena spremljanju ponovitve ali napredovanja epiteljskega raka jajčnikov. HE4 EIA je nekompetitivna sendvič imunoteknika, ki uporablja dve vrsti mišjih monoklonalnih protiteles 2H5 in 3D8 usmerjenih proti epitopoma C-WFDC. Z namenom, da bi pripravili avtomatizirano metodo merjenja TO HE4, so leta 2007 Abbott Laboratories in Fujirebio Diagnostics podpisali dogovor o sodelovanju. Avtomatizirana metoda z imenom Architect HE4 je bila pripravljena leta 2009 ter leta 2010 prejela CE certifikat in bila odobrena s strani FDA za diagnostično spremljanje zdravljenja raka jajčnikov. Metoda je kemiluminiscentna imunoteknika z mikrodelci (CMIA) in bo podrobneje opisana v nadaljevanju (16).

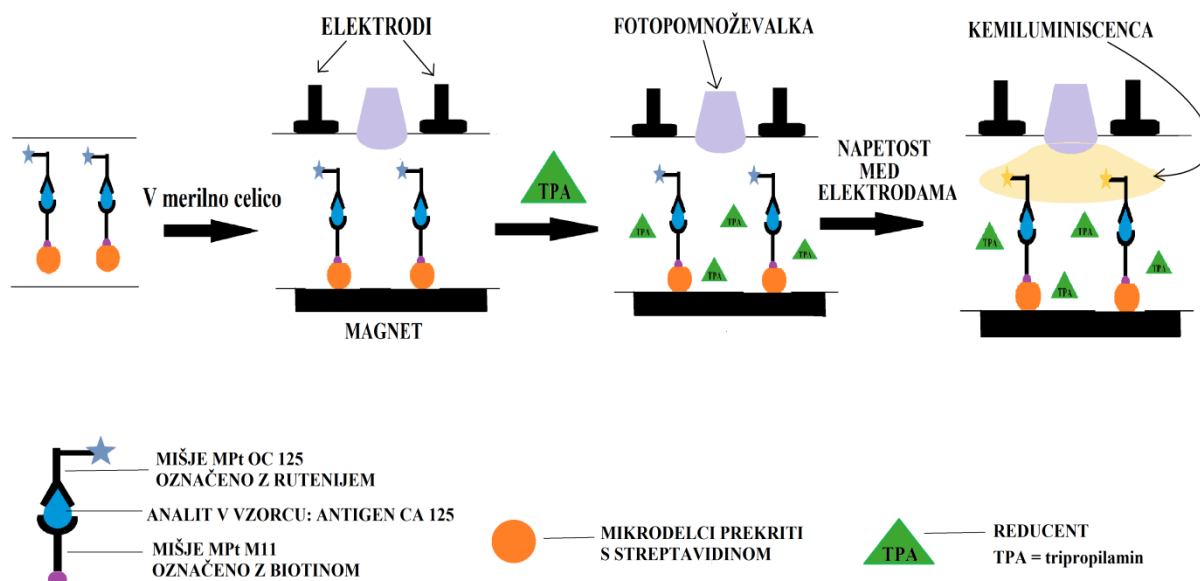
Kemiluminiscentne tehnike so ultraobčutljive z mejo zaznavnosti na nivoju atomola ali zeptomola, ter imajo široko dinamično območje. Zaradi teh lastnosti se v veliki meri uporabljajo v avtomatiziranih imunoteknikah. Kemiluminiscentna eksitacija nastane v kemični reakciji, pri kateri pride do oksidacije organske snovi, kot je luminol, izoluminol, akridinijev ester ali luciferin, v prisotnosti oksidanta kot je vodikov peroksid, hipoklorit ali kisik. Te reakcije potekajo v prisotnosti katalizatorjev kot so encimi ali kovinski kompleksi (14).

## **1.6. AVTOMATIZIRANE METODE MERJENJA TO CA 125 IN HE4**

V številnih občutljivih in specifičnih kliničnih testih se kot osnova uporabljajo imunokemične reakcije. V značilni imunokemični analizi se uporablja protitelesa (Pt) kot reagente za prepoznavo željenega antigena. Odlična molekulska specifičnost in visoka afiniteta vezave Pt na specifične antigene omogoča identifikacijo in kvantifikacijo specifičnih analitov z različnimi metodami. Imunokemijske tehnike so lahko kvalitativne ali kvantitativne, ter temeljijo na ocenitvi nastanka končnega imunskega kompleksa, ki ga tvorita Pt in antigen. Da so imunokemijske tehnike dobro analizno občutljive in analizno specifične, uporabljajo različno označena protitelesa in antigene. Te tehnike med seboj ločimo tudi na kompetitivne in nekompetitivne, ter homogene in nehomogene tehnike (17). V nadaljevanju sta opisana najpogostejše uporabljena principa za avtomatizirano določanje TO CA 125 in HE4.

### **1.6.1. HETEROGENA NEKOMPETITIVNA ELEKTROKEMILUMINISCENTNA IMUNOKEMIJSKA TEHNIKA**

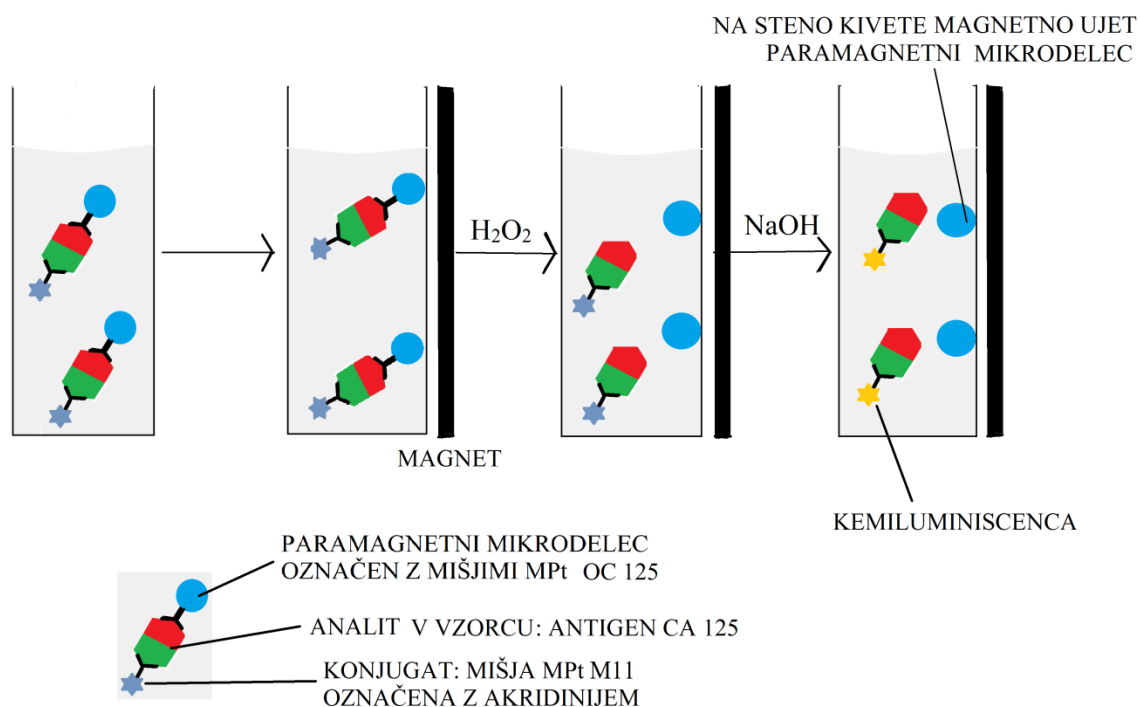
Princip metode je heterogena nekompetitivna elektrokemiluminiscentna imunokemijska tehnika (ECLIA). Temelji na tvorbi kompleksa med antigenom CA 125 iz vzorca, MPt OC 125 označenim z rutenijevim kompleksom, biotiniliranim MPt M11 in med mikrodelci označenimi s streptavidinom. Reakcijsko zmes se po inkubaciji aspirira v merilno celico, kjer se mikrodelci magnetno ujamejo na površino elektrode, nevezane sestavine pa se sperejo. Nato se doda reducent tripropilamin. Napetost, ki se ustvari med elektrodama, inducira kemiluminiscenco, ki jo izmeri fotopomnoževalka. Rezultati so nato določeni s pomočjo umeritvene krivulje v enotah kU/L (19). Princip je prikazan na sliki 3.



*Slika 3: Princip heterogene nekompetitivne elektrokemiluminiscentne imunotehnike (ECLIA)*

### 1.6.2. NEKOMPETITIVNA KEMILUMINISCENTNA IMUNOTEHNIKA Z MIKRODELCI

Nekompetitivna kemiluminiscentna imunotehnika z mikrodenci (CMIA) temelji na dodatku antigena CA 125 iz vzorca, paramagnetnih mikrodencov pokritih s specifičnimi mišjimi MPt OC 125, ter konjugata označenega z akridinijem in s specifičnimi mišjimi MPt M11. V prisotnosti oksidanta (NaOH) pride do oksidacije akridinija, ki po aktivaciji oddaja kemiluminiscenčno svetlobo. Princip je prikazan na sliki 4. Kemiluminiscenco se nato pretvori s pomočjo kalibracijske krivulje v koncentracijo (kU/L). Enak princip z ustreznimi specifičnimi protitelesi se uporablja tudi za določanje TO HE4, pri čemer se rezultat izraža v pmol/L (20).



**Slika 4:** Princip nekompetitivne kemiluminiscentne imunotehnike z mikrodenci (CMIA).

## 1.7. ALGORITEM ZA UGOTAVLJANJE TVEGANJA OVARIJSKEGA RAKA

Algoritem za ugotavljanje tveganja ovarijskega raka (ROMA) se uporablja za pomoč pri ocenjevanju tveganja za maligni epiteljski rak jajčnikov pri bolnicah s še neprepoznanimi masami v medeničnem predelu, katerim bodo opravili diagnostični operativni poseg. Laparoskopska diagnostična operacija je ključni poseg za potrditev raka jajčnikov, saj omogoča natančen pregled jajčnikov in drugih organov v abdominalni votlini ter citološko in histološko opredelitev raka.

Enačbo ROMA so oblikovali z namenom, da bi izboljšali uporabnost TO CA 125 v diagnostiki in spremljanju epiteljskega raka jajčnikov. Cilj v začetku raziskovanja je bil, da bi našli dober TO, ki bi skupaj s TO CA 125 izboljšal diagnostično občutljivost. S tem bi lahko pri večjem številu pacientk odkrili karcinom jajčnikov v začetni fazi in jim omogočili optimalno zdravljenje ob pravem času.

Moore in sodelavci so leta 2007 preverili številne tumorske označevalce in ugotovili, da ima kombinacija TO CA 125 in HE4, med različnimi TO najboljšo diagnostično občutljivost (24). Izvedli so opazovalno študijo, v katero so vključili 233 bolnic, 67 bolnic z invazivnim epiteljskim rakom jajčnikov in 166 bolnic z benignim tumorji jajčnikov. Analizirali so izbrane tumorske označevalce: CA 125, HE4, SMRP, CA 72-4, inhibin, aktivin, osteopontin, HER2 in EGFR, ki povečajo diagnostično občutljivost TO CA 125 pri visoki diagnostični specifičnosti. Izračun diagnostične občutljivosti so opravili pri vnaprej določenih diagnostičnih specifičnostih 90 %, 95 % in 98 %. Kot samostojen TO je imel CA 125 diagnostično občutljivost 43,3 % in TO HE4 72,9 % pri 95 % diagnostični specifičnosti. HE4 in SMRP (53,7 %) sta imela kot individualna TO najvišjo diagnostično občutljivost za detekcijo ovarijskega karcinoma pri 95 % diagnostični specifičnosti. Vsi ostali testirani samostojni TO so imeli diagnostično občutljivost nižje od TO CA 125. Ugotovili so, da le TO HE4 v kombinaciji s TO CA 125 daje najboljšo diagnostično občutljivost, ki je 76,4 % pri 95 % diagnostični specifičnosti. Kombinacija TO CA 125 in HE4 je dodala 33,1 % k diagnostični občutljivosti samostojnega TO CA 125 in 3,5 % k diagnostični občutljivosti samostojnega TO HE4. Kombinacija treh ali več TO je doprinesla zelo malo k zvišanju diagnostične občutljivosti CA 125+HE4. Oziroma, vključevanje drugih TO v kombinacijo TO CA 125+HE4 ni izboljšalo diagnostične občutljivosti za ovarijski karcinom. V nekaterih primerih se je diagnostična občutljivost celo zmanjšala. Ugotovili so tudi, da ima pri raku jajčnikov v I. stadiju TO HE4 najboljšo diagnostično občutljivost, še boljšo kot TO CA 125. V I. stadiju raka jajčnikov pri 95 % diagnostični specifičnosti sta imela TO CA 125+HE4 39,5 % diagnostično občutljivost, medtem ko je imel samostojen TO CA 125 15,1 %, ter samostojen TO HE4 45,9 % diagnostično občutljivost. Kombinacija TO HE4 s CA 125 ali s katerim koli drugim TO, ni izboljšala diagnostične občutljivosti v I. stadiju raka jajčnikov (24).

TO HE4 in CA 125 so, na osnovi dobljenih podatkov v dveh različnih študijah, združili v matematično enačbo ROMA, ki je odvisna od predmenopavznega in pomenopavznega statusa bolnice. Algoritem za predmenopavzne in pomenopavzne bolnice je bil ustvarjen s pomočjo logistične regresije. Izračunana vrednost ROMA je napovedna verjetnost za odkritje malignega epiteljskega raka jajčnikov med diagnostično operacijo (25).

### Izračun napovednega indeksa

Napovedni indeks (PI) se izračuna posebej za predmenopavzne in pomenopavzne bolnice:

1. Predmenopavzne bolnice:  $PI = -12,0 + 2,38 * LN(HE4) + 0,0626 * LN(CA125II)$
2. Pomenopavzne bolnice:  $PI = -8,09 + 1,04 * LN(HE4) + 0,732 * LN(CA125II)$

LN.....naravni logaritem

HE4.....koncentracija tumorskega označevalca HE4

CA 125II....koncentracija tumorskega označevalca CA 125

### Izračun vrednosti ROMA

Za izračun vrednosti ROMA je potrebno vnesti PI izračun v naslednjo enačbo:

$$vrednost\ ROMA\ (\%) = \frac{e^{PI}}{1 + e^{PI}} \times 100$$

PI.....napovedni indeks

V nadaljevalni študiji so določili prazni vrednosti ROMA, ki razvrstita bolnice glede na menopavzni status, med tiste z visokim in tiste z nizkim tveganjem za odkritje malignega epitelijskega raka jajčnikov. Prazni vrednosti ROMA sta določeni pri 75 % diagnostični specifičnosti, ter se razlikujeta glede na vrsto metode, ki je uporabljena za določitev TO HE4 in CA 125, EIA ali CMIA. Prazni vrednosti sta prilagojeni metodam določanja TO HE4 in CA 125 (25).

### Indeks malignega tveganja

Predhodnik enačbe ROMA je indeks malignega tveganja (RMI), ki se ga uporablja za ocenitev napovedi malignega epitelijskega raka jajčnikov pri ženskah s še neprepoznanimi medeničnimi masami. RMI je v praksi široko uporabljen algoritem. Razvili so ga Jacobs

in sodelavci že pred 20 leti. V izračunu se upoštevajo rezultati ultrazvočne preiskave, koncentracija TO CA 125 in menopavzni status, ki razvrsti bolnice v skupine z visokim ali nizkim tveganjem. Moore in sodelavci so v študiji primerjali vrednosti RMI in ROMA. Pri 75 % diagnostični specifičnosti je imela enačba RMI 84,6 %, ter enačba ROMA 94,3 % diagnostično občutljivost. Ugotovili so, da je enačba ROMA dosegla signifikantno višjo diagnostično občutljivost pri bolnicah v I. in II. stadiju invazivnega epitelijskega raka jajčnikov (27, 28).

## 2. NAMEN DELA

V laboratorijski diagnostiki malignega raka jajčnikov se predvsem uporablja TO CA 125, ki nastaja le pri 50 % bolnic v začetnem stadiju bolezni. Zvišane serumske koncentracije TO CA 125 pa se pojavljajo tudi pri drugih benignih ginekoloških in neginekoloških obolenjih. V zadnjem času se je zelo uveljavil novi serumski TO HE4, ki ima večjo klinično moč pri odkrivanju in spremljanju malignega epiteljskega raka jajčnikov, kot CA 125. Ugotovili so tudi, da sta tumorska označevalca HE4 in CA 125 v kombinaciji še bolj natančen napovedni dejavnik tveganja za pojav malignega obolenja na jajčnikih z diagnostično občutljivostjo 76,4 % pri 95 % specifičnosti. V ta namen sta Fujirebio Diagnostics in Abbott Laboratories pripravila avtomatizirano metodo merjenja TO HE4 v serumu, ter algoritem za izračun tveganja za ovarijski karcinom in prazne vrednosti.

Namen diplomskega dela je ugotoviti ujemanje rezultatov dveh različnih metod določanja TO CA 125. V laboratoriju imamo že uvedeno rutinsko metodo merjenja TO CA 125, ki jo izvajamo na analizatorju Modular Analytics E170, proizvajalca Roche Diagnostics. Nova metoda merjenja koncentracije TO CA 125 pa je uvedena na analizator Architect i1000 proizvajalca Abbott Laboratories. Zanima nas, če lahko za izračun vrednosti ROMA namesto TO CA 125, izmerjenega na Architectu i1000, uporabimo TO CA 125 izmerjen na Modularju Analytics E170.

Bolnicam, ki bodo imele naročeno preiskavo TO CA 125 v serumu, bomo le-to določili z metodo na Modularju Analytics E170 in bo za nas predstavljala primerjalno (referenčno) metodo. Tem serumskim vzorcem bomo določili še koncentracijo TO CA 125 in HE4 na Architectu i1000. Nato bomo z analizo specifičnostjo, analizo občutljivostjo in ponovljivostjo med serijami iz kontrol ugotovili sprejemljivost nove testne metode merjenja TO CA 125, glede na primerjalno metodo. Vrednosti TO CA 125, izmerjenih z dvema različnima metodama, bomo nato med seboj primerjali s korelacijo, regresijo in z Wilcoxonovim testom predznačenih rangov. Pričakujemo, da se dobljene koncentracije TO CA 125 med seboj ne bodo razlikovale. Zato izhajamo iz hipoteze, da lahko za izračun vrednosti ROMA uporabimo koncentracijo TO CA 125, izmerjenega s katerokoli od uporabljenih metod. Vrednosti ROMA bomo izračunali iz koncentracije TO HE4 in CA 125. V izračunu bomo prvič uporabili TO CA 125 izmerjen na Architectu i1000, ter drugič TO CA 125 izmerjen na Modularju Analytics E170. Nato bomo dobljene vrednosti ROMA med seboj primerjali s korelacijo, regresijo, srednjimi vrednostmi in merami variabilnosti.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. ZBIRANJE VZORCEV

V raziskavo smo vključili 226 serumskih vzorcev bolnic, ki so se zdravile na Onkološkem Inštitutu Ljubljana in so imele v obdobju od decembra 2010 do marca 2011 naročeno preiskavo TO CA 125. Vzorce smo izbirali glede na starost bolnic ter glede na rezultate analiz TO CA 125, ki so bile določene z rutinsko metodo na analizatorju Modular Analytics E170, proizvajalca Roche. Bolnice so bile stare od 23 do 82 let, s povprečno starostjo 56,9 let. Menopavza nastopi med 48. in 55. letom starosti (25). Zato smo bolnice stare 55 let in več uvrstili v pomenopavzno skupino (povprečna starost 66,6 let), ter bolnice mlajše od 55 let v predmenopavzno skupino (povprečna starost 46,4 let). Glede na prazno vrednost TO CA 125, ki je 35 kU/L, smo vzorce razdelili še v pozitivno in negativno predmenopavzno skupino, ter v pozitivno in negativno pomenopavzno skupino. Ustvarili smo enako velike skupine, ki so prikazane v preglednici I.

**Preglednica I:** Prikaz predmenopavznih in pomenopavznih skupin ter pozitivnih in negativnih skupin.

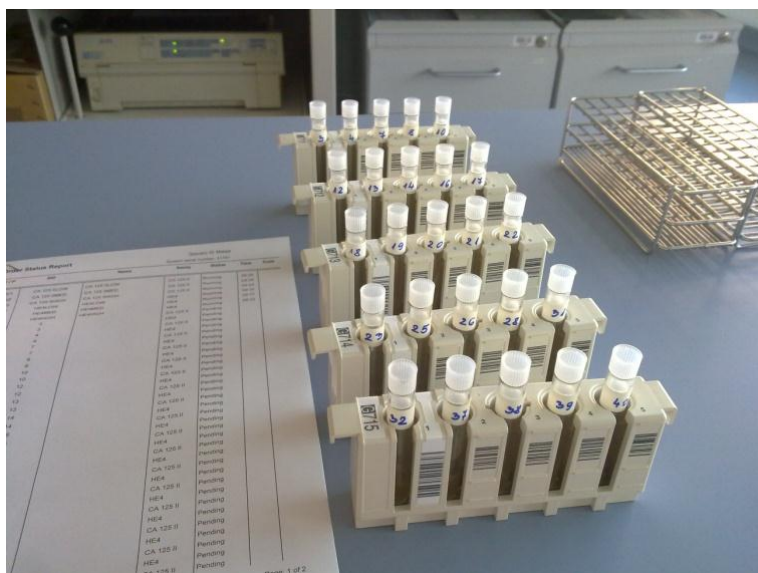
| TO CA 125<br>Modular Analytics E170 | POZITIVNE<br>> 35 kU/L | NEGATIVNE<br>≤ 35 kU/L | SKUPAJ |
|-------------------------------------|------------------------|------------------------|--------|
| Predmenopavzne<br>bolnice < 55 let  | 54                     | 54                     | 108    |
| Pomenopavzne<br>bolnice ≥ 55 let    | 59                     | 59                     | 118    |
| SKUPAJ                              | 113                    | 113                    | 226    |

Kri je bila odvzeta v serumske epruvete z gelom, katere smo po koagulaciji centrifugirali 10 minut na  $2800 \times g$  pri sobni temperaturi in pridobili serum. Po opravljenih naročenih rutinskih analizah smo oddelili serum na dva enaka alikvota v pripravljene epruvete in jih zatesnili z zamaškom. Vzorce smo shranili v zamrzovalnik pri temperaturi  $-26^{\circ}\text{C}$ .

## 3.2. ANALIZA VZORCEV

### 3.2.1. PRIPRAVA VZORCEV

Vzorci seruma smo obravnavali kot potencialno kužen material, zato smo pri delu uporabljali osebna zaščitna sredstva. Pred analizo smo vzorce odmrznili na sobni temperaturi, ter jih pri nizki hitrosti premešali z vrtničnim mešalom. Motno lipemične serumske vzorce smo centrifugirali 10 minut na  $2800 \times g$  pri sobni temperaturi in odstranili maščobe. Vzorce smo pregledali in jim odstranili mehurčke. Pripravljene vzorce smo vstavili v stojala (Slika 5), ter naročili preiskave CA 125 in HE4 v program analizatorja Architect i1000 proizvajalca Abbott Laboratories.



*Slika 5: Prikaz pripravljenih vzorcev v stojalih pred analizo.*

### 3.2.2. POSTOPEK MERJENJA TO CA 125 V SERUMU

Meritev TO CA 125 v serumu smo izvedli na analizatorju Architect i1000 proizvajalca Abbott Laboratories (Slika 6 in 7). Koncentracijo TO CA 125 smo določili s kemiluminiscentno imunotekniko z mikrodenci (CMIA) za kvantitativno določanje antigena CA 125 v humanem serumu.



**Slika 6:** Analizator Architect i1000SR na katerem smo izvedli meritve tumorskih označevalcev CA 125 in HE4.

Merilno območje TO CA 125 je od 1,0 do 1000 kU/L. Vrednosti, večje od 1000 kU/L smo redčili 1:10 z avtomatskim redčenjem na analizatorju.

Pred izvedbo meritev koncentracij TO smo izvedli vzdrževanje analizatorja ter naredili umerjanje in kontrole.

Ko smo naložili serumske vzorce v analizator, je Architect i1000 izvedel analizo po naslednjem postopku:

1. Prenos vzorcev z robotsko roko do aspiracijskega mesta in namestitvev kivete v procesno pot.
2. Aspiracija in prenos serumskega vzorca v kiveto, ter premik kivete na naslednjo stopnjo v procesni poti.
3. Aspiracija paramagnetnih mikrodcelcev prekritih z mišjimi MPt OC 125 in prenos v kiveto. Antigen CA 125 iz vzorca in paramagnetni mikrodcelci označeni z mišjimi MPt OC 125 se vežejo v kompleks na trdno fazo. Sledi mešanje, inkubiranje in spiranje reakcijske zmesi.
4. Dodatek konjugata označenega z akridinijem in mišjimi MPt M11. Ponovno sledi mešanje, inkubiranje in spiranje reakcijske zmesi.

5. Dodatek pedsprožilne raztopine vodikovega peroksida in sprožilne raztopine natrijevega hidroksida v reakcijsko zmes. Slednji povzroči oksidacijo akridinija in kemiluminiscenco.
6. Meritev kemiluminiscenčne emisije in pretvorba le te v koncentracijo (kU/L) s pomočjo kalibracijske krivulje.
7. Vsebinsko v kiveti se zavrže v tekoči odpadki, ter kiveto v trden odpadki.

Čas meritve TO CA 125 na posameznem vzorcu je bil 28 minut. Po končani analizi so se rezultati izpisali na zaslonu računalnika na strani rezultati.

Snovi, ki motijo določitev koncentracije so:

- bilirubin ( $\geq 0,2$  g/L),
- hemoglobin ( $\geq 5$  g/L),
- celokupni proteini ( $\geq 120$  g/L),
- trigliceridi ( $\geq 30$  g/L) in
- nekatere terapevtske snovi v zdravilih.

Hookov efekt visoke doze se pojavi pri koncentracijah TO CA 125 nad 180.000 kU/L. Pri Hookovem efektu pride, zaradi zelo visoke koncentracije analita, do simultane reakcije antigena z ujetim Pt in označenim Pt. To lahko znatno zmanjša število nastalih končnih imunskih kompleksov in posledično lažno znižan rezultat. Rešitev je redčenje vzorca pri koncentracijah, višjih od določene vrednosti in zagotovitev zadostno visoke koncentracije protiteles (17).

### 3.2.3. POSTOPEK MERJENJA TO HE4 V SERUMU

Meritev TO HE4 v serumu smo izvedli na analizatorju Architect i1000 proizvajalca Abbott Laboratories (Slika 6 in 7). Koncentracijo TO HE4 smo določili s kemiluminiscentno imunotekniko z mikrodelci (CMIA) za kvantitativno določanje antigena HE4 v humanem serumu.

Pražna vrednost TO HE4 je 70 pmol/L in merilno območje od 1,4 do 1500 pmol/L. Vrednosti, večje od 1500 pmol/L smo redčili 1:10 z avtomatskim redčenjem na analizatorju.

Pred izvedbo meritev koncentracij TO smo izvedli vzdrževanje analizatorja ter naredili umerjanje in kontrole.

Ko smo naložili serumske vzorce v analizator Architect i1000, je program izvedel analizo tumorskega označevalca HE4 po naslednjem postopku:

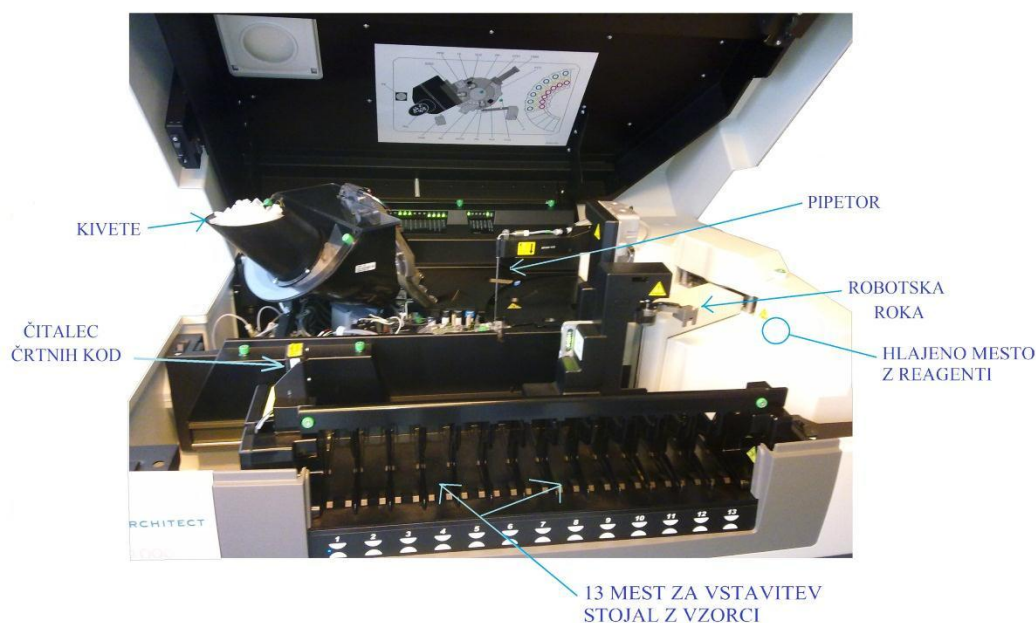
1. Prenos vzorcev z robotsko roko do aspiracijskega mesta in namestitvev kivete v procesno pot.
2. Aspiracija in prenos serumskega vzorca v kiveto, ter premik kivete na naslednjo stopnjo v procesni poti.
3. Aspiracija paramagnetnih mikrodlecev prekritih z mišjimi MPt 2H5 in prenos v kiveto. Antigen HE4 iz vzorca in paramagnetni mikrodleci označeni z 2H5 mišjimi MPt HE4 tvorijo kompleks. Sledi mešanje, inkubiranje in spiranje reakcijske zmesi.
4. Dodatek konjugata označenega z akridinijem in mišjimi MPt 3D8. Ponovno sledi mešanje, inkubiranje in spiranje reakcijske zmesi.
5. Dodatek pedsprožilne raztopine vodikovega peroksida in sprožilne raztopine natrijevega hidroksida v reakcijsko zmes, ki povzroči oksidacijo akridinija. Produkt reakcije je kemiluminiscenca.
6. Meritev kemiluminiscenčne emisije in pretvorba le te v koncentracijo (pmol/L) s pomočjo kalibracijske krivulje.
7. Vsebinsko v kiveti se zavrže v tekoči odpadki, ter kiveto v trden odpadki.

Čas meritve TO HE4 na posameznem vzorcu je bil 28 minut. Po končani analizi so se rezultati izpisali na zaslonu računalnika na strani rezultati.

Snovi, ki motijo določitev koncentracije so:

- bilirubin ( $\geq 0,2$  g/L),
- hemoglobin ( $\geq 5$  g/L),
- proteini ( $\geq 120$  g/L),
- trigliceridi ( $\geq 30$  g/L) in
- nekatere terapevtske snovi v zdravilih.

Hookov efekt visoke doze se pojavi pri koncentracijah TO HE4 nad 94.000 pmol/L.



*Slika 7: Prikaz notranjosti analizatorja Architect i1000.*

### 3.2.4. KALIBRATORJI IN KONTROLE

Za umerjanje TO CA 125 smo imeli 6 kalibratorjev A, B, C, D, E in F. Kalibrator A je vseboval TRIS pufer z govejim beljakovinskim stabilizatorjem in antimikrobnim prezervativom. Kalibratorji B-F so vsebovali humani antigen OC 125 v TRIS pufru z govejim beljakovinskim stabilizatorjem in antimikrobnim prezervativom. Kontrolni material CA 125 je prav tako vseboval humani antigen CA 125 v TRIS pufru z govejim beljakovinskim stabilizatorjem in antimikrobnim prezervativom v nizki, normalni in visoki koncentraciji.

Za umerjanje HE4 smo, kot pri umerjanju CA 125, imeli 6 kalibratorjev, ki so vsebovali humani antigen HE4 v PBS pufru z govejim beljakovinskim stabilizatorjem in prezervativom ProClin 300. Kontrolni material HE4 je vseboval nizko, normalno in visoko kontrolo s humanim antigenom HE4 v PBS pufru z govejim beljakovinskim stabilizatorjem in prezervativom ProClin 300.

Vsi kalibratorji in kontrole so pripravljeni za takojšnjo uporabo. Shranjevali smo jih v hladilniku na temperaturi 2 - 8 °C. Pred uporabo smo jih rahlo premešali z obračanjem.

### 3.2.5. REAGENTI ZA DOLOČANJE TO CA 125

Reagentni komplet obsega 100 testov in vsebuje:

- MIKRODELICI: 6,6 mL steklenička; mikrodelci prekriti z monoklonskimi (mišjimi) CA 125 protitelesi (OC 125) v TRIS pufru z govejim beljakovinskim stabilizatorjem; antimikrobni prezervativ
- KONJUGAT: 5,9 ml steklenička; konjugat, označen z akridinijem in monoklonskimi (mišjimi) CA 125 protitelesi (M11) v fosfatnem pufru z govejim beljakovinskim stabilizatorjem; antimikrobni prezervativ

### 3.2.6. REAGENTI ZA DOLOČANJE TO HE 4

Reagentni komplet obsega 100 testov in vsebuje:

- MIKRODELCI: 6,6 mL steklenička; mikrodelci prekriti z monoklonskimi (mišjimi) HE4 protitelesi (2H5) v PBS pufru z govejim beljakovinskim stabilizatorjem in detergentom; prezervativ ProClin 300
- KONJUGAT: 5,9 ml steklenička; konjugat, označen z akridinijem in monoklonskimi (mišjimi) HE 4 protitelesi (3D8) v PBS pufru z govejim beljakovinskim stabilizatorjem in detergentom; prezervativ ProClin 300

Oba reagentna kompleta sta bila do uporabe shranjena v hladilniku na temperaturi 2-8 °C v pokončnem položaju. Kompleta reagentov sta prikazan na sliki 8.



**Slika 8:** Reagentna kompleta Architect CA 125 II in HE4.

### 3.2.7. OSTALI REAGENTI IN POTROŠNI MATERIAL

- Ročno pripravljeno razredčilo, ki vsebuje 100 mL fiziološke raztopine fosfatnega pufru z antimikrobnim konzervativom in 9,9 L destilirane vode.
- Predsprožilna raztopina: 1,32 %, vodikov peroksid.
- Sprožilna raztopina: 0,35 N, natrijev hidroksid.
- Pufer za spiranje, ki vsebuje fiziološko raztopino fosfatnega pufru z dodanim antimikrobnim konzervativom.
- 0,5 % raztopina natrijevega hipoklorita.
- Raztopina za pipetorsko sondo, ki vsebuje humano plazmo nereaktivno na HBsAg, HIV RNA ali HIV-1 Ag, anti-HCV, anti-HIV-1/HIV-2 in anti-HBs, ter antimikrobni konzervativ Proclin 300.
- Gumijasti in plastični zamaški.
- Epruvete in kivete.

### 3.3. OPREMA

- Analizator Architect i1000, Abbott Laboratories, Abbott Park, Združene države Amerike.
- Vrtinčnik REAX 2000, Heidolph Instruments, Nemčija.
- Centrifuga ROTINA 38R, Hettich Zentrifugen, Nemčija.
- Programska oprema: statistični program SPSS Statistics 17.0 in program Microsoft Office Excel 2007.
- Pipete.

### 3.4. IZRAČUN VREDNOSTI ROMA

Naslednje prazne vrednosti ROMA veljajo pri uporabi metod ARCHITECT HE4 in ARCHITECT CA 125 II. Proizvajalec je za preiskus izračuna vrednosti ROMA v enačbah uporabil koncentracije TO HE4 od 17,2 do 12.637,8 pmol/L ter koncentracije TO CA 125 od 3,9 do 14.163,0 kU/L (15). Za izračun vrednosti ROMA smo uporabili enačbe, ki so navedene na strani 14.

## **Pražne vrednosti ROMA**

Razvrstitev bolnic v skupine z nizkim in visokim tveganjem za odkritje malignega epiteljskega raka jajčnikov:

1. Predmenopavzne bolnice:

vrednost ROMA (%)  $\geq 7,4\%$  = visoko tveganje

vrednost ROMA (%)  $< 7,4\%$  = nizko tveganje

2. Pomenopavzne bolnice:

vrednost ROMA (%)  $\geq 25,3\%$  = visoko tveganje

vrednost ROMA (%)  $< 25,3\%$  = nizko tveganje

Diagnostična občutljivost pražne vrednosti ROMA je pri 75 % diagnostični specifičnosti, pri razvrščanju predmenopavznih in pomenopavznih bolnicah z epiteljskim rakom jajčnikov (I-IV stadij), 93 % (15).

Enačba ROMA ni validirana za bolnice, ki so jih predhodno že obravnavali zaradi malignega obolenja, za bolnice, ki se zdravijo s kemoterapijo, ali pa so mlajše od 18 let, saj bi lahko prišlo do napačne ocenitve tveganja za ovarijski rak in nepravilne obravnave pacientke. Bolnice, ki so tekom diagnostike ali terapije prejele mišja monoklonska protitelesa, bodo proti njim razvile anti-mišja protitelesa (HAMA). HAMA v vzorcu seruma bi vstopali v reakcijo določitve HE4 in CA 125, kar bi vodilo do nepravilnih in nezanesljivih rezultatov (7, 15, 16).

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

V statistično obdelavo smo vključili rezultate vseh 226 serumskih vzorcev. Dobljene koncentracije TO CA 125 in HE4 ter izračuni vrednosti ROMA za predmenopavzno in pomenopavzno skupino bolnic so prikazani v preglednici VI in VII, v prilogi.

### 4.1. Sprejemljivost nove metode merjenja TO CA 125

Pri obdelavi dobljenih podatkov smo najprej primerjali novo Abbottovo metodo določanja TO CA 125 z našo rutinsko Rochevo metodo določanja TO CA 125 (preglednica II). Obe metodi sta avtomatizirani nekompetitivni imunokemijski tehniki. Prednost avtomatiziranih metod je v znatnem zmanjšanju variabilnosti rezultatov in analiznih napak, povzročenih s strani laboratorijskega osebja. Z avtomatizacijo se je tudi zelo izboljšala ponovljivost rezultatov, ki je privedla do bistvenega napredka v kakovosti laboratorijskih testov (29).

Pri obeh metodah velja prazna vrednost 35 kU/L. V obeh metodah uporabljamo visoko specifična mišja monoklonska protitelesa OC 125 in M11, ki pa so različno označena. Metodi se razlikujeta tudi v načinu nastanka kemiluminiscenčne svetlobe. Pri rutinski metodi povzroči kemiluminiscenco rutenija inducirana napetost med elektrodama, pri novi metodi pa pride do oksidacije akridinija, ki nato oddaja svetlobo.

**Preglednica II:** Primerjava rutinske in nove metode merjenja tumorskega označevalca CA 125.

|                                                           | <b>Analizna specifičnost</b>                                                                                                                           | <b>Analizna občutljivost</b>                                                            |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Modular CA 125<br/>primerjalna<br/>rutinska metoda</b> | Uporaba mišjih MPt M11<br>označenih z biotinom in OC 125<br>Pt označenih z rutenijev<br>kompleksom, ki jih proizvaja<br>Fujirebio Diagnostics.         | Pražna vrednost je 35 kU/L.<br>Meja kvantitativne določljivosti<br>je $\leq 0,60$ kU/L. |
| <b>Architect CA 125<br/>nova metoda</b>                   | Uporaba mišjih MPt M11<br>označenih z akridinijem in OC<br>125 Pt označenih s<br>paramagnetnimi mikrodelci, ki jih<br>proizvaja Fujirebio Diagnostics. | Pražna vrednost je 35 kU/L.<br>Meja kvantitativne določljivosti<br>je $\leq 1,00$ kU/L. |

Z osmimi vrednostmi Abbottovega kontrolnega materiala z nizko, normalno in visoko koncentracijo TO CA 125 smo izračunali koeficiente variacije (KV). KV(nizka kontrola) = 4,1 %, KV(normalna kontrola) = 1,2 % in KV(visoka kontrola) = 3 %. Povprečna vrednost KV je 2,8 %, kar nakazuje na dobro ponovljivost med serijami, saj mora biti KV < 10 %. Preglednica IX z dobljenimi vrednostmi kontrolnega materiala je v prilogi.

Meritve TO CA 125 so bile izvedene na dveh različnih, spretno zasnovanih avtomatiziranih analizatorjih in z zanesljivima imunokemijskima analizna metodama. Kljub nekaterim razlikam (način označenosti protiteles z organskimi snovmi, ki v reakciji oddajajo kemiluminiscenco ter način nastanka kemiluminiscentne svetlobe) sta obe metodi zanesljivi in dobro primerljivi.

## 4.2. Primerjava rezultatov dveh avtomatiziranih metod merjenja TO CA 125

Primerjali smo rezultate, ki smo jih dobili z rutinsko in novo avtomatizirano metodo merjenja TO CA 125. Ugotovili smo, da se dobljene opisne vrednosti med seboj zadovoljivo ujemajo.

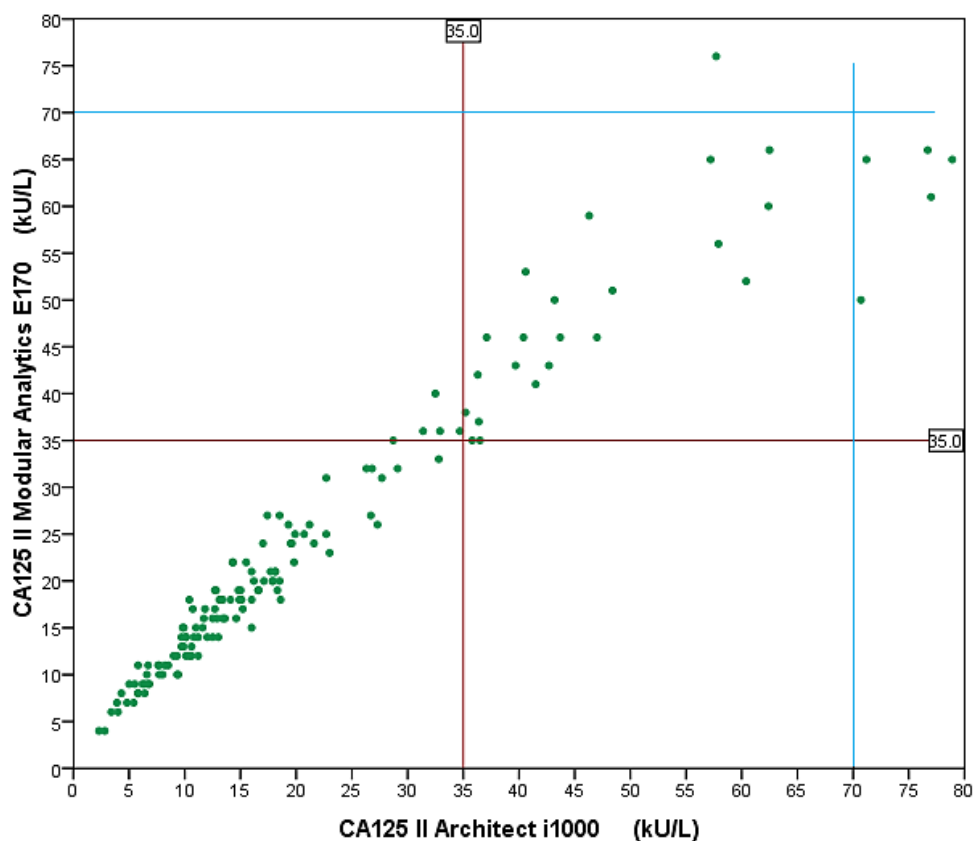
Rezultati na analizatorju Modular Analytics E170 so bili v območju od 4 do 1678 kU/L, rezultati na analizatorju Architect i1000 pa so se gibali od 2,3 do 1872,1 kU/L. Več podatkov je podanih v preglednici III.

**Preglednica III:** Opisne mere za vrednosti obeh avtomatiziranih metod merjenja tumorskega označevalca CA 125.

| Metoda   | Najnižja vrednost | Najvišja vrednost | Aritmetična sredina | Mediana | Standardna deviacija | Koeficient variacije |
|----------|-------------------|-------------------|---------------------|---------|----------------------|----------------------|
| rutinska | 4                 | 1678              | 174,7               | 35,5    | 302,3                | 173,0 %              |
| nova     | 2,3               | 1872,1            | 193,9               | 32,9    | 354,2                | 182,7 %              |

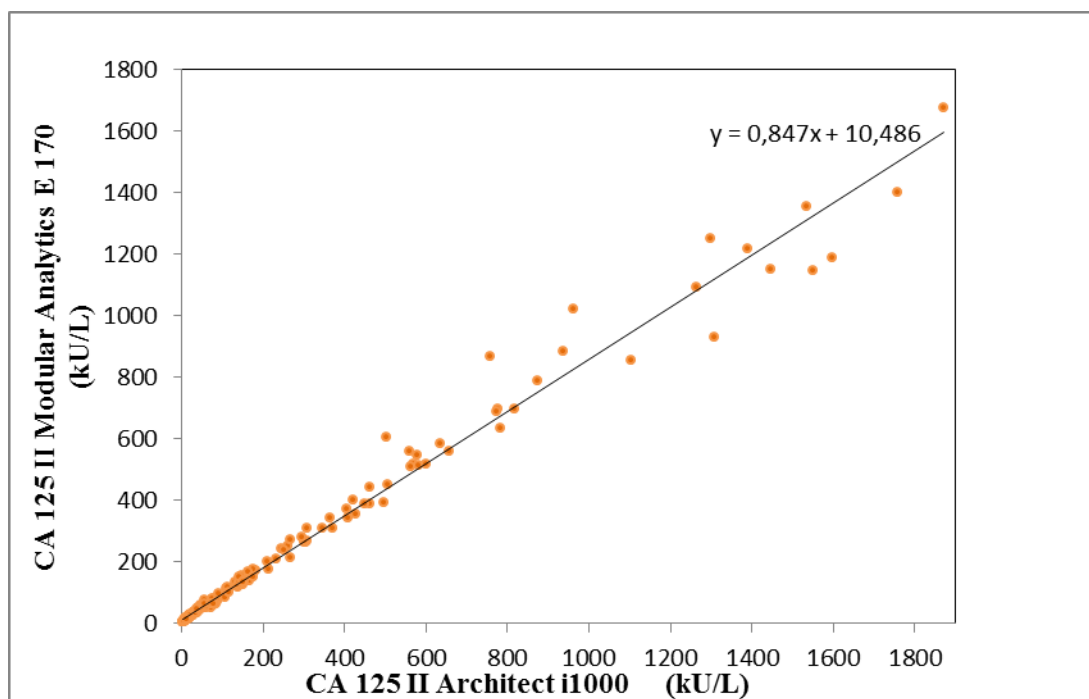
Glede na rutinsko metodo merjenja TO CA 125, se med obema metodama ujema 113 rezultatov od 113, ki so negativni, ter 110 rezultatov od 113, ki so pozitivni. Z novo

metodo smo torej le pri 3 vzorcih dobili rezultate pod prazno vrednostjo, ki pa so bili glede na rutinsko metodo malo zvišani. Na sliki 9 je prikazana razporeditev vrednosti TO CA 125 okrog prazne vrednosti. Oziroma prikazani so rezultati, ki so vsaj po eni metodi padli v območje, manjše od dveh praznih vrednosti (70 kU/L).



**Slika 9:** Prikaz razporeditve vrednosti tumorskega označevalca CA 125 okrog prazne vrednosti (35 kU/L).

Izračunali smo enačbo regresijske premice in korelacijski koeficient. Na sliki 10 je diagram regresijske premice z upoštevanjem 95 % meje zaupanja in 95 % napovedne vrednosti. Enačba regresijske premice je  $y = 0,8470 x + 10,4860$ . Korelacijski koeficient je 0,9925, ki kaže na to, da je statistična povezanost med vrednostmi dobra.



**Slika 10:** Prikaz odnosa med tumorskima označevalcema CA 125, izmerjenima z rutinsko in novo metodo.

Normalnost podatkov smo preverili s pomočjo Kolmogorov-Smirnovega in Shapiro-Wilkovega testa. Dobljena vrednost p je bila v obeh testih 0,000. Ker je dobljena vrednost manjša od 0,05 vemo, da podatki signifikantno odstopajo od normalne porazdelitve.

Nato smo z Wilcoxonovim neparametričnim testom predznačenih rangov izračunali vrednost p, ki znaša 0,408. Ker je dobljen rezultat večji od 0,05 lahko sklepamo, da razlika med vrednostmi ni statistično značilna. Oziroma, s 5 % tveganjem trdimo, da ni statistično značilne razlike in lahko v izračunu vrednosti ROMA uporabimo serumsko koncentracijo TO CA 125 izmerjenega po eni ali drugi metodi.

Wilcoxonov test predznačenih rangov je zelo uporaben test za ugotavljanje razlike med parnimi podatki. Uporabili smo ga zato, ker se naše dobljene vrednosti ne porazdeljujejo normalno. Za veliko skupino vrednosti je Wilcoxonov test predznačenih rangov skoraj tako občutljiv kot Studentova porazdelitev t. Zato lahko pri velikem številu vzorcev razlike v parih preskusimo s pomočjo normalne porazdelitve, saj se binomna porazdelitev že približuje normalni (21, 22, 23).

Iz vseh dobljenih podatkov sklenemo, da lahko potrdimo našo hipotezo. Vrednosti se med seboj statistično značilno ne razlikujejo, zato lahko v enačbi ROMA uporabimo tudi serumske koncentracije TO CA 125, izmerjene z rutinsko metodo na analizatorju Modular Analytcs E170, proizvajalca Roche Diagnostics.

#### **4.3. Primerjava pozitivnih vrednosti TO CA 125 in HE4**

Na Onkološkem inštitutu praviloma naročajo analizo TO CA 125 pri ginekoloških in pljučnih rakavih obolenjih. TO HE4 se pojavlja neodvisno od TO CA 125, zato smo izvedli primerjavo pozitivnih vrednosti TO CA 125 in HE4. Za pozitivne vrednosti TO HE4 smo smatrali vse dobljene koncentracije nad prazno vrednostjo 70 pmol/L, ter za pozitivne vrednosti TO CA 125 vse dobljene koncentracije nad 35 kU/L. Uporabili smo vrednosti TO CA 125 izmerjenega z rutinsko metodo. Dobljene koncentracije TO HE4 so se gibale v območju od 15,6 pmol/L do 11.899,9 pmol/L, s srednjo vrednostjo 246,6 pmol/L.

Iz osmih dobljenih vrednosti Abbottovega kontrolnega materiala z nizko, normalno in visoko koncentracijo TO HE4 smo izračunali koeficiente variacije (KV). KV(nizka kontrola) = 2 %, KV(normalna kontrola) = 3,3 % in KV(visoka kontrola) = 1,3 %. Povprečna vrednost KV je 2,2 %. Dobljene vrednosti koeficientov variacije kažejo na dobro ponovljivost med serijami, saj so pod vrednostjo 10 %. Preglednica VIII z dobljenimi vrednostmi kontrolnega materiala HE4 je v prilogi.

V preglednici IV je prikazano število pozitivnih rezultatov TO CA 125 in HE4 za pomenopavzno in predmenopavzno skupino bolnic. TO CA 125 je bil zvišan v 30 primerih, med tem ko je bil TO HE4 normalen. Pri normalnih vrednostih TO CA 125, pa je bil TO HE4 zvišan v 15 primerih. Neenotnost v zvišanih rezultatih se je pojavila v 45 primerih, kar je zelo veliko.

**Preglednica IV:** Število pozitivnih rezultatov tumorskih označevalcev CA 125 (rutinska metoda) in HE4 v predmenopavzni in pomenopavzni skupini bolnic.

| Pozitivne bolnice | Zvišan CA 125<br>(normalen HE 4) | Zvišan HE4<br>(normalen CA 125) | Zvišana oba<br>(CA 125 in HE4) |
|-------------------|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Predmenopavzne    | 16                               | 4                               | 38                             |
| Pomenopavzne      | 14                               | 11                              | 45                             |
| Skupaj            | 30                               | 15                              | 83                             |

TO HE4 in CA 125 sta med seboj različna, zato smo pričakovali, da se bodo nekatere parne vrednosti v vzorcih med seboj razlikovale. Veliko je malignih in benignih bolezni ter stanj, ki povzročajo zvišanje koncentracije TO CA 125 v krvi, kljub temu da TO HE4 ni zvišan. Za TO HE4 so tudi dokazali, da je dober pokazatelj ponovitve raka na jajčnikih, saj se koncentracija zviša od 5 do 8 mesecev pred TO CA 125 (18). Zato lahko iz tega sklepamo, da so zvišane vrednosti TO HE4 pri normalnih vrednostih TO CA 125 diagnostično pomembne.

#### 4.4. Primerjava izračunanih vrednosti ROMA

Za vsak vzorec smo izračunali dve vrednosti ROMA. Glede na menopavzni status smo uporabili ustrezno enačbo ROMA. V enačbi smo prvič uporabili dobljene vrednosti TO CA 125 in HE4, ki smo jih izmerili na analizatorju Architect i1000 (ROMA 1). Drugič pa dobljene vrednosti TO HE4, izmerjene na analizatorju Architect i1000 in vrednosti TO CA 125 izmerjene na analizatorju Modular Analytics E170 (ROMA 2). Pražne vrednosti ROMA se razlikujejo glede na menopavzni status bolnice in nakazujejo na visoko ali nizko tveganje za odkritje malignega epiteljskega raka jajčnikov. Pražna vrednost za predmenopavzne bolnice je 7,4 % in za pomenopavzne bolnice 25,3 %.

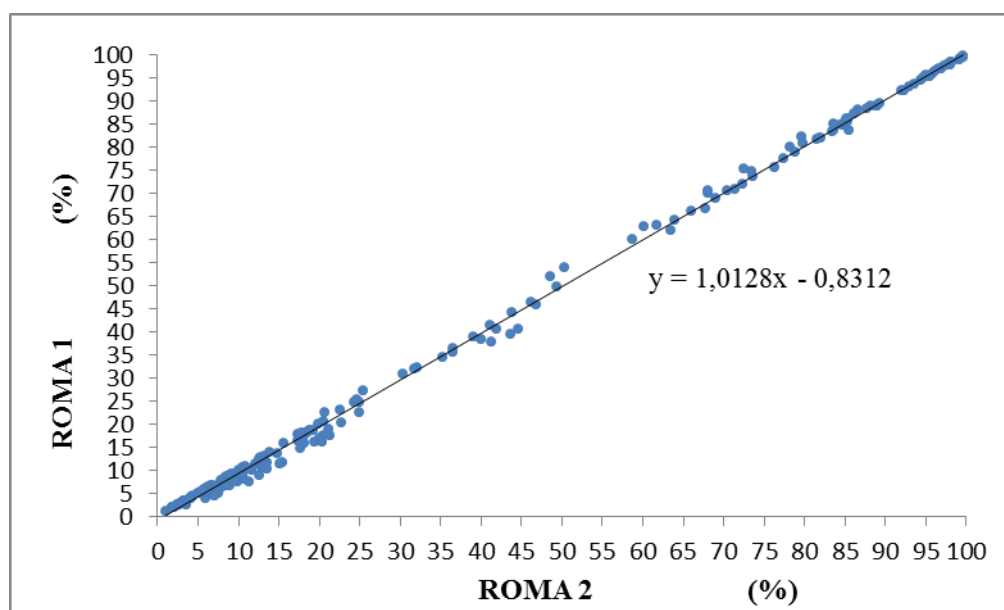
Izračunane vrednosti ROMA 1 so se gibale v območju od 1,1 % do 99,8 %, ter vrednosti ROMA 2 od 1,1 % do 99,7 %. Več izračunanih podatkov je prikazanih v preglednici V. S primerjavo opisnih srednjih vrednosti in opisnih mer variabilnosti smo ugotovili, da so dobljene vrednosti ROMA 1 in ROMA 2 zelo dobro primerljive.

**Preglednica V:** Opisne mere za vrednosti ROMA 1 in ROMA 2.

| ROMA   | Najnižja vrednost | Najvišja vrednost | Aritmetična sredina | Mediana | Standardna deviacija | Koeficient variacije |
|--------|-------------------|-------------------|---------------------|---------|----------------------|----------------------|
| ROMA 1 | 1,1               | 99,8              | 34,9                | 16,2    | 35,2                 | 100,9 %              |
| ROMA 2 | 1,1               | 99,7              | 35,3                | 17,6    | 34,7                 | 98,3 %               |

Med seboj se ujemajo vse dobljene parne vrednosti ROMA, ki smo jih glede na prazno vrednost razvrstili med visoko ali nizko tveganje za odkritje malignega epiteljskega raka jajčnikov.

Z upoštevanjem 95 % meje zaupanja in 95 % napovedne vrednosti smo izračunali enačbo regresijske premice  $y = 1,0128x - 0,8312$ . Dobljena regresijska premica kaže na zelo dobro linearno povezavo. Sprememba na x osi je namreč zelo podobna spremembi na y osi, kar pomeni skoraj enako analizo občutljivost in enak odziv na spremembo koncentracije. Korelacijski koeficient je 0,999 in kaže na zelo dobro povezavo med izračunanimi vrednostmi ROMA 1 in ROMA 2. Na sliki 11 je prikazana razporeditev obeh vrednosti ROMA in regresijska premica.

**Slika 11:** Prikaz odnosa med vrednostmi ROMA 1 in ROMA 2 ter regresijska premica.

S primerjavo izračunanih vrednosti ROMA smo podkrepili našo trditev, da lahko za izračun vrednosti ROMA uporabimo TO CA 125 izmerjen z rutinsko ali z novo metodo.

#### **4.5. Zaključki**

Po že zaključenem našem eksperimentalnem delu v laboratorju je Roche Diagnostics uvedel svojo novo metodo določanja TO HE4 na analizatorju Elecsys, Cobas e (411, 601 in 602) in na enoti E170, ter izračun vrednosti ROMA pri 75 % specifičnosti. Rocheve prazne vrednosti ROMA, ki razvrstijo bolnice v visoko ali nizko tveganje za maligni epiteljski rak jajčnikov, so višje od Abbottovih. Prazna vrednost za predmenopavzne bolnice je 11,4 %, ter za pomenopavzne bolnice 29,9 %. Do danes imajo Fujirebiovo licenco za določanje TO HE4 in izračun vrednosti ROMA le Abbott Laboratories, Roche Diagnostics in Becton Dickinson.

## 5. SKLEP

- ❖ Ugotovili smo, da sta Rocheva in Abbottova avtomatizirana imunokemijska metoda določanja TO CA 125 zanesljivi in dobro primerljivi.
- ❖ Za TO CA 125, določen po eni in drugi metodi, so se izračunane opisne mere variabilnosti in srednje vrednosti med seboj zadovoljivo ujemale. Z uporabo Wlicoxonovega testa predznačenih rangov smo dokazali, da razlika med vrednostmi ni statistično značilna.
- ❖ S primerjavo pozitivnih rezultatov TO CA 125 in HE4 smo ugotovili, da se veliko vrednosti med seboj ne ujema. TO HE4 je bil zvišan v 15 primerih, TO CA 125 pa v 30 primerih, med tem ko je bil drugi označevalec normalen. Slednje smo pričakovali, saj se TO HE4 in CA 125 izražata neodvisno en od drugega. Zvišane koncentracije TO HE4, pri normalnem TO CA 125, lahko celo kažejo na ponovitev epiteljskega raka jajčnikov.
- ❖ Izračunane vrednosti ROMA 1 ROMA 2 so med seboj zelo dobro primerljive.

Z diplomsko nalogo smo potrdili našo hipotezo, da se vrednosti TO CA 125, izmerjene z rutinsko in novo metodo, med seboj ne razlikujejo. Dokazali smo, da ni statistično značilne razlike, zato lahko v izračunu vrednosti ROMA uporabimo koncentracije TO CA 125 izmerjene z Rochevo metodo na analizatorju Modular Analytics E170, ter upoštevamo Abbottove prazne vrednosti ROMA.

## VIRI IN LITERATURA

1. Vlaisavljević V, Pfeifer M. Jajčnik, Bolezni Endokrinih žlez. In: Interna medicina, Littera Picta, Ljubljana, 2005: 878-880, 886-887.
2. Cvetko E. Ženska spolovila. In: Anatomija, histologija in fiziologija. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Ljubljana, 2007: 163-164.
3. Štabuc B, Primic Žakelj M, Klemenčič M, Piškur J. Rak rodil, Seminar in memoriam dr. Dušana Reje. Zveza slovenskih društev za boj proti raku, Ljubljana, 2008: 41-48.
4. Uršič Vrščaj M, Snoj R, Cerar O. Prikaz bolnice z rakom jajčnikov s komentarji. Onkologija, Strokovni časopis za zdravnike 2001; 1: 29-34.
5. American cancer society. What are the key statistics about ovarian cancer? Dostopno na: <http://www.cancer.org/Cancer/OvarianCancer/DetailedGuide/index>, (3.1.2011).
6. Sturgeon C, Diamandis E. Laboratory medicine practice guidelines: Use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast and ovarian cancers. National Academy of Clinical Biochemistry, Washington, 2009: 51-59.
7. Allard WJ, Moore RG: HE4 and CA125 combined for the improved management ovarian cancer. Clinical laboratory international. Dostopno na: <http://www.clin-online.com/featured-articles/he4-and-ca125-combined-for-the-improved-management-ovarian-cancer/trackback/1/>, (30.11.2010).
8. Primic-Žakelj M, Bračko M, Hočevar M, Krajc M, Pompe-Kirn V, Strojan P, Zadnik V, Zakotnik B, Žagar T. Rak v Sloveniji 2007. Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije, Ljubljana, 2010: 30-31, 50, 56-57, 84-86.
9. Chan DW, Booth RA, Diamandis EP. Tumor markers. In: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Elsevier Saunders, St Louis, Missouri, 2006: 265, 278-279, 745-772.
10. Novaković S. Tumorski označevalci v klinični onkologiji. Onkološki inštitut, Ljubljana, 2000; 8-14.
11. Možina B. Laboratorijska diagnostika in klinični pomen tumorskih označevalcev. In: Seminar za tehnike laboratorijske medicine, zbornik predavanj. Slovensko združenje za klinično kemijo, Celje, Jesenice, Ljubljana, 2006.

12. Osredkar J. Izbrana poglavja iz klinične kemije. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za Farmacijo, Ljubljana, 2008: 92-97, 100-102.
13. Diamandis E, Fritsche H, Lilja H, Chan D, Schwartz M. Tumor markers: Physiology, pathobiology, technology and clinical applications. American Association for Clinical Chemistry, Inc, Washington, 2002: 9, 41-42, 239-249, 401-402.
14. Kricka LJ. Optical Techniques. In: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Elsevier Saunders, St Louis, Missouri, 2006: 85.
15. Priložena navodila za reagente. Architect system HE4, REF 2P54, 305-486 10/09, B2P540. Abbott Laboratories, oktober 2009.
16. Predstavitveni izročki. Architect HE4, HE4+CA125 Two Strong Pillars in the Management of Ovarian Cancer, HE4-Background, november 2009 ter Conference Call Architect HE4, januar 2010. Abbott Laboratories.
17. Kricka LJ. Principles of immunochemical techniques. In: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Elsevier Saunders, St Louis, Missouri, 2006: 219, 230-233, 237.
18. Anastasi E, Marchei GG, Viggiani V, et al. HE4: a new potential early biomarker for the recurrence of ovarian cancer. Tumour Biology, 2010; 31(2): 113-119.
19. Priložena navodila za reagente: Roche Cobas CA 125II. Roche 2007-2008, V 11.
20. Priložena navodila za reagente: Architect system CA 125II, REF 2K45, 016-623 4/09. Abbott Laboratories, maj 2009.
21. Adamič Š. Temelji biostatistike. Medicinska fakulteta Univerze Edvarda Kardelja v Ljubljani, Inštitut za biomedicinsko informatiko, Ljubljana, 1989: 53-55, 89-91.
22. Jones RG, Payne RB. Clinical Investigation and Statistics in Laboratory Medicine. ACB Venture Publications, London, 1997: 62.
23. The Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Ranks Test. IFA Services. Dostopno na: [http://www.fon.hum.uva.nl/Service/Statistics/Signed\\_Rank\\_Test.html](http://www.fon.hum.uva.nl/Service/Statistics/Signed_Rank_Test.html), (10.06.2011).
24. Moore RG, Brown AK, Miller MC, et al. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with pelvic mass. Gynecologic Oncology, 2008; 108(2): 402-408.

25. Moore RG, McMeekin DS, Brown AK, et al. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecologic Oncology*, 2009; 112(1): 40-46.
26. Fujirebio Diagnostics, Inc. Antibodies and Antigens CA 125. Dostopno na: [http://www.fdi.com/world\\_home/products/antibodies/ca125.html](http://www.fdi.com/world_home/products/antibodies/ca125.html), (12.6.2011).
27. Plebani M, Melichar B. ROMA or death: advances in epithelial ovarian cancer diagnosis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2011; 49(3): 443-445.
28. Montagnana M, Danese E, Ruzzenente O, et al. The ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm) for estimating the risk of epithelial ovarian cancer in women presenting with pelvic mass: is it really useful?. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2011; 49(3): 521-525.
29. Boyd JC, Hawker CD. Automation in the clinical laboratory. In: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. Elsevier Saunders, St Louis, Missouri, 2006: 265, 278-279.
30. Kirchhoff C, Habben I, Ivell R, et al. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. *Biol Reprod* 1991. 45(2): 350-357.
31. Schummer M, Ng WV, Bumgarner RE, Nelson PS, et al. Comparative hybridization of an array of 21,500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. *Gene* 1999. 238(2): 375-385.
32. Hellström I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer research* 2003; 63: 3695-3700.

## PRILOGA

**Preglednica VI:** Prikaz dobljenih koncentracij tumorskih označevalcev CA 125 in HE4 ter izračuna vrednosti ROMA1 in ROMA 2 za predmenopavzno skupino bolnic.

| ŠT. | CA 125 (35 kU/L) | CA 125 (35 kU/L)  | HE 4 (70 pmol/L)  | ROMA 1<br>(≥ 7,4%) | ROMA 2<br>(≥ 7,4%) |
|-----|------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
|     | Modular Roche    | Architect i1000SR | Architect i1000SR |                    |                    |
| 1   | 20               | 18,5              | 32,1              | 2,8                | 2,8                |
| 2   | 1023             | 961,2             | 254,3             | 83,4               | 83,4               |
| 3   | 15               | 11                | 42,6              | 5,1                | 5,2                |
| 4   | 21               | 18,1              | 54,9              | 9,2                | 9,3                |
| 5   | 342              | 407,1             | 692,9             | 98,1               | 98,1               |
| 6   | 15               | 16                | 46,5              | 6,4                | 6,3                |
| 7   | 115              | 111,2             | 29,7              | 2,6                | 2,6                |
| 8   | 25               | 20,7              | 31,1              | 2,6                | 2,6                |
| 9   | 61               | 77                | 259               | 81,7               | 81,5               |
| 10  | 4                | 2,3               | 81,2              | 18,5               | 19,0               |
| 11  | 22               | 15,5              | 59                | 10,7               | 10,9               |
| 12  | 11               | 8,2               | 38,7              | 4,0                | 4,1                |
| 13  | 19               | 18,3              | 65,1              | 13,2               | 13,3               |
| 14  | 18               | 13,4              | 76,9              | 18,2               | 18,5               |
| 15  | 14               | 10,1              | 64,1              | 12,4               | 12,6               |
| 16  | 32               | 26,8              | 27,2              | 1,9                | 1,9                |
| 17  | 19               | 16,6              | 46,4              | 6,3                | 6,4                |
| 18  | 33               | 32,8              | 44,8              | 6,1                | 6,1                |
| 19  | 1094             | 1265,8            | 310,5             | 89,1               | 89,0               |
| 20  | 35               | 35,8              | 46,1              | 6,5                | 6,5                |
| 21  | 869              | 757,9             | 245,5             | 81,9               | 82,1               |
| 22  | 31               | 27,7              | 46,5              | 6,6                | 6,6                |
| 23  | 8                | 6,4               | 31,6              | 2,5                | 2,5                |
| 24  | 84               | 88,2              | 100,6             | 32,2               | 32,1               |
| 25  | 118              | 136,8             | 1094,4            | 99,3               | 99,3               |
| 26  | 22               | 14,3              | 47,8              | 6,7                | 6,9                |
| 27  | 9                | 6,7               | 35,5              | 3,3                | 3,3                |
| 28  | 41               | 41,5              | 53,4              | 9,1                | 9,1                |
| 29  | 16               | 13,4              | 75                | 17,3               | 17,5               |
| 30  | 12               | 10,6              | 31,3              | 2,5                | 2,5                |
| 31  | 18               | 15                | 41,5              | 4,9                | 5,0                |
| 32  | 24               | 19,6              | 37,3              | 3,9                | 4,0                |
| 33  | 11               | 8,5               | 59,3              | 10,4               | 10,6               |
| 34  | 35               | 36,5              | 37,9              | 4,2                | 4,2                |
| 35  | 1149             | 1549,4            | 80                | 24,8               | 24,4               |
| 36  | 886              | 936,9             | 186,7             | 70,6               | 70,5               |
| 37  | 16               | 12,5              | 37,7              | 3,9                | 4,0                |

|    |      |        |        |      |      |
|----|------|--------|--------|------|------|
| 38 | 17   | 10,7   | 38,6   | 4,1  | 4,2  |
| 39 | 560  | 560,1  | 1041,4 | 99,3 | 99,3 |
| 40 | 213  | 268,4  | 133    | 49,7 | 49,4 |
| 41 | 112  | 114,8  | 422,7  | 93,6 | 93,6 |
| 42 | 36   | 31,4   | 32,1   | 2,9  | 2,9  |
| 43 | 20   | 17,9   | 42,7   | 5,3  | 5,3  |
| 44 | 140  | 139,6  | 55,5   | 10,6 | 10,6 |
| 45 | 9    | 6,2    | 30,3   | 2,3  | 2,3  |
| 46 | 22   | 19,8   | 27,8   | 2,0  | 2,0  |
| 47 | 270  | 309,4  | 70,4   | 18,0 | 17,9 |
| 48 | 9    | 6,4    | 53     | 8,1  | 8,2  |
| 49 | 21   | 18,1   | 76,8   | 18,4 | 18,6 |
| 50 | 75   | 87,5   | 124,6  | 44,1 | 43,9 |
| 51 | 12   | 10,1   | 44,3   | 5,6  | 5,6  |
| 52 | 14   | 11,2   | 47,6   | 6,6  | 6,7  |
| 53 | 10   | 9,3    | 31,4   | 2,5  | 2,5  |
| 54 | 6    | 3,4    | 38,8   | 3,9  | 4,0  |
| 55 | 8    | 5,8    | 27,9   | 1,9  | 1,9  |
| 56 | 153  | 140    | 107,4  | 36,3 | 36,5 |
| 57 | 20   | 17,9   | 57,1   | 10,0 | 10,1 |
| 58 | 1678 | 1872,1 | 253,5  | 83,8 | 83,7 |
| 59 | 84   | 105,2  | 258,8  | 82,0 | 81,8 |
| 60 | 50   | 70,7   | 72,5   | 17,7 | 17,4 |
| 61 | 374  | 405,3  | 124,3  | 46,4 | 46,2 |
| 62 | 355  | 426,5  | 230,3  | 79,0 | 78,8 |
| 63 | 100  | 116,6  | 55,7   | 10,6 | 10,5 |
| 64 | 1356 | 1535,3 | 482,3  | 95,9 | 95,9 |
| 65 | 46   | 47     | 77,9   | 19,9 | 19,9 |
| 66 | 1187 | 1598,1 | 381,1  | 93,1 | 93,0 |
| 67 | 53   | 40,6   | 56     | 10,1 | 10,2 |
| 68 | 50   | 43,2   | 87,8   | 24,7 | 24,9 |
| 69 | 262  | 303,5  | 1327,6 | 99,6 | 99,6 |
| 70 | 391  | 462,4  | 96,1   | 32,1 | 31,8 |
| 71 | 36   | 32,9   | 43,6   | 5,8  | 5,8  |
| 72 | 46   | 40,4   | 44,4   | 6,1  | 6,1  |
| 73 | 37   | 36,4   | 43,7   | 5,8  | 5,8  |
| 74 | 208  | 231,7  | 225,4  | 77,5 | 77,4 |
| 75 | 932  | 1308,1 | 363    | 92,3 | 92,1 |
| 76 | 239  | 250,7  | 177,5  | 66,2 | 66,1 |
| 77 | 17   | 11,8   | 34,9   | 3,3  | 3,3  |
| 78 | 4    | 2,8    | 40,2   | 4,1  | 4,2  |
| 79 | 13   | 9,7    | 35     | 3,2  | 3,3  |
| 80 | 402  | 422,3  | 184,9  | 69,0 | 69,0 |
| 81 | 26   | 21,2   | 27,8   | 2,0  | 2,0  |

|     |     |        |       |      |      |
|-----|-----|--------|-------|------|------|
| 82  | 10  | 6,6    | 31,5  | 2,5  | 2,5  |
| 83  | 56  | 57,9   | 38,1  | 4,4  | 4,4  |
| 84  | 73  | 87,9   | 61,5  | 12,8 | 12,7 |
| 85  | 342 | 364,5  | 75,1  | 20,6 | 20,5 |
| 86  | 387 | 450,8  | 69,7  | 18,0 | 17,9 |
| 87  | 133 | 149,9  | 117,1 | 41,3 | 41,1 |
| 88  | 854 | 1104,1 | 310,8 | 89,1 | 88,9 |
| 89  | 42  | 36,3   | 33,6  | 3,2  | 3,2  |
| 90  | 31  | 22,7   | 31,8  | 2,7  | 2,8  |
| 91  | 65  | 57,2   | 395,8 | 92,3 | 92,4 |
| 92  | 46  | 43,7   | 459,4 | 94,4 | 94,4 |
| 93  | 269 | 300,3  | 170,1 | 64,1 | 64,0 |
| 94  | 16  | 13,6   | 27,6  | 1,9  | 1,9  |
| 95  | 62  | 85,2   | 51,3  | 8,7  | 8,5  |
| 96  | 151 | 175,5  | 66,8  | 15,8 | 15,6 |
| 97  | 36  | 34,7   | 27,3  | 2,0  | 2,0  |
| 98  | 280 | 293,8  | 975,7 | 99,1 | 99,1 |
| 99  | 548 | 579,7  | 566,8 | 97,0 | 97,0 |
| 100 | 19  | 14,8   | 21,9  | 1,1  | 1,1  |
| 101 | 11  | 6,7    | 31,9  | 2,6  | 2,6  |
| 102 | 10  | 9,4    | 39    | 4,1  | 4,2  |
| 103 | 14  | 9,7    | 51,6  | 7,8  | 7,9  |
| 104 | 9   | 5,5    | 55,5  | 8,8  | 9,1  |
| 105 | 21  | 17,7   | 54    | 8,9  | 9,0  |
| 106 | 11  | 7,6    | 35,4  | 3,3  | 3,4  |
| 107 | 9   | 6,8    | 33,7  | 2,9  | 3,0  |
| 108 | 8   | 5,8    | 38,4  | 3,9  | 4,0  |

**Preglednica VII:** Prikaz dobljenih koncentracij tumorskih označevalcev CA 125 in HE4 ter izračuna vrednosti ROMA1 in ROMA 2 za pomenopavzno skupino bolnic.

| ŠT. | CA 125 (35 kU/L) | CA 125 (35 kU/L)  | HE 4 (70 pmol/L)  | ROMA 1<br>(≥ 25,3%) | ROMA 2<br>(≥ 25,3%) |
|-----|------------------|-------------------|-------------------|---------------------|---------------------|
|     | Modular Roche    | Architect i1000SR | Architect i1000SR |                     |                     |
| 1   | 21               | 16                | 76,7              | 17,6                | 20,6                |
| 2   | 520              | 599,3             | 100,4             | 80,0                | 78,3                |
| 3   | 138              | 164,8             | 452,7             | 88,1                | 86,7                |
| 4   | 308              | 309,4             | 221,3             | 84,9                | 84,8                |
| 5   | 251              | 261,2             | 265,4             | 85,7                | 85,3                |
| 6   | 18               | 18,6              | 95,9              | 23,1                | 22,6                |
| 7   | 14               | 12,5              | 56,1              | 11,4                | 12,2                |
| 8   | 10               | 8                 | 36,9              | 5,7                 | 6,6                 |

|    |      |        |         |      |      |
|----|------|--------|---------|------|------|
| 9  | 157  | 171,5  | 107,6   | 63,2 | 61,7 |
| 10 | 43   | 42,7   | 110,7   | 39,0 | 39,1 |
| 11 | 172  | 182    | 11899,9 | 99,6 | 99,6 |
| 12 | 1217 | 1390,5 | 405,7   | 96,9 | 96,6 |
| 13 | 519  | 568    | 662,9   | 96,5 | 96,2 |
| 14 | 698  | 818    | 1128,9  | 98,4 | 98,2 |
| 15 | 178  | 213,3  | 59,1    | 51,9 | 48,6 |
| 16 | 8    | 4,3    | 76,1    | 7,5  | 11,3 |
| 17 | 136  | 131,1  | 181,7   | 70,9 | 71,4 |
| 18 | 6    | 4      | 27,5    | 2,6  | 3,5  |
| 19 | 129  | 143,5  | 292,5   | 81,0 | 79,8 |
| 20 | 394  | 496    | 132,8   | 82,3 | 79,7 |
| 21 | 14   | 13     | 43,2    | 9,1  | 9,6  |
| 22 | 35   | 28,7   | 68,1    | 22,4 | 25,0 |
| 23 | 154  | 174,5  | 143,3   | 70,1 | 68,1 |
| 24 | 10   | 7,7    | 39      | 5,8  | 6,9  |
| 25 | 66   | 62,5   | 385,7   | 75,6 | 76,3 |
| 26 | 17   | 15,2   | 43,4    | 10,2 | 11,0 |
| 27 | 24   | 19,5   | 72,3    | 18,8 | 21,2 |
| 28 | 443  | 463,5  | 170,9   | 85,2 | 84,8 |
| 29 | 16   | 12,9   | 48,5    | 10,1 | 11,7 |
| 30 | 604  | 503,6  | 145,8   | 83,8 | 85,6 |
| 31 | 26   | 19,3   | 61,4    | 16,2 | 19,4 |
| 32 | 59   | 46,3   | 106,1   | 39,4 | 43,7 |
| 33 | 559  | 656,5  | 41,3    | 62,9 | 60,1 |
| 34 | 65   | 78,9   | 128,6   | 54,0 | 50,4 |
| 35 | 26   | 27,3   | 82,3    | 25,3 | 24,6 |
| 36 | 15   | 9,9    | 38      | 6,7  | 8,9  |
| 37 | 7    | 3,9    | 54,4    | 5,0  | 7,5  |
| 38 | 14   | 10,1   | 15,6    | 2,8  | 3,6  |
| 39 | 19   | 12,7   | 36      | 7,6  | 9,9  |
| 40 | 1152 | 1446,6 | 535     | 97,7 | 97,3 |
| 41 | 51   | 48,4   | 38      | 18,7 | 19,3 |
| 42 | 52   | 60,4   | 40,6    | 22,5 | 20,7 |
| 43 | 12   | 11,2   | 67,1    | 12,5 | 13,0 |
| 44 | 43   | 39,7   | 287,8   | 62,1 | 63,5 |
| 45 | 20   | 16,2   | 48,8    | 11,8 | 13,5 |
| 46 | 11   | 5,8    | 36,8    | 4,5  | 7,0  |
| 47 | 24   | 17     | 73,1    | 17,5 | 21,4 |
| 48 | 24   | 21,6   | 41,7    | 12,3 | 13,2 |
| 49 | 12   | 9      | 41,6    | 6,9  | 8,4  |
| 50 | 18   | 13,1   | 40,4    | 8,6  | 10,6 |
| 51 | 16   | 11,7   | 43,8    | 8,6  | 10,6 |
| 52 | 18   | 14,9   | 32,4    | 7,6  | 8,7  |

|    |      |        |        |      |      |
|----|------|--------|--------|------|------|
| 53 | 27   | 17,4   | 45,9   | 11,7 | 15,5 |
| 54 | 15   | 9,8    | 67,5   | 11,5 | 15,1 |
| 55 | 13   | 10,6   | 34,6   | 6,4  | 7,4  |
| 56 | 14   | 12     | 36,2   | 7,3  | 8,1  |
| 57 | 636  | 783,1  | 64,6   | 75,4 | 72,5 |
| 58 | 127  | 137,6  | 386,5  | 84,7 | 83,9 |
| 59 | 516  | 583    | 1379,5 | 98,4 | 98,2 |
| 60 | 18   | 16     | 43     | 10,4 | 11,3 |
| 61 | 1403 | 1757,2 | 638,5  | 98,4 | 98,1 |
| 62 | 15   | 11,6   | 41,1   | 8,1  | 9,6  |
| 63 | 19   | 15     | 50     | 11,5 | 13,4 |
| 64 | 510  | 562,4  | 79,1   | 74,9 | 73,5 |
| 65 | 40   | 32,5   | 55,1   | 20,2 | 22,8 |
| 66 | 12   | 10,4   | 77,5   | 13,6 | 14,8 |
| 67 | 20   | 17,1   | 40,3   | 10,3 | 11,4 |
| 68 | 72   | 81,8   | 41,8   | 27,2 | 25,4 |
| 69 | 27   | 26,7   | 57,5   | 18,7 | 18,8 |
| 70 | 200  | 209,9  | 1042,6 | 95,5 | 95,3 |
| 71 | 16   | 14,6   | 75,2   | 16,3 | 17,3 |
| 72 | 453  | 505,1  | 519,3  | 95,1 | 94,7 |
| 73 | 38   | 35,2   | 43,5   | 17,4 | 18,2 |
| 74 | 309  | 345    | 226,6  | 86,1 | 85,2 |
| 75 | 7    | 5,4    | 47,5   | 5,5  | 6,6  |
| 76 | 25   | 22,7   | 38,1   | 11,7 | 12,5 |
| 77 | 156  | 148,3  | 60,5   | 45,9 | 46,8 |
| 78 | 81   | 77,4   | 60,6   | 34,6 | 35,3 |
| 79 | 60   | 62,4   | 60,2   | 30,9 | 30,3 |
| 80 | 128  | 149,9  | 162,7  | 70,5 | 68,1 |
| 81 | 178  | 176,6  | 167,6  | 73,6 | 73,7 |
| 82 | 32   | 26,3   | 148,9  | 37,9 | 41,3 |
| 83 | 698  | 775,2  | 830,9  | 97,8 | 97,6 |
| 84 | 19   | 16,6   | 37,9   | 9,5  | 10,4 |
| 85 | 262  | 300,8  | 275,7  | 87,3 | 86,2 |
| 86 | 19   | 12,8   | 50,3   | 10,4 | 13,5 |
| 87 | 25   | 19,9   | 58,6   | 15,9 | 18,2 |
| 88 | 120  | 112    | 48,5   | 35,5 | 36,6 |
| 89 | 18   | 14,1   | 50,5   | 11,2 | 13,1 |
| 90 | 18   | 15,1   | 49,6   | 11,5 | 12,9 |
| 91 | 12   | 9,3    | 36,8   | 6,3  | 7,4  |
| 92 | 32   | 29,1   | 140,9  | 38,3 | 40,0 |
| 93 | 18   | 10,4   | 48,7   | 8,8  | 12,6 |
| 94 | 76   | 57,7   | 29,9   | 17,0 | 20,0 |
| 95 | 23   | 23     | 45,7   | 13,9 | 13,9 |
| 96 | 244  | 246,3  | 384,2  | 89,4 | 89,3 |

|     |      |        |        |      |      |
|-----|------|--------|--------|------|------|
| 97  | 169  | 162,2  | 1208   | 95,3 | 95,5 |
| 98  | 139  | 152,2  | 404,4  | 86,2 | 85,4 |
| 99  | 96   | 90,9   | 195,6  | 66,8 | 67,7 |
| 100 | 1250 | 1297,6 | 660    | 98,0 | 98,0 |
| 101 | 688  | 774,2  | 7176,3 | 99,8 | 99,7 |
| 102 | 18   | 13,2   | 49,8   | 10,6 | 12,9 |
| 103 | 82   | 75,7   | 78,6   | 40,5 | 41,9 |
| 104 | 13   | 9,9    | 39,3   | 7,0  | 8,4  |
| 105 | 273  | 265,8  | 115,8  | 71,9 | 72,3 |
| 106 | 7    | 4,8    | 57,4   | 6,1  | 7,9  |
| 107 | 11   | 7,7    | 45     | 6,7  | 8,5  |
| 108 | 791  | 874,3  | 151,5  | 89,0 | 88,2 |
| 109 | 22   | 14,3   | 35,4   | 8,1  | 10,7 |
| 110 | 310  | 371,3  | 724,2  | 95,6 | 95,1 |
| 111 | 584  | 633,5  | 37,8   | 60,1 | 58,7 |
| 112 | 46   | 37,1   | 131    | 40,7 | 44,6 |
| 113 | 65   | 71,2   | 837,9  | 88,4 | 87,7 |
| 114 | 66   | 76,7   | 597,7  | 85,0 | 83,6 |
| 115 | 27   | 18,5   | 63     | 16,2 | 20,3 |
| 116 | 9    | 5      | 35,6   | 3,9  | 5,9  |
| 117 | 17   | 12,7   | 73,5   | 14,7 | 17,6 |
| 118 | 14   | 10,8   | 47,7   | 8,9  | 10,5 |

*Preglednica VIII: Kontrolne vrednosti tumorskega označevalca HE4.*

| KONTROLA<br>HE 4 | NIZKA      | SREDNJA          | VISOKA       |
|------------------|------------|------------------|--------------|
|                  | 35-65 kU/L | 122,5-227,5 kU/L | 490-910 kU/L |
| 1                | 53,1       | 186,3            | 697,8        |
| 2                | 51,8       | 178,6            | 704,1        |
| 3                | 51,6       | 181,5            | 700,4        |
| 4                | 51,7       | 169              | 698,4        |
| 5                | 52,8       | 173,8            | 714          |
| 6                | 51,3       | 178,5            | 717,2        |
| 7                | 50,2       | 186,4            | 720,4        |
| 8                | 53,3       | 182,1            | 714,4        |

**Preglednica IX:** Kontrolne vrednosti tumorskega označevalca CA 125.

| KONTROLA<br>CA 125 | NIZKA      | SREDNJA      | VISOKA       |
|--------------------|------------|--------------|--------------|
|                    | 28-52 kU/L | 210-390 kU/L | 455-845 kU/L |
| 1                  | 39,7       | 306,3        | 633,3        |
| 2                  | 39,6       | 306,2        | 641,2        |
| 3                  | 37,9       | 302,4        | 660,6        |
| 4                  | 39,3       | 298,9        | 655,4        |
| 5                  | 40,7       | 306,7        | 667,9        |
| 6                  | 37,3       | 309,5        | 633,6        |
| 7                  | 36,4       | 300,6        | 667,8        |
| 8                  | 36,8       | 304,3        | 689,4        |