

Dijagnostička vrijednost humanog epididimalnog proteina 4, ROMA indeksa i antigena Ki-67 u diferencijaciji bolesnica s tumorima jajnika

Špacir Prskalo, Zvezdana

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:524314>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Zvezdana Špacir Prskalo

**DIJAGNOSTIČKA VRIJEDNOST
HUMANOGA EPIDIDIMALNOG
PROTEINA 4, ROMA INDEKSA I
ANTIGENA KI-67 U DIFERENCIJACIJI
BOLESNICA S TUMORIMA JAJNIKA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Zvezdana Špacir Prskalo

**DIJAGNOSTIČKA VRIJEDNOST
HUMANOGA EPIDIDIMALNOG
PROTEINA 4, ROMA INDEKSA I
ANTIGENA KI-67 U DIFERENCIJACIJI
BOLESNICA S TUMORIMA JAJNIKA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

doc. dr. sc. Ljiljana Mayer

prof. dr. sc. József Petrik

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Zvezdana Špacir Prskalo

**DIAGNOSTIC VALUE OF HUMAN
EPIDIDYMAL PROTEIN 4, ROMA INDEX
AND ANTIGEN KI-67 IN
STRATIFICATION OF PATIENTS WITH
OVARIAN TUMORS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:
Asst. Prof. Ljiljana Mayer, Ph.D
Prof. József Petrik, Ph.D

Zagreb, 2024.

INFORMACIJE O MENTORIMA

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen pod mentorstvom nasl. doc. dr. sc. Ljiljane Mayer, znanstvene suradnice u Odjelu za medicinsku biokemiju u onkologiji, Klinika za tumore, Centar za maligne bolesti KBC-a Sestre milosrdnice i pod mentorstvom redovitog prof. dr. sc. u tr. izb. Józsefa Petrika Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALE

Doktorski rad izradila sam pod mentorstvom nasl. doc. dr. sc. Ljiljane Mayer, znanstvene suradnice, spec. med. biokemije iz Klinike za tumore, Centar za maligne bolesti, KBC Sestre milosrdnice i redovitog prof. dr. sc. u tr. izb. Józsefa Petrika, spec. med. biokemije s Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem mentorima na podršci, stručnim savjetima i pomoći u izradi doktorskog rada. Postoje osobe koje ti daruju sebe kada cilj izgleda daleko i koje pomažu kada to ne očekuješ... Na svemu... Hvala!

Zahvaljujem zaposlenicima Odjela za medicinsku biokemiju u onkologiji Klinike za tumore Centra za maligne bolesti, KBC Sestre milosrdnice na pomoći u svakodnevnom radu.

Zahvaljujem zaposlenicima Odjela za ginekološko-onkološku kirurgiju pri Zavodu za kiruršku onkologiju posebno kao i Kliničkom zavodu za patologiju „Ljudevit Jurak“, Klinike za tumore Centra za maligne bolesti KBC Sestre milosrdnice. Zahvaljujem na svojoj pomoći doc. dr. sc. Mariju Puljizu i dr. sc. Sandi Šitić.

Najveću zahvalu dugujem mojoj djeci Mateju i Petri Prskalo te roditeljima Đurđici i Josipu Špacir za njihova velika srca. I jednoj duši gore.

SAŽETAK

Rak jajnika vodeći je uzrok smrti žena s ginekološkim zloćudnim bolestima u Republici Hrvatskoj. Ovim istraživanjem ispitala se mogućnost predoperacijske diferencijacije ispitanica s tumorima jajnika ispitanica koristeći tumorske biljege ugljikohidratni antigen 125 (CA 125), humani epididimalni protein 4 (HE4) i multiparametarski model ROMA indeks. Na 159 ispitanica s tumorima jajnika, koje su liječene kirurškim putem, izmjerene su predoperacijske vrijednosti CA 125, HE4 i izračunan je ROMA indeks. Ispitivanjem dijagnostičke točnosti CA 125, HE4 i ROMA indeksa dobila se potvrda koji je serumski biljeg nadmoćniji, a ovisno o menopauzalnom statusu ispitanica. HE4 označava bolji izbor zbog dijagnostičkog kapaciteta nego biljeg CA 125 u svrhu diferencijalne dijagnoze tumora jajnika. Granične vrijednosti više su nego deklarirane te su se dokazale kao optimalne. HE4 ima najbolji dijagnostičku specifičnost kod dijagnoze tumora jajnika u pacijentica u predmenopauzi. ROMA indeks je onaj biljeg koji ima najbolju dijagnostičku sposobnost prepoznavanja malignog u bolesnica u postmenopauzi. HE4 i ROMA indeks nadmašuju CA 125 u diferencijalnoj dijagnozi tumora jajnika te su korisni alati u dijagnostici raka jajnika. Veće vrijednosti HE4 i CA 125 upozoravaju na uznapredovalu fazu bolesti kada dolazi do širenja izvan jajnika odnosno jajovoda. Provedena je korelacija s patohistološkim tipovima tumora: benignim tumorima, tumorima niskoga zloćudnog potencijala, zloćudnim tumorima, te tumorima sličnim lezijama koji su poslužili kao kontrolna grupa, dobivenih poslijeoperacijski. Naknadno iz 140 arhiviranih uzoraka deparafiniranih rezova odredila se ekspresija tkivnog biljega HE4 koji se rutinski ne određuje na tumorskom tkivu jajnika. Antigen Ki-67 kao pokazatelj stanične proliferacije može poslužiti kao dodatni biljeg tumorskog rasta. Podudarnost tkivne ekspresije HE4, antigena Ki-67 i serumskih vrijednosti HE4, CA 125 i ROMA indeksa sa stadijem proširenosti bolesti, a prema FIGO klasifikaciji, dokaz je prepoznavanja maligniteta te mogućeg što ranijeg prepoznavanja bolesti. Na taj način predoperacijske diferencijacije ispitanica s tumorima jajnika, koristeći biljege CA 125, HE4 i multiparametarski model ROMA indeks, omogućena je veća pouzdanost u diferencijalnoj dijagnostici karcinoma jajnika.

Ključne riječi: ugljikohidratni antigen 125 (CA 125), ljudski epididimalni protein 4 (HE4), ROMA indeks, Ki-67 antigen, tumori jajnika, dijagnostička točnost, FIGO

SUMMARY

Introduction

Adnexal masses are formations originating from the ovaries, fallopian tubes, cervix and uterus or other pelvic organs, from which ovarian cancer stands out due to its high mortality rate. Ovarian cancer is diagnosed in an advanced stage, so the five-year survival rate is low. Ovarian cancer is a heterogeneous disease, it differs in histological type, grade, molecular features, and consequently the treatment differs. Despite the implementation of treatment that includes surgical treatment, systemic application of chemotherapy, immunotherapy, targeted therapy and hormonal therapy, the prognosis for patients is devastating. For this reason, the diagnostic value of the tumor markers HE4, CA 125 and ROMA index, as well as the expression of tissue HE4 and Ki-67 antigen in the preoperative differentiation of ovarian tumors, was investigated.

This study examined the possibility of preoperative stratification in subjects with a tumor mass in the pelvis using markers CA 125, HE4 and the multiparameter model ROMA index. Regression analysis was used to compare the preoperative values of CA 125, HE4 and ROMA index, especially for identifying malignancy. Postoperatively, ovarian cancer was confirmed by pathohistological analysis, as well as other pathohistological subtypes of ovarian tumors: benign, borderline-malignant, tumors that have grafts and tumors resembling lesions that served as a control group.

The expression of the tissue marker HE4, which is not routinely determined on ovarian tumor tissue, but according to pathohistological tumor types, was tested. Antigen Ki-67 is an indicator of cell proliferation, so determination of antigen Ki-67 on ovarian tumor tissues served as an indicator of tumor growth. The concordance of tissue expression of HE4, antigen Ki-67 and serum values of HE4, CA 125 and ROMA index with the stage of disease extension, and according to the FIGO classification, should be proof of whether the disease can be recognized as early as possible. Additionally, the association of the mentioned parameters with the size and blood supply of the ovarian tumor was investigated. Due to the influence of the habit of smoking cigarettes, it will be examined whether the habit of smoking has an influence on the measured results, especially for HE4.

Materials and methods

The research was carried out in the Department of Medical Biochemistry in Oncology at the University Hospital for Tumors, Sestre milosrdnice University Hospital Center, in cooperation with the Department of Gynecological-Oncological Surgery of the Institute for Surgical Oncology at the University Hospital for Tumors and the Clinical Institute of Pathology "Ljudevit Jurak", Sestre milosrdnice University Hospital Center. The criterion for inclusion in the study was evidence of an adnexal mass in the pelvis of unknown etiology in the subjects and an indication of surgical treatment. Preoperatively, the blood of 159 subjects was sampled for the purpose of measuring the serum values of the tumor markers HE4 and CA 125. For each subject, the ROMA index was calculated after classification according to menopausal status, and according to formulas for premenopause and postmenopause. The obtained results were used to examine the diagnostic potential of all three parameters: CA 125, HE4 and ROMA index. Postoperatively, the test subjects were divided according to pathohistological types of tumors by looking at the pathohistological findings in which the tumor tissue is described as benign, borderline-malignant or malignant, and the histological type and degree of tumor differentiation determined, microinvasion, assessment of the status of lymph nodes, the presence of ascites, involvement of the tubes, omentum, the presence of residual tumor and metastases. Subsequently, the expression of tissue marker HE4 and antigen Ki-67 was determined by immunohistochemistry from archived samples of deparaffinized sections of tumor tissue, which served as an additional marker for the assessment of cell proliferation. Monoclonal antibodies specific for tissue HE4 and Ki-67 antigen were used for samples, 140 in total, for which material was available. Tumor grade and disease stage according to the FIGO classification (stage I-IV): ovarian carcinomas limited to the ovaries (FIGO stage I), ovarian carcinomas extending to the pelvic organs (FIGO stage II), ovarian carcinomas with peritoneal metastases (FIGO stage III) and ovarian carcinomas with distant metastases (FIGO stage IV) were compared with all serum and tissue parameters.

Results

In the first part of the results, using the ROC (Receiver Operating Characteristics) statistical analysis, the curve visualized and classified the properties of three parameters: CA 125, HE4 and ROMA index. A regression analysis of the obtained results was made, separately for the

premenopausal and postmenopausal groups. In the premenopausal group, the area under the ROC curves was 84.6 % for HE4, 86.7 % for CA 125, and 84.6 % for the ROMA index. The threshold values obtained in the ROC analysis are 86.1 pmol/L for HE4, 40.7 U/mL for CA 125, and 21.9 % for the ROMA index. Diagnostic sensitivity was 85.7 % for HE4, 75 % for CA 125, and 85 % for the ROMA index. Diagnostic specificity was 80 % for HE4, 69.3 % for CA 125, and 62 % for the ROMA index. The positive predictive value was 67 % for HE4, 35.3 % for CA 125, and 67 % for the ROMA index. The negative predictive value was 92.4 % for HE4, 91.9 % for CA 125 and 95.2 % for the ROMA index. In the postmenopausal group, the area under the ROC curves was 92.8 % for HE4, 89.9 % for CA 125, and 92.7 % for the ROMA index. The threshold values obtained in the ROC analysis are 99.8 pmol/L for HE4, 45.8 U/mL for CA 125, and 38.4 % for the ROMA index. Diagnostic sensitivity was 91.2 % for HE4, 88.9 % for CA 125, and 91.7 % for ROMA index. Diagnostic specificity was 80.3 % for HE4, 77.2 % for CA 125, and 80.3 % for the ROMA index. The positive predictive value was 75.6 % for HE4, 77.5 % for CA 125, and 91.2 % for the ROMA index. The negative predictive value was 92.4 % for HE4, 91.9 % for CA 125 and 95.2 % for the ROMA index. The tumor marker HE4, applied to the test subjects in our study, has a higher diagnostic capacity than CA 125 in the differential diagnosis of ovarian tumors, mainly in premenopausal patients.

Analysis of the distribution of test subjects according to the pathohistological types of the disease and according to the menopausal status of the test subjects showed a significantly higher proportion of malignant cysts (84.2 %) in postmenopausal subjects, while a statistically significantly higher proportion of TLL was demonstrated in premenopausal subjects (65.22 %), $p = 0.001$. The youngest subjects were those who had TLL with a median age of 49.0 (43.5-53.5) years and were significantly younger than benign cysts ($P = 0.003$), borderline changes ($P = 0.010$), malignant cysts ($P < 0.001$) and metastasis ($P < 0.001$). In the group of malignant cysts, the most represented status was IIIc with 23 (60.5 %) according to FIGO, and as for grades, the most represented was grade 3 (62.9 % of subjects with malignant cysts). The analysis of tumor flow and volume in the groups according to the pathohistological type of the disease was not statistically significant ($P = 0.080$). By tumor volume, benign cysts were significantly smaller than malignant ($P < 0.001$) and metastases ($P = 0.021$). The value of HE4 in the serum is 13.10 pmol/L, and the highest is 7700.00 pmol/L. The subgroup with malignant cysts had the highest values of serum HE4 with a median of 302.7 pmol/L, which were significantly higher than all other subgroups ($P < 0.001$) including metastases ($P = 0.010$). The metastasis subgroup had significantly higher values than all other subgroups except malignant

cysts with a median of 117.65 pmol/L. A statistically significant difference between serum HE4 concentrations ($P < 0.01$) was demonstrated between individual subgroups: benign cyst subgroup versus malignant cyst subgroup, benign cyst subgroup versus metastasis subgroup, borderline subgroup versus malignant cyst subgroup, borderline subgroup versus metastasis subgroup, TLL subgroup vs. subgroups of malignant cysts, subgroups of TLL vs. subgroups of metastases. The malignant cyst subgroup had the highest tissue HE4 values which were significantly higher than the benign cyst subgroup ($P = 0.049$), the TLL subgroup ($P < 0.001$), and the metastases subgroup ($P = 0.030$). Subgroup TLL had the lowest value of tissue HE4: it had no expressed tissue HE4 at all, which was significantly lower compared to all other subgroups ($P < 0.001$). Differences in measured CA 125 values between subgroups of pathohistological types: the highest values were recorded in the group of metastases with a median of 241.8 U/mL, which were significantly higher than all other subgroups except for malignant cysts, median of 199.15 U/mL ($P = 0.964$). Ki-67 antigen in ovarian tissue was the most expressed in the group of malignant cysts with significantly higher values compared to all other pathohistological types ($P < 0.001$) except metastases ($P = 0.183$). Given that the ROMA index is calculated from HE4 and CA 125 values, the differences in values are similar to those values. The highest ROMA index values were in malignant cysts and were significantly higher than all other subgroups ($P < 0.001$). In the high-risk group, malignant cysts were the most common (45.3 %), while in the low-risk group those were benign cysts (63.1 %; $P < 0.001$). Also, in the group with high risk, the most represented was FIGO classification IIIC – 23 (67.6 %) respondents. The agreement of the clinical significance of the expression and serum concentration of HE4, Ki-67 and ROMA index with the FIGO classification, as well as the assessment of the clinical significance of the serum concentration of HE4 by comparison with the expression of HE4 in the tissue with the stage of the histological tumor grade, does not significantly correlate with any of the mentioned clinical values, while higher FIGO classification significantly positively correlates with serum HE4 ($\rho = 0.475$, $P = 0.004$), CA 125 ($\rho = 0.530$, $P = 0.001$) and ROMA index ($\rho = 0.546$, $P = 0.001$). Considering the strength of the correlation coefficients, the strongest significant correlation is with the ROMA index itself, which points to clinical importance. Ki-67 did not significantly correlate with grade, FIGO classification, or ROMA index. Also, tissue HE4 did not significantly correlate with grade and FIGO classification. The research also examined the influence of smoking on the frequency and type of tumors. There is no proven connection between the pathohistological types of the disease in relation to the smoking status and the number of cigarettes smoked per day.

Conclusion

The HE4 marker improves the diagnostic specificity of CA 125 in distinguishing between benign and malignant pathology, allowing valuable surgical anticipation in case of a possible malignancy result. The regression analysis of the obtained measurement results showed differences for the premenopausal and postmenopausal groups. The limit values in our research are higher than declared by the manufacturer, and have proven to be optimal. Marker HE4 has the best diagnostic specificity in the diagnosis of ovarian tumors in premenopausal patients. Diagnostic sensitivity is equal for HE4 and ROMA index. The ROMA index is the marker that has the best diagnostic ability to recognize malignancy in postmenopausal patients, which proves the highest diagnostic sensitivity compared to CA 125 and HE4. This also affects the presence of malignant cysts in the high-risk group, so that HE4 and the ROMA index surpass CA 125 in the differential diagnosis of adnexal masses, and represent useful tools in the diagnosis of ovarian cancer. Malignant cysts had the highest values of serum HE4, which were significantly higher than all other examined subgroups, and the highest values of serum CA 125 were recorded in the group of metastases. Given that the ROMA index is calculated from HE4 and CA 125 values, the differences in values are similar to those values. Given the existence of statistically significant differences in the measured values of the HE4 marker in the serum, confirmation of its hypothetical value as a specific marker for ovarian cancer was obtained. This conclusion is in accordance with scientific evidence based on research on similar populations of patients. Tissue HE4 was expressed in all ovarian tumor subtypes, except in the control group, which was surprising. It can be concluded that the obtained results did not confirm the literature data stating that tissue HE4 as a marker is also expressed in healthy ovarian tissue, which represents the control group. Expression of the HE4 marker in all examined subtypes proves the growth of cells regardless of whether they are malignant or benign. Nevertheless, malignant cysts had the highest values of tissue HE4, so it can be concluded that determination of tissue HE4 for ovarian cancers is useful. The concordance of the clinical significance of the expression and serum concentration of HE4, Ki-67 and ROMA index with the FIGO classification, as well as the assessment of the clinical significance of the serum concentration of HE4 by comparison with the expression of HE4 in the tissue with the stage of the disease, differed by individual parameters. The strongest correlation was demonstrated for the ROMA index, which indicates its clinical importance. Ki-67 did not significantly correlate with grade, FIGO classification, or ROMA index. Also, tissue HE4 did not significantly correlate with grade and FIGO classification. The grade of the tumor does not

significantly correlate with any of the mentioned clinical values. The conclusion is that the ROMA index is the most useful, given that it is a mathematical calculation based on the measured values of HE4 and CA 125.

Keywords: carbohydrate antigen 125 (CA 125), human epididymal protein 4 (HE4), ROMA index, Ki-67 antigen, ovarian tumors, diagnostic accuracy, FIGO

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Tumori jajnika	1
1.2. Dijagnostika raka jajnika.....	2
1.3. Liječenje raka jajnika	4
1.4. Epidemiologija raka jajnika.....	6
1.5. Čimbenici rizika	7
1.6. Genetsko nasljeđe kao čimbenik rizika	8
1.7. Biologija tumora i patogeneza.....	9
1.8. Klasifikacija tumora jajnika	10
1.9. FIGO klasifikacija	12
2. TUMORSKI BILJEZI.....	14
2.1. Ugljikohidratni antigen 125 (CA 125)	14
2.2. Humani epididimalni protein 4 (HE4)	18
2.3. ROMA indeks	21
2.4. Ki-67.....	23
2.5. Tumorski biljezi za karcinom jajnika u fazi istraživanja	25
3. OBRAZLOŽENJE TEME	26
4. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA	27
5. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	28
6. MATERIJALI I METODE	29
6.1. Kriterij odabira ispitanica	29
6.2. Tijek istraživanja	29
6.3. Skupine ispitanica	30
6.4. Uzorkovanje krvi za analize	31
6.5. Principi metoda mjerenja određivanih analita.....	32
6.6. Principi patohistološke dijagnostike.....	33
6.7. Analiza protoka i volumena tumora u skupinama prema patohistološkom tipu bolesti	34
6.8. Statistička obrada	34
7. REZULTATI.....	36

7.1.	Analiza raspodjele ispitanica prema patohistološkim tipovima bolesti prema menopauzalnom statusu ispitanica	36
7.2.	Dobne razlike između skupina ispitanica prema patohistološkom tipu tumora.....	37
7.3.	Histološki gradus i FIGO klasifikacija u skupini zloćudnih tumora	37
7.4.	Analiza protoka i volumena tumora u skupinama prema patohistološkom tipu bolesti	39
7.5.	Utjecaj pušenja	42
7.6.	HE4 u serumu i tkivu	44
7.7.	CA 125 u serumu.....	47
7.8.	Ki-67 antigen u tkivu jajnika.....	49
7.9.	ROMA indeks	50
7.10.	Analiza povezanosti između određenih kliničkih parametara s histološkim gradusom tumora, FIGO klasifikacijom i vrijednostima ROMA indeksa.....	54
7.11.	Ispitivanje razlika u vrijednostima kliničkih parametara s histološkim gradusom tumora u skupini zloćudnih tumora	56
7.12.	Dijagnostička točnost serumskog HE4, CA 125 i ROMA indeksa u predmenopauzalnoj i postmenopauzalnoj grupi	57
7.12.1.	Predmenopauzalna grupa	57
7.12.2.	Postmenopauzalna grupa.....	62
8.	RASPRAVA.....	67
9.	ZAKLJUČAK	81
10.	POPIS LITERATURE	84
11.	PRILOZI.....	98
12.	ŽIVOTOPIS AUTORA.....	99

KRATICE

ADNEX – engl. *Assessment of Different Neoplasias in the adneXa*

AFP – alfa fetoprotein

ASCO – engl. *American Society for Clinical Oncology*

β -HCG – beta humani korionski gonadotropin

BMI – indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)

BRAF – engl. *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*

BRCA – engl. *BReast CAncer*

BSO – bilateralna salpingo–ooforektomija

CA 125 – ugljikohidratni antigen 125 (engl. *carbohydrate antigen 125*)

CDC2 – engl. *cell division cycle 2*

CDK1 – ciklin ovisna kinaza 1 (engl. *cyclin dependent kinase 1*)

CMIA – kemiluminiscentni imunotest s mikročesticama (engl. *chemiluminescent microparticle immunoassay*)

CTC – cirkulirajuće tumorske stanice

ctDNA – cirkulirajuća tumorska DNA

CTNNB1 – engl. *cadherin–associated protein beta 1*

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

DSB – engl. *double stranded break*

ECLIA – engl. *electrochemiluminescence immunoassay*

eGFR – engl. *estimated glomerular filtration rate*

EGTM – engl. *European Group of Tumor Markers*

EIA – enzimski imuno test

ERM – engl. *ezrin/radixin/moesin*

FIGO – Međunarodna federacija ginekologa i opstetričara (franc. *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*)

GLOBOCAN – engl. *Global Cancer Observatory*

GnRH – gonadotropin oslobađajućim hormonom (engl. *gonadotropin releasing hormone*)

HE4 – humani epididimalni protein 4 (engl. *human epididymal protein 4*)

HRD – nedostatak homologne rekombinacije (engl. *homologous recombination deficiency*)

IFCC – engl. *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*

IOTA – engl. *International Ovarian Tumor Analysis*

JAK2 – Janus kinaza 2

K-ras – engl. *Kirsten rat sarcoma virus*

Ki-67 – engl. *Kiel antigen 6*

LD – laktat dehidrogenaza

MIB-1 – mindbomb E3 ubikvitin protein ligaza 1

MLH1 – engl. *mutL homolog 2*

MMR – engl. *mismatch repair*

MSCT – kompjutorizirana tomografija

MUC – mucin

NACB – engl. *National Academy of Clinical Biochemistry*

NGS – sekvenciranje slijedeće generacije (engl. *next generation sequencing*)

PI – prognostički indeks

p53 – engl. *tumor protein 53*

PIK3CA – engl. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha*

PI3K/AKT/GSK3 β – fosfoinozimid 3-kinaza/protein kinaza B/glikogen sintaza kinaza 3 beta

PTEN – engl. *phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase*

RMI – indeks malignosti (engl. *risk of malignancy index*)

RNA – ribonukleinska kiselina (engl. *ribonucleic acid*)

ROMA – engl. *Risk of Ovarian Malignancy Algorithm*

RTG – rendgen

SEA – engl. *sea urchin sperm protein, enterokinase, and agrin*

STAT3 – posredujući aktivator transkripcije 3 (engl. *signal transducer and activator of transcription 3*)

STIC – stanice seroznog intraepitelnog karcinoma jajovoda (engl. *serous tubal intraepithelial carcinoma*)

TAH – totalna abdominalna histerektomija

TLL – tumorima slične lezije (engl. *tumor-like lesions*)

TNF – čimbenik nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*)

UICC – engl. *International Union Against Cancer*

UZV – ultrazvuk

VEGF – vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*)

WAP – engl. *whey acidic protein*

WFDC – engl. *WAP four-disulfide core*

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*)

1. UVOD

1.1. Tumori jajnika

Tumorska masa koja potječe iz jajnika, jajovoda, cerviksa i maternice ili od drugih zdjelčnih organa (crijeva, mokraćnog mjehura, mokraćovoda, skeletnih mišića ili kosti) naziva se i adneksalna masa. Ona se pojavljuje u žena svih životnih dobi, a etiologija i vrsta razlikuju se prema podrijetlu. Ako je ginekološkog podrijetla, adneksalna masa može biti posljedica funkcionalnih ili fizioloških promjena, upalnih procesa, endometrioze, benignih i malignih tumora. Stvarna incidencija adneksalnih masa u općoj je populaciji nepoznata jer je većina njih asimptomatska i ostaje nedijagnosticirana. Obično se otkrije tijekom ginekološkog pregleda ili slikovnim pregledom zdjelice. Rjeđe, adneksalna masa može se pojaviti sa simptomima akutne ili povremene boli. Predoperacijsko identificiranje pacijenata za upućivanje ginekološkom onkologu često je otežano s obzirom na to da ne postoje definitivni neinvazivni dijagnostički testovi za trijažu pacijentica. Nedovoljno precizna predoperacijska dijagnoza adneksalne mase često rezultira ili nepotrebnim kirurškim zahvatom za benignu masu ili nedovoljno radikalnim kirurškim pristupom za malignu masu. Potonje može imati naknadni negativni učinak na preživljenje, osobito za rak jajnika. Smatra se da je 30 % – 50 % žena s rakom jajnika prije operacije pravilno upućeno ginekološkim onkolozima na daljnje liječenje (1).

Tumori jajnika općenito dijele se u tri osnovne kategorije. Prvu kategoriju čini velika skupina benignih tumora jajnika. Benigne tumore jajnika karakterizira rast jajnika, katkada i do ekstremnih dimenzija, ali ne daju presadnice. Benigni tumori ostaju dobro ograničeni od okolnog tkiva, lako se uklanjaju i vrlo se rijetko ponovno pojavljuju. Benigni tumori najčešće rastu sporo, pri tome stanice tumora ne napadaju ostale zdrave stanice, ne urastaju u okolno tkivo, limfne čvorove, krvne žile i druge dijelove tijela.

Drugu skupinu čine tumori niskoga zloćudnog potencijala (engl. *borderline tumor*). Za ove tumore koristi se i naziv atipični proliferirajući tumori jajnika. Prema citološkim karakteristikama odgovaraju malignomima, ali su bez jasne stromalne invazije te čine zasebnu kategoriju. Histopatološki su slični pokrovnim epitelnim tumorima jajnika jer se ne mogu ubrojiti niti u grupu benignih niti malignih tumora.

Treću kategoriju čine maligni tumori jajnika. Maligni tumori rastu brzo i nezaustavljivo te urastaju u okolno zdravo tkivo. Stanice zloćudnih tumora uništavaju okolne zdrave stanice i strukture te ih je zbog toga, osim dok su vrlo mali, teško ukloniti u cijelosti. Vrlo je često

potrebno ukloniti cijeli organ želi li se ukloniti vidljivo tumorsko tkivo iz organizma. Maligne tumore jajnika tvore maligne stanice koje imaju sposobnost rasta i diseminacije te se mogu širiti na okolna i udaljena tkiva i organe u obliku presadnica.

Unatoč napretku u dijagnostici i liječenju zadnjih nekoliko godina, ginekološki maligniteti označavaju heterogenu skupinu bolesti od kojih se izdvaja rak jajnika kao dijagnoza s najlošijim preživljenjem. Rak jajnika označava općeniti pojam za niz heterogenih podtipova bolesti koji se međusobno razlikuju po histološkom tipu, histološkom gradusu, molekularnim osobinama, pa posljedično i liječenju i prognozi. Primarni tumor jajnika jest u 95 % slučajeva epitelnog podrijetla odnosno nastaje iz stanica na površini jajnika, tj. epitela pa ga uobičajeno nazivamo karcinom jajnika ili epitelni rak jajnika. Ostatak od 5 % neepitelni je rak jajnika koji nastaje iz zametnog epitela i spolnih stanica i strome.

1.2. Dijagnostika raka jajnika

Dijagnostika bolesti sadržava: anamnezu i fizikalni pregled, ginekološki pregled, transvaginalni/transabdominalni ultrazvuk, kompletnu krvnu sliku, diferencijalnu krvnu sliku, biokemijske pretrage krvi, ugljikohidratni antigen 125 (CA 125), beta humani korionski gonadotropin (β -hCG), alfa fetoprotein (AFP), laktat dehidrogenaza (LD), ultrazvuk trbuha i zdjelice, radiološka snimka (RTG) torakalnih organa, odnosno kompjutorizirana tomografija (MSCT) torakalnih organa u slučaju suspektog RTG-nalaza ili kliničke simptomatologije. Konačna dijagnoza postavlja se na temelju patohistološke potvrde bolesti najčešće tijekom dijagnostičko-terapijskog operacijskog zahvata. Kliničke smjernice za dijagnozu, liječenje i praćenje bolesnica oboljelih od raka jajnika, jajovoda i potrbušnice objavljene 2021. godine navode da se iznimno dijagnoza raka jajnika postavlja na temelju biopsije tumora pod kontrolom ultrazvuka, te citološke dijagnoze nakon aspiracije tumora tankom iglom uz suglasju kliničke, radiološke i biokemijske obrade, odnosno kada se zbog proširenosti bolesti (stadij IV) i općeg stanja bolesnice (prema procjeni MDT-a da bolesnica nije kandidat za operacijsko temeljenu dijagnostiku) takav način dijagnostike definira kao optimalan (2).

Bolest se najčešće dijagnosticira u uznapredovalom stadiju jer je rani stadij praćen simptomima koji su minimalni, nespecifični ili gotovo ne postoje. Nespecifični znaci raka jajnika su: nelagoda i pritisak u zdjelici i abdomenu, osjećaj nadutosti i oticanja trbuha uslijed stvaranja i zadržavanja vode, poteškoće s probavom (mučnina uz gubitak apetita, osjećaj sitosti neposredno nakon započinjanja obroka, nemogućnost probavljanja hrane, konstipacija),

promjene u načinu mokrenja (npr. učestalije mokrenje), dispareunija (bol prilikom spolnog odnosa), kratkoća daha (radi nakupljanja tekućine u grudnom košu i trbušnoj šupljini). U uznapređevaloj fazi raka jajnika javljaju se izraženiji i jasniji simptomi bolesti. Javlja se mučnina, povraćanje, gubitak apetita i mršavljenje. Od znakova karakteristično je povećanje trbuha zbog nakupljanja slobodne tekućine u trbušnoj šupljini ili ascites, opstrukcija crijeva zbog tumorske mase, pleuralni izljev, uvećani limfni čvorovi, uvećani parenhimski organi (jetra, slezena). Zbog što ranije dijagnostike raka jajnika Goff i sur. uveli su tzv. indeks simptoma ili SI (engl. *symptom index*) koji opisuje pojavnost jednog od šest simptoma: nadutost, povećani obujam abdomena, bol u abdomenu ili zdjelici, poteškoće u jelu ili osjećaj sitosti (3).

Dodatni problem čini ne postojanje metode probira (engl. *screening*) za rano otkrivanje raka jajnika. Više od dvije trećine bolesnica s rakom jajnika dijagnosticirano je u uznapređevalom stadiju bolesti (FIGO stadij III ili IV) s petogodišnjim preživljenjem od 27 % za stadij III. i 13 % za stadij IV. Za razliku od toga, petogodišnja stopa preživljenja u slučaju otkrića bolesti u ranoj (stadij I prema FIGO klasifikaciji), je 90 %, a desetogodišnje preživljenje doseže 84 % (4).

S laboratorijskog gledišta, izazovi što točnije dijagnostike raka jajnika su višestruki. Određivanje tumorskih biljega u serumu ima važnu ulogu u tri aspekta dijagnostike i liječenja. Prvi obuhvaća procjenu rizika i probir, drugi postavljanje dijagnoze i optimalan odabir daljnjeg liječenja, a treći praćenje liječenja (engl. *follow up*) sa ciljem otkrivanja eventualnog povratka bolesti.

Heterogenost same bolesti te različitost podtipova koji uvjetuju jedinstvene molekularne promjene ispoljava se razlikama proteina mjerljivim u serumu. Dodatno, prisutni i mjerljivi proteini u serumu podliježu nizu bioloških varijacija zbog različitih fizioloških fluktuacija (npr. menstrualni ciklus, dob i sl.). Stoga se s posebnim oprezom iznose podaci o dijagnostičkoj osjetljivosti, dijagnostičkoj specifičnosti, graničnim vrijednostima koje bi olakšale razgraničavanje zdravih od bolesnih, te tumačenje izmjerenih vrijednosti u različitim fazama bolesti. Do sada nije pronađen biljeg dovoljno osjetljiv i specifičan za rak jajnika, pogotovo za ranu fazu bolesti koja klinički prolazi nezamijećeno. Postojanje takvog biljega za rano otkrivanje, predviđanje rizika, prepoznavanje stadija i terapijske učinkovitosti raka jajnika omogućilo bi ne samo poboljšanje u ranoj dijagnozi već i pridonijelo boljem preživljenju bolesnica s rakom jajnika. Ovo su argumenti radi kojih je ispitivana prognostička moć niza biljega samostalno, ili kombinaciji dva ili više njih, ili kao komponente multimodalnih testova.

U svrhu dijagnoze i prognoze raka jajnika ispitivani su sljedeći serumski biljezi: osteopontin, kalikreini, bikunin, vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), prostasin, mezotelin, apolipoprotein A-1, transtiretin, transferin (5), ali niti jedan nije zaživio u kliničkoj upotrebi. U posljednjih 20 godina utvrđene su preporuke za upotrebu tumorskih biljega u kliničkoj praksi i nisu se značajno promijenile. Te su preporuke međunarodno prihvaćene i uključuju smjernice za kliničku uporabu tumorskih biljega, zahtjeve za tehnološki razvoj metode i standardi za osiguranje kontrolu kvalitete. Pripremile su ih europske i američke udruge, poput ASCO-a (engl. *American Society for Clinical Oncology*) (6), EGTM (engl. *European Group of Tumor Markers*) (7), NACB (engl. *National Academy of Clinical Biochemistry*) (8) i IFCC (engl. *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*). Prema preporukama koriste se CA 125 i HE4, te njihova kombinacija u obliku ROMA indeksa (engl. *Risk of Ovarian Malignancy Algorithm*).

1.3. Liječenje raka jajnika

Liječenje primarnog raka jajnika, jajovoda i potrbušnice ovisi o stadiju bolesti i temelji se na kirurškom liječenju, sistemskoj primjeni kemoterapije, imunoterapije, ciljane terapije i hormonske terapije kao i suportivno-simptomatskih mjera tijekom cijelog liječenja (9).

U ranim stadijima bolesti postoje mnogobrojni terapijski postupci liječenja s ciljem poboljšano ishoda za bolesnicu i što duljeg preživljenja. O liječenju i praćenju bolesnica odlučuje multidisciplinarni tim uzimajući u obzir osobitosti bolesnice (dob, opće stanje i komorbiditete) kao i obilježja samog tumora (stadij bolesti, histološki tip i stupanj zloćudnosti tumora, status homologne rekombinacije, odnosno gena *BRCA1* (engl. *BReast CAncer 1*) i *BRCA2* (engl. *BReast CAncer 2*) kao i odgovor na prethodno liječenje i popratnu toksičnost ako se radi o povratu bolesti. Liječenje raka jajnika započinje kirurškim zahvatom, ako to opće stanje bolesnice i stupanj proširenost bolesti dopušta. Cilj kirurškog liječenja je ukloniti što je moguće više tumorom zahvaćenog tkiva. Dokazano je da je duljina preživljenja kod raka jajnika u direktnoj korelaciji s kvalitetom kirurškog zahvata - što je manje tumorskog tkiva zaostalo nakon operacije, to je prognoza za bolesnicu bolja.

Osnovni kirurški zahvat uključuje laparatomiju, uzorkovanje ascitesa, peritonealnog ispirka (za citološku analizu), te totalna abdominalna histerektomija (TAH) i bilateralna salpingo-ooforektomija (BSO). Pored navedenog, uklanja se omentum te zdjelčni i paraaortalni limfni čvorovi, pregledaju se svi organi zdjelice i abdomena te dostupna peritonealna površina. Uzima

se biopsija potrbušnice zdjelice i iz svih suspektnih područja. Cilj ovakvog zahvata jest uklanjanje svih tumorskih tvorbi u zdjelici i abdomenu. Točno utvrđivanje stupnja proširenosti bolesti ključan je korak koji usmjerava sve daljnje odluke oko kliničkog tretmana pojedine pacijentice. Za to je važna FIGO klasifikacija u trenutku dijagnoze, odnosno klasifikacija koja je temeljena na histopatohistološkoj i kirurškoj procjeni proširenosti bolesti. Važni čimbenici koji utječu na tijek i ishod bolesti su histološki podtip tumora te njegov histološki gradus. Histološki gradus tumora ili stupanj diferenciranosti iskazuje atipičnost značajki samih malignih stanica kao i arhitekturu samoga tumora. U slučaju raka jajnika najčešće se koristi histološki gradus tumora označen sa 1 ili 3 odnosno „niski“ ili „visoki“. Niži broj i niski histološki gradus znače bolju prognozu, a viši broj i visoki histološki gradus lošiju prognozu. Histološki gradus predstavlja stupanj diferenciranosti (zrelosti) tumorskih stanica. Što je tumor nezreliji, mogućnost širenja bolesti je veća. Opsežno iskustvo kliničara pokazalo je da je optimalno uklanjanje citoredukcijskom kirurgijom zaostalih tumorskih naslaga veličine manje od 1 cm povezano s poboljšanim ishodima pacijenata (10). Za liječenje karcinoma jajnika u sistemskom liječenju koristi se antineoplastična terapija uključuje tradicionalnu kemoterapiju s citotoksičnim lijekovima kao i novije tehnike, uključujući hormonske lijekove i imunoterapiju. Zlatni standard u liječenju karcinoma jajnika jest primjena terapije temeljene na pripravcima platine (cisplatina i karboplatina) i taksana (paklitaksel). Može se ordinirati predoperacijski (neoadjuvantna kemoterapija), poslijeoperacijski (adjuvantna kemoterapija) te nakon dijagnoze ili operacije recidivirajuće bolesti. U slučaju uznapredovale bolesti, kada je nemoguće provođenje citoreduktivne kirurgije, kad je cijeli abdomen prožet tumorskom masom (FIGO IIIC), ordinira se neoadjuvantna kemoterapija uz prethodnu patohistološku potvrdu bolesti (11). Napredak u probiru i razumijevanju molekularne patogeneze raka jajnika i razvoj ciljanih terapija (npr. bevacizumab) i praktičnih intraperitonealnih tehnika za davanje lijekova najvjerojatnije će poboljšati ishode pacijenata sa ciljem produženja petogodišnjeg preživljenja, ali to još uvijek nije postignuto. Monoklonsko protutijelo bevacizumab djeluje kao inhibitor angiogeneze koji se veže na vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF) i blokira njegovu biološku funkciju. VEGF je protein koji nastaje u stanicama tijela, a koji stimulira rast i povećava propusnost krvnih žila. Posljedično bevacizumab dovodi do smanjenja neoangiogeneze i povećanje vaskularne propusnosti, s posljedicom oslobađanja veće doze kemoterapeutika što rezultira apoptozom tumorskih endotelnih stanica. U kombinaciji sa standardnim protokolom s paklitakselom i karboplatinom, a zatim nastavljen samostalno do progresije ili najdulje do 15 mjeseci, produljuje preživljenje bez progresije kod bolesnica s uznapredovalim rakom jajnika i lošom prognozom (12).

Antiangiogeni lijek bevacizumab i tri odobrena PARP-inhibitora: olaparib, niraparib i rukaparib (13), poboljšali su ishode liječenja (14). PARP ima ulogu u popravku lomova u jednostrukim lancima DNA i popravke u kromatinu. S obzirom da tumorske stanice imaju oštećene DNA oslanjaju se na PARP da ga popravi. Izostankom te aktivnosti dolazi do smrti tumorske stanice. Terapija održavanja PARP inhibitorima, nakon odgovora na prvolinijsku kemoterapiju, produljuje preživljenje do napredovanja bolesti kod bolesnica s poremećajem u sustavu popravka dvostrukih lomova deoksiribonukleinske kiseline homolognom rekombinacijom. Najveću korist imaju bolesnice s BRCA mutacijama. PARP inhibitori su specifični za defekte popravka DNA, poput BRCA mutacija, a podrazumijevaju inhibiciju poli (adenozin difosfat riboza) polimeraza enzima, PARP enzima. Naziv PARP je naziv za enzimski kompleks koji je jedan od 17 enzimskih kompleksa u natporodici PARP, a PARP1 i PARP2 predstavljaju najbolje okarakterizirane podtipove. Inhibicijom PARP enzima blokira se put popravka izrezivanjem jedne baze. Normalne, zdrave stanice mogu koristiti alternativni put popravka, homolognu rekombinaciju, ali kod stanica koje posjeduju mutaciju BRCA gena to nije slučaj. Te stanice pogođene mutacijom su jako osjetljive na PARP inhibitore. Kombinacijom odsutnosti aktivnosti enzima PARP, PARP inhibitorima te nemogućnost popravka DNA homolognom rekombinacijom zbog nedostatka funkcije BRCA1 i BRCA2 gena, dolazi do apoptoze odnosno zaustavljanja staničnog ciklusa (2).

Stoga postoji kritična potreba za preispitivanjem postojećih i identificiranjem potencijalnih biobiljega koji bi mogli dovesti do razvoja novih i učinkovitijih prediktora za dijagnozu i prognozu raka jajnika, kao i u liječenju.

1.4. Epidemiologija raka jajnika

Prema podacima GLOBOCAN (engl. *Global Cancer Observatory*) za 2020. godinu (15) od ukupno 313 959 novootkrivenih slučajeva bolesnica s rakom jajnika umre 207 252 bolesnica. Rak jajnika javlja se u razvijenim zemljama diljem svijeta u žena bjelkinja, višeg socio-ekonomskog statusa, a pojavnost u zemljama Zapadne Europe je visoka i iznosi 66 693 novootkrivenih slučajeva u 2020. godini. Dostupni podaci za Republiku Hrvatsku koje je objavio Registar za rak (16), a odnose se na statistički obrađene podatke za 2020. godinu, potvrđuju ove zabrinjavajuće brojeke. Od najčešćih sijela raka za ženski spol rak jajnika je na osmom mjestu nakon raka dojke, raka pluća, raka kolona, raka tijela maternice, raka štitnjače, raka rektuma i rektosigme te raka gušterače.

Rak jajnika ima incidenciju od 3 %, odnosno od ukupno 10 904 novooboljele žene od tumorske bolesti u 2020. godini njih 368 su bolesnice s rakom jajnika. Na prvi pogled, incidencija od 3 % čini se relativno mala. Međutim, zabrinjava podatak da od 368 novootkrivene bolesnice čak 315 završi smrtnim ishodom i predstavlja potvrdu da se radi o ginekološkom malignitetu s najlošijim preživljenjem. Posljednji podaci CONCORD-3 studije o preživljenju od raka u Europi pokazuju da je petogodišnje preživljenje žena u Hrvatskoj kojima je rak jajnika dijagnosticiran između 2010. i 2014. godine 36 %, što nas stavlja na 23. mjesto od ukupno 28 zemalja (17). Također zabrinjava razlika u stopi incidencije raka jajnika za Republiku Hrvatsku koja iznosi 17,7 % na 100 000 stanovnika, dok svjetska standardizirana stopa svjetskog pučanstva iznosi 9,0 % na 100 000 stanovnika. Rak jajnika se javlja u svim životnim dobima, uključujući rano djetinjstvo i duboku starost, ali incidencija dramatično raste sa godinama života. Incidencija se kreće od 2/100 000 za žene između 20 – 29 godina, do 55/100 000 za žene sa 70 godina starosti (16). Prema podacima o petogodišnjem preživljenju nakon postavljene dijagnoze iz EURO CARE-5 studije, u Hrvatskoj ono iznosi 39 % i nešto je više od europskog prosjeka (37,6 %). Znatno je niže od petogodišnjeg preživljenja za rak dojke koje iznosi gotovo 80 % što je dokaz napretka liječenja raka dojke (18).

1.5. Čimbenici rizika

Čimbenici rizika su brojni: uključuju životnu dob, menopauzalni status, reproduktivne čimbenike, hormonalni status, upalne ginekološke bolesti, okolišne čimbenike, izloženost štetnim tvarima, životne navike i genetsko nasljeđe. S obzirom na nepoznatu patogenezu nastanka raka jajnika, te činjenici da bolest nastaje bez kliničkih simptoma kroz dug vremenski period bolest se javlja najčešće u starijoj životnoj dobi. Incidencija raka jajnika najviša je nakon 65 godine života, u postmenopauzi (19).

Reproduktivni čimbenici koji se ubrajaju u rizične čimbenike su: dobivanje menstruacije u ranoj životnoj dobi (20), kasna menopauza (21). Ginekološke bolesti kao policistični jajnici, endometrioza (22), upalne bolesti zdjelice ubrajaju se u čimbenike rizika (23).

Od okolišnih čimbenika najčešće su štetne životne navike koje se povezuju sa većom smrtnosti općenito, kao što su: visok indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*, BMI) (24), izostanak fizičke aktivnosti, profesionalna izloženost toksičnim tvarima npr. azbestu (25), ali i svakodnevna uporaba pudera za intimnu higijenu na bazi talka (26). Od štetnih navika svih

oboljelih izdvaja se pušenje cigareta iznad 10 cigareta dnevno (27), te se navodi da je rizik dva puta viši za pušače u usporedbi s nepušačima, osobito za mucinozni tip tumora jajnika (28).

Suprotno, rizik od raka jajnika znatno smanjuje kod onih stanja koja dovode do anovulacije, kao što su: trudnoća, oralna hormonska kontracepcija i dojenje (gonadotropinska teorija nastanka raka jajnika) (29).

1.6. Genetsko nasljeđe kao čimbenik rizika

Razlikujemo tri odvojena obiteljska sindroma s povećanim rizikom nastanka karcinoma jajnika: nasljedni, po sijelu specifični karcinom jajnika, zatim nasljedni karcinom dojka/jajnik (povezan s mutacijom tumorskih gena *BRCA1* i *BRCA2*) i obiteljski sindrom, Lynch sindrom osobit po pojavi nepolipoznog karcinoma crijeva i rektuma, karcinoma endometrija i karcinoma jajnika. Od nasljednih čimbenika glavnu ulogu imaju mutacije gena: *BRCA1* (17q12-21 krak kromosoma) i *BRCA2* (13q12-13 krak kromosoma). *BRCA1* djeluje kao centralni protein u održavanju genomske stabilnosti, popravku deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA), kontroli staničnog ciklusa, modeliranju kromatina, regulaciji transkripcije i ubikvitinacije proteina. Protein *BRCA2* uključen je u popravak jednolančanih i dvolančanih lomova DNA te sudjeluje u citokinezi. Promjene u *BRCA1* i *BRCA2* klasificiraju se na patogene (mutacije), normalne varijante (polimorfizme) ili varijante nepoznatog značaja. Putem analize haplotipa dokazano je da su geni *BRCA1* i *BRCA2* udruženi s genetskom predispozicijom nastanka i karcinoma jajnika i karcinoma dojke. Od ostalih istraženih gena važni su geni *TP53* (tumor supresorski gen: p53 ima kritičnu ulogu u kontroli staničnog rasta i održavanju genetske stabilnosti), geni koji sudjeluju u popravku krivo sparenih baza *MLH1* (engl. *mutL homolog 1*) i *MLH2* (engl. *mutL homolog 2*), geni odgovorni za popravak krivo sparenih baza (engl. *mismatch repair*, MMR), geni uključeni u popravak dvolančane DNA (engl. *double stranded break*, DSB popravak). Važna je i mutacija *K-ras* (engl. *Kirsten rat sarcoma virus*) i *BRAF* (engl. *v-rafmurine sarcoma viral oncogene homolog B1*), *CTNNB1* (engl. *cadherin-associated protein beta 1*) i *PTEN* (engl. *phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase*) (30).

S obzirom na navedeno, promijenila se i klasifikacija raka jajnika koja se temelji na molekularnim i genetičkim promjenama, sa ciljem individualnog pristupa u terapiji.

1.7. Biologija tumora i patogeneza

Kao u svim tumorima, i kod raka jajnika dolazi do nagomilavanja genetskih promjena koje početnim neoplastičnim stanicama daju svojstva neograničenog, autonomnog rasta i otpornosti na normalne homeostatske mehanizme u stanici. Abnormalni rast i zloćudnost ima glavno obilježje nepostojanje mehanizama kontrole rasta, diferencijacije i proliferacije, uz invazivnost i metastaziranje ulaskom u krvotok ili u limfu. Molekularni mehanizmi u stanici ovisno o potrebi dozvoljavaju sintezu DNA i dijeljenje stanica, a čine ih transkripcijski čimbenici smješteni u jezgri zbog aktivacije cijele kaskade brojnih gena koji potiču i inhibiraju stanični ciklus (ciklini i proteini ovisni o ciklinu, produkt gena retinoblastoma, p-53 kao produkt tumor-supresorskog gena, antigen Ki-67 i sl.). Važnu ulogu ima i programirana smrt stanice ili apoptoza, kao odgovor na aktivaciju specifičnih gena. Komponenta upale smatra se važnim mehanizmom u karcinogenezi raka jajnika jer dolazi do lučenja niza medijatora i stimulatora: kemokina, citokina, pogotovo interleukina-6 i interleukina-8, čimbenik nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*, TNF) (31). Kronični upalni procesi kao što je endometriozna, kronične upalne bolesti zdjelice, ali i virusne i bakterijske infekcije navode se kao čimbenici rizika za nastanak raka jajnika. Važan je i mikrookoliš koji prima signale iz tumorskog mikrookruženja. Mikrookruženje sadrži mnoge stanice uključujući leukocite i fibroblaste, koji odgovaraju na proupalne citokine i izlučuju vlastite citokine, što može proizvesti mnoge učinke: promicanje kemorezistencije, otpornost na apoptozu, invaziju, angiogenezu prekomjernom ekspresijom VEGF-a i promicanje metastatskog rasta na udaljenim mjestima (32).

Međutim, sama patogeneza nastanka bolesti nije jasno definirana i nejasna je. Postoje nekoliko hipoteza koje nisu prihvaćene u cijelosti. Najstarija je hipoteza neprestanih ovulacija koju je prvi postavio Fathalla i suradnici (33), a to je da ovulacija i ponovno obnavljanje površinskog epitela jajnika za vrijeme ovulacije, tokom reproduktivnog razdoblja žene, može uzrokovati nastanak raka jajnika. Prilikom ovulacije dolazi do oštećenja epitela, upalnih reakcija i obnavljanja, invaginacije u stromu jajnika i stvaranja inkluzionih cista odnosno događa se remodelacija tkiva. U procesu reparacije, pod utjecajem lokalnih čimbenika i moguće steroidnih hormona, dolazi do proliferacije i maligne transformacije epitela. Svaka ovulacija dovodi do strukturnog oštećenja epitela površine jajnika te svaka nova dioba epitelnih stanica nosi rizik mutacije pri replikaciji DNA. Histološka raznovrsnost raka jajnika objašnjava se sposobnošću metaplazije pokrovnog epitela u različite histološke tipove, na čemu se temelji histopatološka podjela raka jajnika.

S obzirom na heterogenost podtipova raka jajnika prema trenutnim spoznajama, aktualna je druga hipoteza nastanka raka jajnika. Većina primarnih karcinoma jajnika kao i primarnih karcinoma peritoneuma zapravo su metastatski tumori, odnosno epitelni tumori koji potječu iz epitela jajovoda, što je potvrđeno studijama gdje prekursorska lezija jajovoda morfološki i molekularno odgovaraju epitelnom karcinomu (34). Primarno mjesto nastanka je epitel jajovoda građen od sekretornih i cilijarnih stanica koje kad su izložene upalnim citokinima formiraju tzv. stanice seroznog intraepitelnog karcinoma jajovoda (engl. *serous tubal intraepithelial carcinoma*, STIC). Takve ponavljajuće genotoksične promjene uzorkuju proliferaciju stanica s oštećenjima DNA i inducira mutaciju *p-53* što dovodi do klonalne ekspanzije stanica sa tzv. „p-53 potpisom“. Kako se takve stanice ljušte i prenose do jajnika tamo nastaje tumor koji se transformira u epitelni karcinom jajnika (35).

1.8. Klasifikacija tumora jajnika

Točna histološka klasifikacija ključ je za ispravno određivanje vrste raka jajnika i, sukladno tome, izbor najprikladnijeg liječenja. Histološka klasifikacija tumora jajnika prikazana je na Slika 1. Uvažavajući molekularno-genetičke promjene Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*, WHO) klasifikacija iz 2014. prihvatila je dualistički model patohistološke klasifikacije epitelnog raka jajnika koji dijeli bolest na tip 1 i 2 (36). U tip 1 tumora ubrajaju se serozni karcinom niskog histološkog gradusa, endometrioidni karcinom niskog histološkog gradusa, jasnostanični karcinom i mucinozni tumori. Glavna karakteristika je slaba proliferacija, mogu se dijagnosticirati u ranom stadiju i imaju dobru prognozu. U tip 2 ubrajaju se serozni karcinomi histološkog visokog gradusa, endometrioidni karcinomi visokog histološkog gradusa, nediferencirani karcinomi i karcinosarkom. Svaki histološki tip tumora jajnika i stupanj diferenciranosti stanica je povezan s određenim molekularno-genetičkim promjenama što prikazuje Slika 1. Serozni tip tumora nastaje zbog mutacije *p53*, disfunkcije *BRCA1* i *BRCA2*, te postupno zbog mutacija *K-ras* i *BRAF*. Endometrioidni tip tumora nastaje također zbog mutacija *p53* i disfunkcije *BRCA1* i *BRCA2*, ali i mutacijama u *CTNNB1* i *PTEN*, a mucinozni uslijed mutacija u *K-ras*. Tumorske stanice s blagom do umjerenom staničnom atipijom te niskom mitotskom aktivnošću klasificiraju se kao tumori niskog stupnja zloćudnosti, dok stanice sa teškom staničnom atipijom i visokom mitotskom aktivnošću spadaju u tumore visokog stupnja zloćudnosti.

1. Epitelni tumori	<ul style="list-style-type: none"> • Benigni tumori: cistadenom i papilarni cistadenom, površinski papilom, adenofibrom i cistadenofibrom • Tumori granične malignosti (niskog zloćudnog potencijala): cistični tumor i papilarni cistični tumor, površinski papilarni tumor, adenofibrom i cistadenofibrom • Maligni tumori: adenokarcinom, papilarni adenokarcinom i papilarni cistadenokarcinom, površinski papilarni adenokarcinom, adenokarcinofibrom i cistadenokarcinofibrom
2. Mucinozni tumori, endocervikalni i intestinalni tipovi	<ul style="list-style-type: none"> • Benigni tumori: cistadenom, adenofibrom i cistadenofibrom • Tumori granične malignosti (niskog zloćudnog potencijala): cistični tumor, adenofibrom i cistadenofibrom • Maligni tumori: adenokarcinom i cistadenofibrom, adenokarcinofibrom i cistadenokarcinofibrom
3. Endometrioidni tumori	<ul style="list-style-type: none"> • Benigni tumori: cistadenom, cistadenom sa skvamoznom diferencijacijom, adenofibrom i cistadenofibrom, adenofibrom i cistadenofibrom sa skvamoznom diferencijacijom • Tumori granične malignosti (niskog zloćudnog potencijala): cistični tumor, cistični tumor sa skvamoznom diferencijacijom, adenofibrom i cistadenofibrom, adenofibrom i cistadenofibrom sa skvamoznom diferencijacijom • Maligni tumori: adenokarcinom i cistadenokarcinom, adenokarcinom i cistadenokarcinom sa skvamoznom diferencijacijom, adenokarcinofibrom i cistadenokarcinofibrom, adenokarcinofibrom i cistadenokarcinofibrom sa skvamoznom diferencijacijom
4. Epitelno-stromalni i stromalni tumori	<ul style="list-style-type: none"> • 1. Adenosarkom, homologni i heterologni • 2. Mezodermalni (Mullerov) miješani tumor (karcinosarkom), homologni i heterologni • 3. Stromalni sarkom • 4. Jasnostanični tumor • Benigni tumori: cistadenom, adenofibrom i cistadenofibrom • Tumori granične malignosti (niskog zloćudnog potencijala): cistični tumor, adenofibrom i cistadenofibrom • Maligni tumori: adenokarcinom, adenokarcinofibrom i cistadenokarcinofibrom
5. Tumori prijelaznih stanica	<ul style="list-style-type: none"> • Brennerov tumor • Brennerov tumor granične malignosti (proliferirajući) • Maligni Brennerov tumor • Karcinom prijelaznih stanica (tip koji nije Brenner)
6. Tumori skvamoznih stanica	
7. Mješoviti epitelni tumori (specifični tipovi)	<ul style="list-style-type: none"> • Benigni tumori • Tumori granične malignosti (niskog malignog potencijala) • Maligni tumori
8. Nediferencirani karcinom	

Slika 1. Histološka podjela tumora jajnika

Dualistički model klasifikacije epitelnog raka jajnika s prekursorским lezijama i najčešćim mutacijama gena prikazan je u Tablica 1.

Tablica 1. Prikaz prekursorских lezija, najčešćih mutacija gena i kromosomske nestabilnosti u tipu 1 i tipu 2 raka jajnika (preuzeto i prilagođeno iz (37))

Tip tumora	Prekursorska lezija*	Najčešće mutacije gena	Kromosomska nestabilnost [#]
Tip 1			
Serozni karcinomi niskog histološkog gradusa	APST, MPSC	KRAS, BRAF	niska
Endometrioidni karcinomi niskog histološkog gradusa	endometrioza	CTNNB1, PTEN	niska
Jasnostanični karcinomi	endometrioza	PIK3CA	niska
Mucinozni	APMT	KRAS	niska
Tip 2			
Serozni karcinomi visokog histološkog gradusa	nepoznata (STIC)	TP53	visoka
Endometrioidni karcinomi visokog histološkog gradusa	nepoznata	TP53	visoka
Nediferencirani karcinomi	nepoznata	nepoznato	nepoznato
Karcinosarkom	nepoznata	TP53	nepoznato

Trenutno peto izdanje SZO klasifikacije tumora ženskih spolnih organa iz 2020. navodi pet glavnih tipova karcinoma jajnika: serozni karcinom visokog stupnja koji je najčešći 70 % (engl. *high grade serous carcinoma*), serozni karcinom niskog stupnja (engl. *low-grade serous carcinoma*), mucinozni karcinom, endometrioidni karcinom i karcinom svijetlih stanica. Budući da histotipovi proizlaze iz različitih stanica prema podrijetlu, dokazani je imunohistokemijski panel specifičan za svaki podtip te onkogene promjene potvrđuju morfološku dijagnozu (38).

1.9. FIGO klasifikacija

Najčešće korištena klasifikacija raka jajnika je FIGO klasifikacija temeljena na histopatohistološkoj i kirurškoj procijeni. FIGO klasifikacija iz 2014. godine obuhvaća uz rak jajnika, rak jajovoda, potrbušnice, i zloćudne tumore zametnih stanica i zloćudne tumore specijalizirane strome jajnika. Svrha FIGO klasifikacije je dvostruka: osigurati standardnu terminologiju koja omogućuje usporedbu pacijenata između pojedinih centara za liječenje i svrstavanje u prognostičke grupe koje zahtijevaju različite specifične načine liječenja, u prvom redu kirurškim liječenjem. Točno utvrđivanje stupnja proširenosti bolesti ključan je korak koji

usmjerava sve daljnje odluke oko kliničkog tretmana pojedine pacijentice. Važni čimbenici koji utječu na tijek i ishod bolesti su osim toga histološki podtip tumora te njegov histološki gradus. Također je prognostički značajno odrediti poslijeoperacijsku rezidualnu bolest. Stupanj preživljenja najviše ovisi o FIGO stadiju bolesti u trenutku dijagnoze. Svaki stadij (I-IV) razgraničen je u podstadije (A-C) ovisno o zahvaćenosti jednog ili oba jajnika, proširenosti na zdjelicu, jajovod, maternicu, abdomen i zahvaćenosti limfnih čvorova, te dokazanosti malignih stanica citološkom dijagnostikom, te pojavom ascitesa te presadnica u drugim organima. Smatra se da stadiji I i II predstavljaju ranu fazu bolesti, a III i IV uznapredovali stadij bolesti. U stadiju I tumor je ograničen na jajnik ili jajovod. U I A stadiju tumor je ograničen na jedan jajnik ili jajovod, ali je kapsula intaktna i nema tumora na njihovim površinama, a citološkom obradom nema dokazanih tumorskih stanica u ascitesu ili peritonealnom ispirku. U I B stadiju tumor je ograničen na oba jajnika (kapsula intaktna) ili jajovoda, nema tumora na njihovim površinama i nema dokazanih tumorskih stanica u ascitesu ili peritonealnom ispirku. U I C stadiju tumor je ograničen na jedan ili oba jajnika ili jajovoda uz sljedeće značajke: IC1 ruptura je zbog kirurškog rasapa, u IC2 već je rupturirana kapsula prije kirurškog zahvata ili tumor na površini jajnika ili jajovoda, a u IC3 pojavljuju se maligne stanice u ascitesu ili peritonealnom ispirku. U stadiju II A i II B tumor infiltrira jedan ili oba jajnika ili jajovoda uz zdjeličnu lokalnu infiltraciju, sa zahvaćanjem i/ili implantacijom uterusa ili jajovoda i/ili jajnika, te je moguće zahvaćanje ostalih zdjeličnih intraperitonealnih tkiva. U stadiju III tumor zahvaća jedan ili oba jajnika ili jajovoda, ili se radi o primarnom peritonealnom karcinomu, uz citološko ili histološko dokazano peritonealno širenje van zdjelice i/ili prisutne presadnice u retroperitonealne limfne čvorove. U stadiju III A pozitivan je isključivo retroperitonealni limfni čvor (histološki ili citološki potvrđen), uz dokazane presadnice do 10 mm u najvećem promjeru što odgovara III A1, a ako je presadnica > 10 mm u najvećem promjeru tada se radi o III A2 stadiju. Mikroskopski ekstrapelvični peritonealni implantati sa ili bez pozitivnih retroperitonealnih limfnih čvorova javljaju se u III B, dok u III C mikroskopski ekstrapelvični peritonealni implantati < 2 cm sa ili bez pozitivnih retroperitonealnih limfnih čvorova, te makroskopski ekstrapelvični peritonealni implantati > 2 cm sa ili bez pozitivnih retroperitonealnih limfnih čvorova (uključuje zahvaćanje jetrene te kapsule slezene bez infiltracije parenhima ijednog organa). Stadij IV uključuje udaljene presadnice isključujući peritonealne presadnice, s podjelom da stadij IV A uključuje pojavu pleuranog izljeva sa pozitivnom citologijom, dok IV B parenhimalne presadnice te presadnice u ekstraabdominalne organe (uključujući ingvinalne limfne čvorove te limfne čvorove izvan abdominalne šupljine).

2. TUMORSKI BILJEZI

Tumorski biljezi, općenito, su molekule koje se u većim koncentracijama, nego što je normalno, pojavljuju u krvi, mokraći i/ili tkivu bolesnika s određenim vrstama karcinoma. Tumorski biljezi su proizvodi samog karcinoma ili imunološkog sustava kao odgovora na prisutnost karcinoma (enzimi, specifični proteini, različiti antigeni, hormoni, onkogeni ali i specifični receptori i sl.). Tumorski biljezi nisu povišeni kod svake osobe koja boluje od karcinoma, osobito u ranim stadijima bolesti. Također nisu ni specifični za jedan poseban oblik karcinoma već mogu biti povišeni kod više vrsta zloćudnih bolesti. Tumorski biljezi mogu biti povišeni i kod osoba s određenim dobroćudnim stanjima. Zbog toga tumorske biljege treba razmatrati zajedno sa drugim kliničkim i laboratorijskim testovima jer niti jedan tumorski biljeg nije idealan sa 100 %-tnom dijagnostičkom specifičnošću i 100 %-tnom dijagnostičkom osjetljivošću. Idealan serumski tumorski biljeg za probir ima dovoljnu specifičnost i osjetljivost da postigne pozitivnu prediktivnu vrijednost (PPV) od 10 % analogno 1 dijagnosticiranom raku od 10 pozitivnih rezultata testa. Zbog niske prevalencije raka jajnika, jedina strategija koja se može primijeniti za prilagodbu osjetljivosti i specifičnosti testa je promjena granične točke (engl. *cut-off*). Općenito, tek tada tumorski biljezi postaju klinički značajni nakon točnog predviđanja bolesti u fazama probira, liječenja i praćenja liječenja. Da bi bio od koristi u kliničkoj praksi tumorski biljeg bi trebao imati određene karakteristike: 95 %-tna specifičnost i najmanje 50 %-tna osjetljivost i korelacija s tumorskom masom.

2.1. Ugljikohidratni antigen 125 (CA 125)

Ugljikohidratni antigen CA 125 (engl. *carbohydrate antigen 125*) je unazad tridesetak godina najkorišteniji test koji se određuje u serumu u području ginekološke onkologije, a koristan u dijagnostici raka jajnika. Ugljikohidratni antigen 125 ili CA 125 naziva se i mucin 16 ili MUC16. Produkt je istoimenog *MUC16* gena koji je smješten na kromosomu 9 krak p13,2 u ljudskom genomu (39). To je transmembranski glikoprotein, jedinstven po svojoj veličini molekularne težine 2,353,428 Da. Zbog položaja kroz membranu stanica CA 125 ima višestruku funkciju. Pružajući se kroz membranu stanica CA 125 se sastoji od tri glavne podjedinice: N-terminalne podjedinice, velike ponavljajuće podjedinice koja sadržava 60 ponavljajućih regija od 156 aminokiselina (SEA jedinice) i karboksilne C-podjedinice. Velika N-terminalna podjedinica i velika ponavljajuća podjedinica visoko su glikozilirane oligosaharidima vezanim O- i N-glikoziliranim vezama. C-podjedinica je transmembranski

usidrena s kratkim citoplazmatskim repom (31 aminokiselina), a bogata je serinom, treoninom i tirozinom koji predstavljaju potencijalna mjesta za fosforilizaciju. Proces fosforilzacije na mjestu citoplazmatskog repa pod utjecajem je epidermalnog čimbenika rasta ili tirozin kinaze i ključan zbog stvaranja heterodimera i aktiviranja različitih signalnih puteva u stanici. Također, taj proces je povezan sa sekrecijom same molekule CA 125 koja posljedično biva pojačana zato što CA 125 sadržava tzv. ERM (engl. *ezrin/radixin/moesin*) domenu na c-podjedinici tj. mjesto za vezanje proteina koji utječu na citoskelet stanice. Velika podjedinica na koju su vezani glikozilirani ostatci smještena je vanstanično i pruža funkciju hidracije i lubrikacije epitela te služi kao zaštitna barijera s antiadhezivnim svojstvima, dok mala unutarstanična podjedinica, tj. C-podjedinica ili citoplazmatski rep aktivira različite stanične putove (40). CA 125 je prisutan u epitelu različitih sluznica i do sada nije utvrđena točna funkcija same molekule CA 125. Općenito, mucini imaju fiziološku ulogu u lubrikaciji i održavanju hidracije staničnog epitela, tj. vlažnosti i na taj način prirodno štite od ozljeda i upala. Mucini imaju važnu ulogu u obnovi i diferencijaciji epitela u modulaciji stanične adhezije i stanične signalizacije i imunosupresije. Mucini imaju pojačanu ekspresiju i promjene u glikozilaciji u mnogim karcinomima npr. dojke, pluća, želuca, raka debelog crijeva, gušterače, cerviksa i raka jajnika (41). Takve promjenjene glikozilirane forme mogu dovesti do novih, patoloških kombinacija različitih mucina te rezultiraju ogromnom prednošću za stanice tumora koje se za ligande na staničnim receptorima, a na taj način tumorske stanice postižu invazivnost i posljedično stvaranje presadnica (42). Predložene funkcije MUC16 u stanicama raka su različite: a) proliferacija stanica raka nakon interakcije s Jak-kinazom 2 (JAK2), posredujući aktivatorom transkripcije 3 (STAT3) i c-Jun fosforilacijom. Zaustavljanje G2/M događa se u uvjetima utišanog *MUC16*. b) abnormalni metabolizam stanica raka putem regulacije transportera glukoze i aldolaze, koji utječe na sintezu glikogena i proteina aktiviranjem receptora epidermalnog čimbenika rasta (EGFR) i njegovih nizvodnih efektor fosfoinozimid 3-kinaza/protein kinaza B/glikogen sintaza kinaza 3 beta (PI3K/AKT/GSK3 β); c) Poticanje migracije stanica raka, invazije i presadnica putem interakcije s mezotelinom, E-/L-selektinom i inhibicijom razgradnje β -katenina; d) imunološkom izbjegavanju/supresija stanica raka blokadom interakcija tumor-imunološke stanice i inhibicijom stanične citotoksičnosti ovisne o antitijelima, citotoksičnosti ovisne o komplementu i citolitičkih funkcija imunoloških stanica (Charkhchi, i dr., 2020).

CA 125 otkriven je kao antigen na monoklonsko protutijelo OC125 (43) nakon imunizacije miša s OVCA 433 staničnom linijom koja je dobivena od pacijentica sa uznapredovalim

epitelnim rakom jajnika. Analitički test za detekciju CA 125, komercijaliziran je 1983. godine imao je OC 125 antitijelo za vezivanje i mjerenje. Danas se koristi unaprijeđen i dopunjen test druge generacije (CA 125II) koji sadrži dva antigenska mjesta, za koja se vežu monoklonska antitijela OC125 i M11, a rutinske metode su enzimski imuno test (EIA), kemiluminiscentni imunotest s mikročesticama (CMIA).

CA 125 ima graničnu vrijednost 35 U/mL u serumu. Povišene vrijednosti iznad granične vrijednosti mogu se naći u 1-2 % zdravih osoba u fiziološkim stanjima poput: folikularna faza menstrualnog ciklusa ili prvo tromjesečje trudnoće (44). Povišene vrijednosti iznad granične vrijednosti nađene su i u tijeku menstruacije stoga određivanje CA 125 i interpretacija nalaza CA 125 u tijeku menstrualnog krvarenja nije preporučljiva (45). Niz benignih ginekoloških stanja također povećava razine CA 125, kao što su kao što su endometrioza, funkcionalne ciste jajnika, upala zdjelice (46) i hiperstimulacija jajnika (47). Nadalje, neginekološka stanja također su povezana s povišenim koncentracijama CA 125 (ciroza, kolitis, dijabetes, bubrežna bolest, tuberkuloza, sarkoidoza i nodozni poliartritis). Povišene vrijednosti CA 125 nađene su žena s drugim malignitetima koje nemaju podrijetlo u jajniku, npr. rak dojke, pluća, debelog crijeva, gušterače, želuca, bilijarnog trakt, cerviks, maternica i jajovod, te endometroidni karcinom. Dakle, CA 125 je široko rasprostranjen u organizmu i nije specifičan za pojedini organ, što mu je glavni nedostatak. Slaba specifičnost, odnosno veliki broj lažno pozitivnih rezultata, zbog uzroka upalne etiologije u abdomenu kao i bolesti nemaligne prirode, može biti uzrokom u fluktuaciji vrijednosti CA 125 (48). Sa stanovišta interferencija, tj. prisustvo heterofilnih protutijela koja mogu biti prisutna u pacijentica ako je parenteralnim putem dobivaju terapiju monoklonskim protutijelima i na njih stvaraju protutijela (endogeno stvaranje protutijela) mogu utjecati na rezultate CA 125. Od ostalih čimbenika koji imaju utjecaj je važno proteklo vrijeme od operacije do vremena vađenja krvi koje je, ako je prekratko, može biti uzrokom povišenih vrijednosti jer je potrebno i deset dana nakon operacijskog zahvata da vrijednost padne na polovicu. Jednostrana ooforektomija i histeroskopija značajno snižava vrijednosti CA 125 u serumu.

Novija istraživanja dokazuju da zdrave, predmenopauzalne žene imaju više vrijednosti nego postmenopauzalne žene, odnosno da vrijednost CA 125 pada s životnom dobi (49).

Povišene vrijednosti CA 125 nađene su u oko 50 % pacijentica u ranoj fazi raka jajnika, koje nisu imale vidljive simptome bolesti (50). Problem čini upravo rana faza bolesti, za detekciju ili probir gdje CA 125 ima lažno negativne rezultate te takve pacijentice ne dobivaju prikladno liječenje. Daljnjim istraživanjem potvrđeno je da je osjetljivost povezana sa stadijima bolesti (I

50-70 %, II 70-90 %, III i IV > 90 %) i s histološkim tipom (51). Tako se povišene vrijednosti CA 125 mjere u mucinoznim i tumorima s ograničenim zloćudnim potencijalom (52).

U cilju bolje diferencijacije benignih od malignih tumora jajnika, napredak je napravljen razvijanjem potencijalnih multimodalnih kombinacija vrijednosti serumskog CA 125 i ultrazvučnih tehnika. Stoga otkriće indeksa malignosti (engl. *Risk of Malignancy Indeks*, RMI) pokazalo se izuzetno korisnim. RMI je bodovni sustav multimodalnog tipa, dobiven iz umnoška vrijednosti CA 125, menopauzalnog statusa i ultrazvučnog bodovnog sustava temeljenog na karakteristikama adneksalne tvorbe. Takva kombinacija tri najbitnija klinička elementa u procjeni zloćudnosti čine ga vrlo korisnom metodom i nalazi se u kliničkim smjernicama (53). Ukoliko bodovanjem procijenimo da se radi o srednjem ili visokom riziku na malignitet, pacijenticu svakako treba uputiti ginekološkom onkologu. Nedostaci testa su što niska vrijednost CA 125 u ranom stadiju karcinoma ili pak lažno povišena u predmenopauzi značajno umanjuje senzitivnost i specifičnost RMI. Kombinacija ultrazvuka i CA 125 preporuča se u svrhu razlikovanja razlikovanja zloćudne od dobroćudnih tumora, pogotovo u grupi postmenopauzalnih žena. Serumske vrijednosti CA 125 iznad 95 U/mL u postmenopauzalnih žena mogu razlikovati zloćudne od dobroćudnih tumora u zdjelici s pozitivnom prediktivnom vrijednošću od 95 % (54). Što se tiče predmenopauzalnih žena u EGTM preporukama iz 2016. godine navodi se mišljenje Američkog udruženja obstetričara i ginekologa da je za ultrazvukom potvrđen nalaz nepoznate mase u zdjelici i vrijednosti CA 125 iznad 200 U/mL potrebno konzultirati ginekologa u specijaliziranim ustanovama (7).

Razina CA 125 također se može koristiti za procjenu odgovora pacijenta na kemoterapiju i operacije i liječenja. Očekuje se da će razine u serumu pasti za pola unutar 10 dana od kirurškog zahvata (55). Poslijeoperacijske razine koreliraju s rezidualnom masom tumora i imaju značajnu vrijednost, što je prediktivno za preživljenje (56,57).

Što se tiče prognostičkog značaja CA 125, ako se usporedi petogodišnje preživljenje i predoperacijska vrijednost u EGTM preporukama navodi se granična vrijednost od 65 U/mL, stoga više vrijednosti od navedene imaju lošiji prognostički značaj bez obzira vrstu kirurškog liječenja i vještinu kirurga. Osim predoperacijskog prognostičkog značaja, CA 125 ima i poslijeoperacijski prognostički značaj nakon kirurškog zahvata i tijekom prva tri ciklusa primarne kemoterapije. Također, preporuka je da promjena niza vrijednosti CA 125 jest prognostički indikator odgovora na terapiju na način da niz povišenih vrijednosti CA 125 upozoravaju na rast tumora. Poželjno je da opadanje CA 125 vrijednosti iznosi najmanje 50 % vrijednosti mjerene prije kirurškog zahvata. Stoga CA 125 ostaje u preporukama svih

strukovnih udruženja kao nezaobilazni tumorski biljeg primjenjiv u prognozi, praćenju terapije i kao indikator povratka bolesti. To znači u praksi, stvarna korist od CA 125 leži u praćenju odgovora na terapiju i predviđanju prognoze pacijentica oboljelih od karcinoma jajnika. U diferenciranju primarnog od metastatskog karcinoma jajnika koristi se kombinacija CA 125 s tumorskim biljegom karcinoembrionalnim antigenom (CEA). CEA je biljeg čiju vrijednost očekujemo povišenu u mucinoznim tumorima najčešće gastrointestinalnog podrijetla, no i podrijetla jajnika, dojke, štitnjače i pluća. Pri interpretaciji treba uzeti u obzir i brojna benigna stanja ga povisuju (pušenje, ciroza, kolecistitis, pankreatitis, infekcije i sl.).

2.2. Humani epididimalni protein 4 (HE4)

Humani epididimalni protein 4 HE4 (engl. *human epididymal protein 4*) je protein 13 kDa, sastoji se od jednog visoko glikoziranog peptidnog lanaca od 124 aminokiselina sa dvije WFDC domene (engl. *WAP four-disulfide core domain*). WFDC domena sadržava konzervirani niz od pedesetak aminokiselina i osam cisteinskih ostataka koji međusobno tvore četiri disulfidna mosta. Zrela, glikozilirana forma proteina od 25 kDa nalazi se u citoplazmi stanica i predstavlja HE4 kojeg nalazimo u cirkulaciji. Zbog takve građe HE4 se ubraja u skupinu inhibitora serinskih i treoninskih proteaza, obitelj WAP (engl. *whey acidic protein*) ili WFDC proteina, pa je poznat i kao WFDC 2 protein. Kirhoff i sur. prvi opisuje karakterističnu građu WAP motiva (58). Danas je poznato da gen *WFDC2* koji kodira protein HE4 smješten je na kromosomu 20 (20q12-13), u neposrednoj blizini regije s 20 ostalih gena koji imaju dokazanu ulogu u karcinogenezi i progresiji tumora (59), a njihova amplifikacija je osobito izražena u karcinomu dojke i jajnika (60). HE4 izlučuje se kao glikoprotein u krvotok i djeluje kao inhibitor proteaze, inhibirajući serin, aspartil i cistein proteaze; međutim njegova točna funkcija ostaje nepoznata.

WFDC domena može stvoriti strukturu „omče“ ili engl. „*loop*“ koja se veže za aktivno mjesto i inhibira serinsku proteazu slično kao i ostali predstavnici obitelji WFDC proteina. Zbog sličnosti u građi predstavnicima obitelji WFDC proteina i koja je kodirana spomenutom regijom gena, pretpostavlja se da HE4 zahvaljujući ima sličnu antiproteaznu funkciju i sudjeluje i u zaštiti imunosti, osobito u dišnom i reproduktivnom sustavu zbog protuupalnog i antimikrobnog djelovanja na gram-negativne bakterije i viruse. Stoga je razumljivo da je HE4 citoplazmatski protein fiziološki prisutan u stanicama epitela reproduktivnog i dišnog sustava i muškaraca i žena (61). Tkivni HE4 ekspresiran je u epitelu epididimusa (Kirchhoff i suradnici, otkriće 1991.

godine) kod muškaraca, a kod žena u glandularnom epitelu dojki i u reproduktivnom sustavu. U reproduktivnim organima žena izrazita ekspresija HE4 dokazana je u endometriju, jajovodu i bartolinijevoj žlijezdi. Nasuprot tomu, površina jajnika, žuto tijelo i primarne oociste bile su negativne na imunohistokemijsko bojanje na HE4 (62). Prekretnica u istraživanjima bilo je kvantificiranje izrazito visoke ekspresije HE4 u tkivu epitelnog i endometrioidnog karcinoma jajnika visokog histološkog gradusa kao i u adenokarcinomu pluća (63).

Istodobno, počela se istraživati upotreba serumskog HE4 kao tumorskog biljega za karcinom jajnika (64) i da je HE4 rjeđe pozitivan u nemaliglnim bolestima i kao takav korisniji od CA 125 u razlikovanju benignih od malignih tumora. Sukladno tome, odabrana je granična vrijednost za HE4 koja je ispravno klasificirala 24 od 30 slučajeva kasnog stadija epitelnog karcinoma jajnika (uz 80 % dijagnostičku osjetljivost), dok je HE4 pogrešno klasificirao samo 3 od 65 slučajeva (95 % dijagnostička specifičnost). U usporedbi s normalnim, fiziološki nepromijenjenim epitelom jajnika, u kojem ne postoji ekspresija HE4. Time se otvara niz ispitivanja dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti serumskog HE4 u usporedbi s tradicionalno korištenim CA 125, odnosno njihove kombinacije za predikciju epitelnog karcinoma jajnika za koju je dokazan pozitivitet. Početna istraživanja s HE4 pokazala su se obećavajuća; u usporedbi s CA 125 ovaj biljeg je pokazivao veći stupanj osjetljivosti i manji udio lažno pozitivnih rezultata u diferencijaciji benignih i malignih tumora jajnika.

Moore je objavio niz radova koji su koristili kombinaciju CA 125, HE4 i menopauzalnog statusa za predviđanje prisutnosti malignog tumora jajnika. Izvorno je procijenjeno devet potencijalnih biobiljega u serumu, od kojih je HE4 bio najučinkovitiji u otkrivanju raka jajnika. Ispitao se panel biobiljega i otkrio da kombinacija biljega HE4 i CA 125 daje najveću osjetljivost od različitih kombinacija tumorskih biljega i povećava osjetljivost CA 125. Kada je CA 125 kombiniran s HE4, osjetljivost za otkrivanje epitelnog raka jajnika od 76,4 % uz specifičnost od 95 % (65). Naknadno ista grupa istraživača provela je multicentrično prospektivno istraživanje koje je uključivalo 531 ispitanicu s dijagnosticiranom masom u zdjelici koja je podvrgnuta operaciji. Skupina u postmenopauzi sadržavala je 150 benignih tumora kojih je 112 klasificirano kao niski rizik dajući specifičnost od 75,0 % (95 % CI 66,9–81,4), te 111 tumora epitelnog karcinoma jajnika i 6 tumora niskog zloćudnog potencijala od kojih je 108 klasificirano kao visokorizični tip što daje osjetljivost od 92,3 % (95 % CI = 85,9–96,4). Predmenopauzalna skupina imala je 202 benigna slučaja od kojih je 151 klasificiran kao nizak rizik koji daje specifičnost od 74,8 % (95 % CI = 68,2-80,6), te 18 epitelnih karcinoma jajnika i 16 tumora niskog zloćudnog potencijala od kojih je 26 klasificirano kao visokorizični,

pružajući osjetljivost od 76,5 % (95 % CI = 58,8–89,3). Time je dobiven dokaz da je algoritam koji koristi HE4 i CA125 uspješno klasificirao pacijente u skupine visokog i niskog rizika s 93,8 % točnošću za epitelni karcinom jajnika tj. prepoznao je visokorizičnu grupu (66). Tako se uočilo da je menopauzalni status značajan čimbenik, odnosno da je HE4 korisniji za predmenopauzalne pacijentice. HE4 je odobren kao tumorski biljeg za epitelni karcinom jajnika od strane FDA 2009. godine.

Moore i sur. su 2012. istražili osim menopauzalnog statusa i utjecaj životne dobi te ustanovili dobne kategorije: do 30 godina, 30-39 godina, iznad 40 godina za predmenopauzalnu podgrupu, a za 60, 60-69, 70-79 i iznad 80 godina za postmenopauzalnu grupu (67). Uočeno je da vrijednosti HE4 rastu s godinama života (68).

Od okolišnih čimbenika, utjecaj pušenja koji slično kao i za CEA povisuje vrijednosti HE4 u serumu kao i utjecaj pušenja cigareta koji povisuje rezultate za 29 % što se može pripisati čimbeniku upale koja je prisutna u stanicama epitela dišnog sustava kod pušača gdje se HE4 i fiziološki nalazi. Ista grupa autora istražila je vrijednosti HE4 u serumu kod zdravih trudnica. Vrijednosti HE4 bile su statistički značajno niže u sva tri trimestra trudnoće. Anastasi i sur. istražili su utjecaj menstrualnog ciklusa i HE4 vrijednosti u serumu. Otkrili su da postoji fluktuacija HE4 u serumu u ovulacijskoj fazi u usporedbi s folikularnom fazom i luteinskom fazom u žena mlađih od 35 godina, ali nema značajne razlike u žena starijih od 35 godina (69).

Istraživan je utjecaj i debljine gdje je viši BMI povezan s nižim vrijednostima HE4 u serumu. To se objašnjava s povezanošću s endokrinim i metaboličkim promjenama i utjecaju na laboratorijske rezultate (68).

Primijećena je i pozitivna povezanost HE4 i kreatinina koji, iako fiziološki raste s godinama života, ali kreatinin ujedno može biti pokazatelj poremećaja bubrežne funkcije. U novijim istraživanjima je i dijagnostička značajnost HE4 u pacijenata s bubrežnom disfunkcijom. Nagy i suradnici 2012. godine istraživao je povišene vrijednosti HE4 i te smanjene funkcije bubrega te je dokazao pozitivnu povezanost viših vrijednosti HE4 i različitih stupnjeva kronične bubrežne bolesti. Rezultati ukazuju da HE4 u serumu raste već u početnom stupnju (stadij I i II), a značajno kod osoba s uznapredovalim poremećajem rada bubrega (stadij III i IV) (70). Stoga interpretacija povišenih vrijednosti HE4 u serumu mora biti razmatrana s oprezom, ako je bubrežna funkcija narušena. Zbog svoje veličine od 25 kDa HE4 lako prolazi bubrežni prag i može se mjeriti u mokraći (71). Najnovija istraživanja usmjerena su na istraživanje dijagnostičke značajnosti HE4 kao novog biobiljega u pacijenata s akutnom i kroničnom

disfunkcijom bubrega u usporedbi s rutinskim parametrima poput ureje, kreatinina, eGFR (engl. *estimated glomerular filtration rate*) i cistatina c ako se isključi epitelni rak jajnika (72).

Ispitivane su vrijednosti HE4 u benignim ginekološkim bolestima u kojima HE4 nije značajno povišen, za razliku od uobičajeno korištenog CA 125. Primjer za to je endometrioza koja ima incidenciju od 5-10 % u žena reproduktivne dobi. Endometrioza je ubrojena u benigne ginekološke bolesti, za nju nema specifičnog tumorskog biljega, ali predstavlja čimbenik rizika za malignu transformaciju zbog čimbenika upale koji mijenja i fiziološku funkciju jajnika. Često je prisutna pojačana angiogeneza, vaskularizacija, proliferacija stanica, te može voditi u malignu transformaciju tj. atipična glandularna hipreplazija endometrija je prekanceroza i progredira u karcinom u 23 % slučajeva. Ispitivanjem dijagnostičke osjetljivosti CA 125 i HE4 dokazana je uloga HE4 kao obećavajućeg serumskog biljega za endometrioidni karcinom: za razliku od CA 125 koji zadržava vrijednosti unutar referentnog intervala, HE4 pokazuje umjereni porast, pogotovo u ranoj fazi bolesti (stadij I i II), ipak ne toliko visokih vrijednosti kao u karcinomu jajnika.

2.3. ROMA indeks

ROMA indeks temelji se na izmjerenim vrijednostima HE4 i CA 125 u serumu tj. kombinaciji njihovih, izmjerenih vrijednosti i menopauzalnog statusa, svrstavajući pacijentice u grupu niskog ili visokog rizika za karcinom jajnika. Ovisno o menopauzalnom statusu, vrijednost ROMA indeksa računa se različito za predmenopauzalne i postmenopauzalne pacijentice, a granične vrijednosti koje su odabrane ovise o metodi koju koristi određeni proizvođač.

Upotreba različitih imunokemijskih metoda, te posljedično tomu i različite granične vrijednosti za svrstavanje pacijentica u grupe niskog i visokog rizika za rak jajnika (73).

Moore i sur. prvi je upotrijebio izračun ROMA indeksa 2009. godine, a u upotrebi je službeno od 2011. godine (74). ROMA indeks se izračunava temeljem eksponencijalnih vrijednosti prediktivnih indeksa (PI). Prediktivni indeksi se različito izračunavaju za predmenopauzalnu skupinu i postmenopauzalnu skupinu.

ROMA indeks izračunava se na temelju prediktivnog indeksa (PI) prema formuli:

$$\text{premenopauzalna skupina PI} = -12,0 + 2,38 \times \ln[\text{HE4}] + 0,0626 \times \ln[\text{CA 125}]$$

$$\text{postmenopauzalna skupina PI} = -8,09 + 1,04 \times \ln[\text{HE4}] + 0,732 \times \ln[\text{CA 125}]$$

LN..... prirodni algoritam

HE4..... koncentracija tumorskog biljega HE4

CA 125..... koncentracija tumorskog biljega CA 125

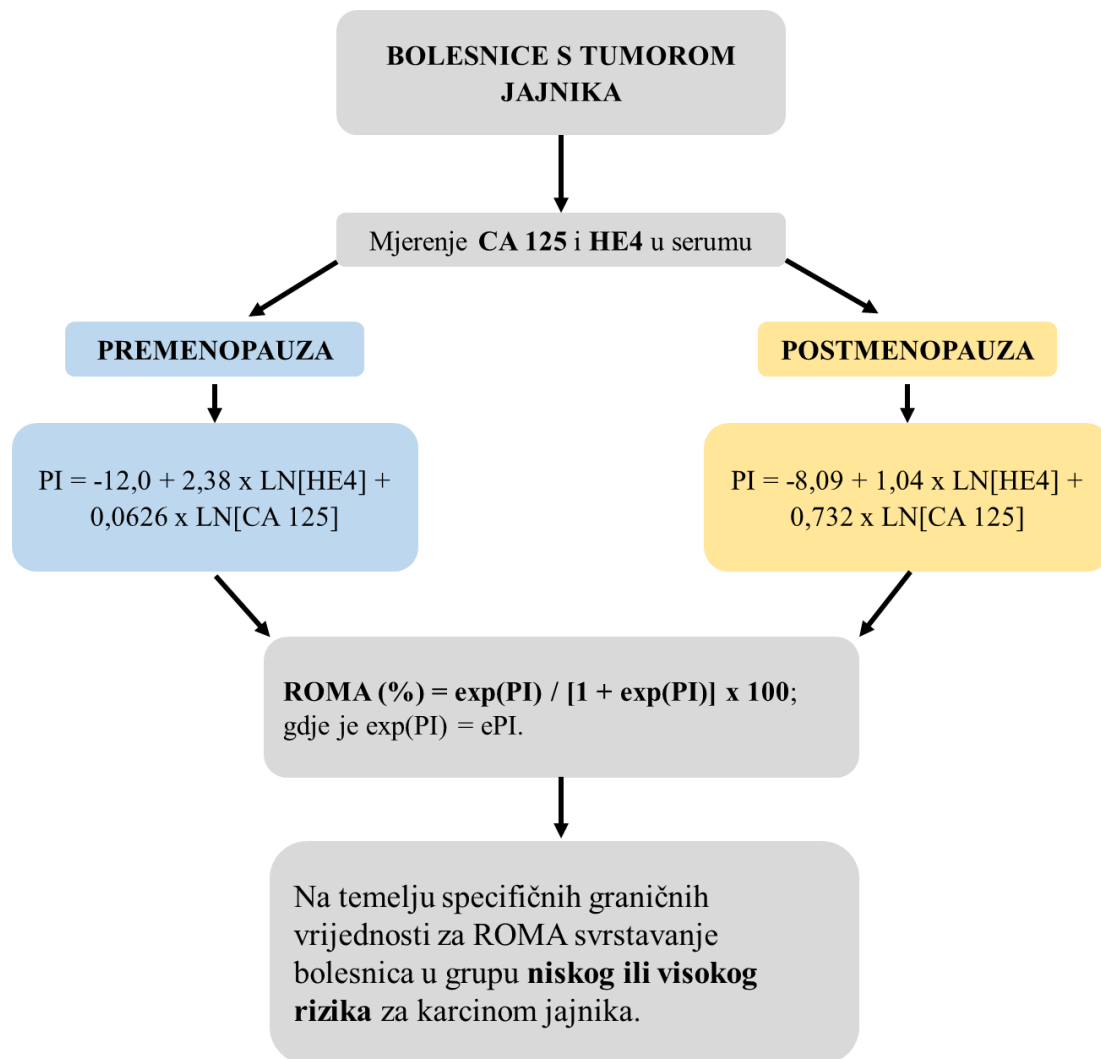
Izračun vrijednosti ROMA indeksa:

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

PI..... prediktivni indeks

e..... eksponent (Eulerov broj)

Na Slika 2 prikazan je postupak kako treba diferencirati bolesnice s tumorom jajnika i izračunavati ROMA indeks ovisno o menopazualnom statusu (predmenopauza, postmenopauza). 2011. godine odobrena je upotreba ROMA indeksa u svrhu razlikovanja benignih od zloćudnih tumora jer svrstava pacijentice u grupu niskog ili visokog rizika, ali uz napomenu da se ROMA indeks ne smije samostalno koristiti u svrhu probira. ROMA indeks namijenjen je bolesnicama koje ispunjavaju sljedeće kriterije: da su starije od 18 godina, da imaju indikaciju kirurškog liječenja, da interpretacija rezultata ROMA indeksa mora biti usklađena s kliničkim ispitivanjima i rezultatima nezavisnih radioloških ispitivanja. ROMA indeks ne smije se koristiti kao nezavisan test kod trudnica, pacijentica liječenih od drugih tumorskih bolesti i tijekom kemoterapije i dokazan je utjecaj reumatoidnih faktora u koncentraciji većoj od 250 U/mL u serumu, jer mogu utjecati na rezultate.



Slika 2. Diferencijacija bolesnica s tumorom jajnika i izračun ROMA indeksa ovisno o menopauzalnom statusu.

2.4. Ki-67

Proliferacija stanica je proces koji ima važnu ulogu u agresivnosti tumora i kliničkim osobinama podtipova raka jajnika. Nekontrolirana je proliferacija glavno obilježje karcinoma općenito. Određivanje proliferacijske aktivnosti stanica ima važnu dijagnostičku i prognostičku značajnost i zato su korištene različite metode za određivanje broja proliferiranih stanica (75). Najčešće se određuje imunohistokemijskim metodama korištenjem monoklonskog antitijela specifičnog za Ki-67, antitijelo koristi se Mindbomb E3 ubikvitin protein ligaza 1 (MIB-1 antitijelo), metodom protočne citometrije, brojanjem stanica u mitozu i sl.

Antigen Ki-67 je protein smješten u jezgri eukariotskih stanica dokazano je povezan sa staničnom proliferacijom. Antigen Ki-67, zvan i Ki-67 ili MKI 67 je protein koji postoji u dvije

izoforme proteina molekularne težine 345 i 395 kDa, vrlo kratkog poluživota oko 1-1,5 sata, a kodiran MKI 67 genom smještenim na kromosomu 10 (10q25) (76). Otkrio ga je Scholzer i Gerdes ranih osamdesetih godina. Povezan je s ribosomalnom RNA transkripcijom. Njegova inhibicija rezultira inhibicijom sinteze ribosomalne RNA. Ki-67 prisutan je u svim aktivnim fazama staničnog ciklusa (G1, S, G2 i mitozu), a odsutan je u fazi mirovanja stanice (G0). Najviše vrijednosti Ki-67 nađene su na početku M faze, pa polako padaju tijekom anafaze i telofaze (77). Regulacija je postignuta različitim izvršnim molekulama. Fosforilacija Ki-67 putem kompleksa ciklinB/Cdc 2 kinaze ili ciklin ovisne kinaze 1 (CDK1): Cdc2 je protein-kinaza, a ciklin B je regulatorna podjedinica koja je potrebna za katalitičko djelovanje Cdc2 što je ključan korak koji kontrolira ulazak stanice u mitozu (78). Za procjenu malignih lezija tj. određivanje proliferacije malignih stanica u rutinskoj praksi koristi se imunohistokemijsko određivanje.

Ki-67 predstavlja pouzdani prognostički indeks (PI), jer postotak Ki-67 pozitivnih tumorskih stanica korelira s kliničkim tijekom bolesti. Osobito je koristan u karcinomima dojke, gdje je procjena postotka pozitivnih tumorskih stanica na nuklearni antigen Ki-67 je rutinski korištena metoda, te predstavlja neizostavni dio patohistološke dijagnostike (79). Potencijalna korist ovog određivanja uključuje prognozu, procjenu odgovora ili rezistencije na kemoterapiju. Procjena postotka pozitivnih tumorskih stanica na nuklearni antigen Ki-67 je rutinski korištena metoda, te predstavlja neizostavni dio patohistološke dijagnostike. Potencijalna korist ovog određivanja uključuje prognozu, procjenu odgovora ili rezistencije na kemoterapiju. Najčešće korišteni primjeri su karcinomi prostate, mozga i dojke kao i nefroblastomili endokrinu terapiju, procjenu rezidualnog rizika u pacijenata na standardnoj terapiji. Ki-67 za karcinom jajnika rutinski se ne određuje, već se ubraja u grupu mogućih prediktivnih biobiljega za rak jajnika.

Istraživanja koja su se bavila ekspresijom Ki-67 u različitim podtipovima, histološkim gradusima tumora, te slaganjem s FIGO klasifikacijom raka jajnika potvrđuju visoku ekspresiju Ki-67 u malignim tumorima te slaganje sa agresivnošću podtipova tumora. Sylvia i sur. dokazali su najvišu ekspresiju u malignim (prosječni PI = $48,6 \pm 26,76$), zatim u tumorima s niskim zloćudnim potencijalom pa najnižu u benignim tumorima (80). U malignoj skupini, podskupina epitelnog karcinoma jajnika imala je visok indeks, zatim endometroidna, a najniža ekspresija bila je u mucinoznoj podskupini (81).

2.5. Tumorski biljezi za karcinom jajnika u fazi istraživanja

Otkako je 2001. prvi put postignuto sekvenciranje cijelog ljudskog genoma, tehnologija genoma dovela je do poboljšanja u dijagnozi raka i odabiru liječenja. Vjeruje se da je rak posljedica promjena u genima, okolišnih čimbenika ili njihove kombinacije. Identificirano je više potencijalnih biljega za rak jajnika, no samo za nekoliko biljega je utvrđeno da su prediktivni. Najviše istraživanja usmjerena su na molekule s ulogom u popravku oštećenja DNK kao i replikacijskom stresu, onkogenoj signalizaciji i angiogenezi. Prema najnovijim podacima dokazivanje *BRCA 1/2* mutacije i mutacije vezane uz nedostatak homologne rekombinacije (HRD) ima najvišu razinu dokaza. U istu skupinu ubraja se i nedostatak popravka neusklađenosti (engl. *mismatch repair deficiency*), povratna mutacija *BRCA1/2* (engl. *tumor BRCA1/2 reversion mutations*), *KRAS/NRAS/HRAS* mutacije *RAS* gena, mutacijsko opterećenje tumora (engl. *tumour mutational burden*), *BRCA1* metilacija (engl. *BRCA1 methylation*), patogene varijante gena *RAD* tj. *RAD51C/D* mutacija, amplifikacija ciklina E (engl. *CCNE1 amplification*) (82).

Male molekule, kao što su cirkulirajuća mikroRNA omogućuju neinvazivno otkrivanje mutacija raka jajnika. Aberantne ekspresije mikroRNA, osobito Let-7 i miR-200 obitelj mikroRNA uključene su u razvoj raka jajnika. Do sada je poznato preko 2500 mikroRNA. Novi postupci analize kao sekvenciranje slijedeće generacije (engl. *next generation sequencing*, NGS) sve više zamjenjuje konvencionalne tehnike poput testiranja samo jednog gena, i omogućuju analiziranje stotina gena ili cijelog genoma.

Tekuća biopsija neinvazivan je i ponovljiv postupak uzimanja periferne krvi iz koje se specifičnim metodama izoliraju cirkulirajuća tumorska DNA (ctDNA) (83), cirkulirajuće tumorske stanice (CTC) (84), egzosomi (85) i vezikulne strukture podrijetlom iz tumorskih stanica. Navedeni tumorski elementi prisutni u cirkulaciji sadrže genska, RNA i proteinska obilježja tumorskih stanica, dakle potentne biopokazatelje (gene, RNA, proteine) koji zrcale molekulska događanja u tumorskim stanicama i kao takvi mogu poslužiti u dijagnozi, predviđanju terapijskog odgovora i procjeni ishoda bolesti.

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Rak jajnika vodeći je uzrok smrti žena s ginekološkim malignitetima u Republici Hrvatskoj. U fokusu niza istraživanja u bolesnica s rakom jajnika je humani epididimalni protein (HE4), boljeg dijagnostičkog i prognostičkog potencijala od ugljikohidratnog antigena 125, biljega uobičajenog u onkologiji. Cilj predloženog istraživanja jest utvrditi prognostički značaj serumskog HE4 uz određivanje ekspresije HE4 i čimbenika proliferacije antigena Ki-67 u tkivu bolesnica s benignim i malignim tumorima jajnika. Ispitivanjem dijagnostičke specifičnosti i osjetljivosti HE4 u serumu bolesnica s prisutnom masom u zdjelici nepoznate etiologije te izračunom granične vrijednosti ROMA indeksa poboljšala bi se učinkovitost predoperacijskoj diferencijaciji bolesnica s rakom jajnika i benignih ginekoloških bolesti.

4. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Hipoteze ovog doktorskog rada su:

1. Koncentracija HE4 u serumu i izražaj u tkivu imaju prognostički značaj kod raka jajnika.
2. Koncentracija HE4 u serumu i ekspresija u tkivu odražavaju patohistološki tip i stadij bolesti.
3. Ekspresija Ki-67 u tkivu odražava agresivnost pojedinih tipova tumora.
4. Podudarnost HE4 i ROMA indeksa s FIGO klasifikacijom može ukazivati na proširenost bolesti, odnosno mogu biti korisni su predoperacijskoj diferencijaciji bolesnica s tumorima jajnika.

5. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U okviru ovog doktorskog rada postavljeni su sljedeći ciljevi:

1. Odrediti koncentraciju HE4 i CA 125 u serumu bolesnica u različitim stadijima bolesti i izračunati ROMA indeks.
2. Odrediti ekspresiju HE4 u tkivu bolesnica u različitim stadijima bolesti i patohistološkim tipovima.
3. Procijeniti klinički značaj serumske koncentracije HE4 usporedbom s ekspresijom HE4 u tkivu sa stadijem bolesti i patohistološkim tipovima.
4. Odrediti ekspresiju Ki-67 u tumorskom tkivu jajnika i procijeniti njegov klinički značaj usporedbom s patohistološkim tipovima i stadijem bolesti te ROMA indeksom.

6. MATERIJALI I METODE

Istraživanje je provedeno je u Odjelu za medicinsku biokemiju u onkologiji u Klinici za tumore Centra za maligne bolesti, KBC Sestre milosrdnice. Odobrilo ga je Etičko povjerenstvo KBC Sestre milosrdnice 26. rujna 2016.godine, a Povjerenstvo za etičnost eksperimentalnoga rada Farmaceutsko-biokemijskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu početkom 2017. godine kada se započelo sa istraživanjem.

Istraživanje je provedeno u suradnji s Odjelom za ginekološko-onkološku kirurgiju Zavoda za kiruršku onkologiju u Klinici za tumore Centra za maligne bolesti i Kliničkog zavoda za patologiju "Ljudevit Jurak", KBC Sestre milosrdnice.

6.1. Kriterij odabira ispitanica

Ispitanice su bile uključene u istraživanje ako su imale dokazanu adneksalnu masu u zdjelici nepoznate etiologije i indikaciju liječenja kirurškim putem. Kriterij isključivanja iz istraživanja je postojanje maligne bolesti neginekološkog podrijetla, prethodno primljena neoadjuvantna terapija, obostrano kirurško uklanjanje jajnika i/ili jajovoda, trudnoća, te postojanje drugih jetrenih i bubrežnih bolesti. Evidentirani su sljedeći opći podaci ispitanica: prezime i ime, datum rođenja, adresa stanovanja, matični broj pri upisu u bolnicu, uputna (kirurška) dijagnoza, postojeći komordibiteti, pušački status, hospitalizacija u proteklih godinu dana. Svakoj ispitanici uključenoj u istraživanje odredio se menopauzalni status (predmenopauza, postmenopauza) temeljem kriterija: kod ispitanica kod kojih je prošlo više od 12 mjeseci od posljednje menstruacije i životna dob viša od 50 godina. Ispitanice koje su prethodno imale histerektomiju, smatralo se da su u menopauzi.

U istraživanje su bile uključene samo one ispitanice koje su dobrovoljno pristale sudjelovati u istraživanju i potpisale obrazac Informiranog pristanka. Svakoj ispitanici detaljno se objasnio svrha, tip i tijek istraživanja.

6.2. Tijek istraživanja

U istraživanje je uključeno 159 ispitanica koje su bile podvrgnute kirurškom liječenju (laparotomija, laparoskopija) tumora nepoznatog podrijetla u zdjelici od strane ginekologa-onkologa iz Odjela za ginekološko-onkološku kirurgiju pri Zavodu za kiruršku onkologiju u

Klinici za tumore Centra za maligne bolesti, KBC Sestre milosrdnice. Ispitanicama je uzeta detaljna opća i ginekološka anamneza (godine starosti, trajanje menopauze, paritet, simptomatologija, korištenje oralnih kontraceptiva ili hormonske supstitucije) pri pregledu ginekologa-onkologa. Svim ispitanicama napravljen je ginekološki pregled i UZV dijagnostika te je zbog ustanovljene mase u zdjelici nepoznate etiologije indicirano kirurško liječenje. U Odjelu za ginekološko-onkološku kirurgiju pri Zavodu za kiruršku onkologiju u Klinici za tumore, KBC Sestre milosrdnice, svakoj ispitanici uzorkovana je venska krv u volumenu od 5 mL u svrhu dobivanja uzorka seruma neposredno prije kirurškog zahvata.

Analiza uzoraka seruma ispitanica napravljena je u Odjelu za medicinsku biokemiju u onkologiji u Klinici za tumore Centra za maligne bolesti, KBC Sestre milosrdnice. Izmjerile su se serumske vrijednosti tumorskih biljega HE4 i CA 125, te biokemijske pretrage ureja i kreatinin. Razlog mjerenja ureje i kreatinina bio je isključivanje bubrežnog zatajenja koje može biti uzrokom lažno povišenih vrijednosti tumorskog biljega HE4. Za svaku ispitanicu izračunao se ROMA indeks nakon svrstavanja prema menopauzalnom statusu ispitanica, a prema formulama za predmenopauzu i postmenopauzu. Dobiveni rezultati korišteni su za ispitivanje dijagnostičkog potencijala sva tri parametra ispitivanja: CA 125, HE4 i ROMA indeksa.

6.3. Skupine ispitanica

Ispitanice su bile podijeljene temeljem dva kriterija. Jedan kriterij je menopauzalni status ispitanica. Zbog pravilnog izračuna ROMA indeksa ispitanice su svrstane u dvije glavne skupine: predmenopauzalna skupina (57 ispitanica) i postmenopauzalna skupina (102 ispitanice).

Drugi kriterij podjele bio je patohistološki nalaz. Temeljem njega formirane skupine ispitanica: skupina s epitelnim karcinomom jajnika ili tzv. zloćudni tumori (38 ispitanica), skupina s tumorima niskog malignog potencijala ili *borderline* tumori (14 ispitanica), skupina s benignim tumorima ili tzv. benigni tumori (51 ispitanica), skupina presadnica (12 ispitanica) i skupina s tzv. tumorima sličnih lezija (engl. *tumor-like lesions*, TLL) koja je poslužila kao kontrolna grupa, a obuhvaća jednostavne ciste, hemoragične ciste (23 ispitanica), njih ukupno 140 ispitanica. U Kliničkom zavodu za patologiju "Ljudevit Jurak" KBC Sestre milosrdnice, Klinike za tumore Centra za maligne bolesti napravljena je patohistološka analiza tumorskog tkiva dobivenog nakon kirurškog zahvata. Ti uzorci obrađeni su standardnom histološkom

metodom koja uključuje fiksaciju tkiva u 10 % puferiranom formalinu i uklapanje u parafinske blokove, te su potom rezani na debljinu od 5 μ m, deparafinizirani i bojeni standardnom metodom hemalaun-eozin. Pregledom kliničkog patologa dobiven je nalaz u kojem je tumorsko tkivo bilo okarakterizirano kao benigno, niskog malignog potencijala ili maligno. Određen je histološki tip i stupanj diferenciranosti tumora. Također je opisano postojanje mikroinvazije, procjena statusa limfnih čvorova, postojanje ascitesa, zahvaćenost jajovoda, omentuma, postojanje rezidualnog tumora i presadnica. Temeljem tih podataka odredio se stadij bolesti svrstavanjem u pojedine stupnjeve FIGO klasifikacije (stupanj I-IV): karcinomi jajnika ograničeni na jajnike (FIGO stadij I), karcinomi jajnika prošireni na organe male zdjelice (FIGO stadij II), karcinomi jajnika sa peritonealnim presadnicama (FIGO stadij III) i karcinomi jajnika sa udaljenim presadnicama (FIGO stadij IV).

Naknadno, za iz arhiviranih uzoraka deparafiniranih rezova tumorskog tkiva imunohistokemijskim postupkom odredila se ekspresija tkivnog biljega HE4 i antigena Ki-67. Za uzorke, njih 140 ukupno, za koje je materijal bio dostupan, koristila su se monoklonska protutijela specifična za tkivni HE4 i antigen Ki-67 (detaljnije opisano na stranici 34). Za 19 uzoraka deparafiniranih rezova tumorskog tkiva analiza nije uspjela tehničkom izvedbom ili materijal nije pronađen u arhivi.

6.4. Uzorkovanje krvi za analize

Uzorak seruma dobiven je venepunkcijom krvi u epruvete Vacuette (Vacuette Tube, Cat Serum Clot Activator, Greiner Bio-One) koje sadrže gel separator u volumenu od 5 ml bez antikoagulansa. Primarni uzorak se centrifugirao 10 min na 3500 okr/min u centrifugi (Rotofix 32A, Hettich Zentrifugen, Germany), 30 min nakon venepunkcije. Nakon centrifugiranja uzorak se obilježavao bar-code naljepnicom koja kreirana iz upisa podataka ispitanica u Laboratorijski informacijski sustav KLINLAB, Samson Informatika, te je analiza napravljena unutar 4 sata od vađenja krvi iz primarne epruvete. Uzorak je bio prihvatljiv za analizu prema preporukama proizvođača tvrtke Roche: nema utjecaja ikterije do koncentracije bilirubina < 1130 μ mol/L za HE4 i CA 125, hemolize ako je koncentracija hemoglobina < 0,621 mmol/L kod određivanja HE4, a < 2 mmol/L za određivanje CA 125, lipemije ako je koncentracija triglicerida < 2 mmol/L za HE4 i CA 125, te biotina ako je koncentracija (< 205 nmol/L za HE4 i < 143 nmol/L za CA 125).

6.5. Principi metoda mjerenja određivanih analita

Metoda mjerenja je elektrokemiluminiscencija (engl. *electrochemiluminescence*, ECLIA) i jednaka je za oba analita, CA 125 i HE4. Metoda se zasniva na mjerenju kemiluminiscentne emisije nakon nekoliko reakcija. U prvoj inkubaciji dolazi do stvaranja kompleksa mjerenog analita, odnosno antigena iz uzorka seruma i monoklonskog antitijela (za CA 125 ili za HE4) obilježenog biotinom i antitijela obilježenog kompleksom rutenija.

Nakon prve inkubacije dodajemo streptavidinom presvučene mikročestice te se smjesa ponovno inkubira. Nastali kompleks veže se na mikročestice zbog reakcije vezanja biotina i streptavidina. Nakon druge inkubacije reakcijska smjesa se usiše u mjernu komoru (cijev za mjerenje), gdje se mikročestice vežu na magnet, odnosno površinu elektrode. Nevezane supstance se uklone pomoću otopine za ispiranje. Nakon primjene napona na elektrodu, nastaje kemiluminiscentna reakcija između tripropilamina iz otopine za ispiranje i kompleksa rutenija, koja dovodi do emisije svjetla, koju mjeri fotomultiplikator. Nastala količina svjetla proporcionalna je koncentraciji analita u uzorku. Vrijeme trajanja mjerenja je 18 minuta.

Za mjerenje CA 125 i HE4 koristile su se automatizirane imunokemijske metode na analizatoru Cobas e 411 (engl. *Immunoassay analyzer Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany*). Reagens za HE4 i CA 125 dolaze u obliku kompleta i stavljaju se u analizator pomoću čitanja putem crtičnih kodova reagensa (engl. *bar-code*) otisnutim na reagensima. Reagensi (M, R1, R2) uključeni su u komplet reagensa spremni su za uporabu u obliku kazeta. Mikročestice se moraju miješati ručno prije uporabe. Reagens HE4 i CA 125 stabilan je na analizatoru stabilnost je 6 tjedana, odnosno 12 tjedana nakon otvaranja ako se čuva u hladnjaku.

Na automatiziranom sustavu reagensi su se umjeravali postupkom kalibracije (HE4 CalSet i CA125 II CalSet). Metoda određivanja HE4 je standardizirana prema HE4 EIA testu od Fujerebio Dijagnostics, a metoda određivanja CA 125 sljediva je do RIA testa od Fujerebio Dijagnostics. Rezultati se dobivaju pomoću kalibracijske krivulje koju sustav generira iz kalibracije u dvije točke i glavne krivulje. Kalibracija se ponavljala nakon 8 tjedana ako se radilo o istoj seriji reagensa u slučaju CA 125, a nakon 12 tjedana u slučaju HE4. Iznimno kalibracija se mora ponoviti u slučaju da kontrola kvalitete ne zadovoljava.

Preciznost i točnost sustava provjeravala se kontrolnim uzorcima u dvije razine (normalnoj: za HE4, PreciControl HE4 1, a za CA 125, PreciControl Tumor Marker 1) i patološkoj, (za HE4, PreciControl HE4 2, a za CA 125, PreciControl Tumor Marker 2), naizmjenice svakoga radnoga dana ujutro prije analitičkog postupka.

Volumen uzorka potreban za analizu je 10 μL za HE4 i 20 μL za CA 125. Linearnost metode za HE4 iznosi 15-1500 pmol/L, a za CA 125 je 0,6-5000 U/mL. Za HE4 linearnost vrijedi 15,0-1500 pmol/L (definirano granicom detekcije i maksimumom glavne krivulje). Vrijednosti ispod granice detekcije označene su kao $< 15,0$ pmol/L. Vrijednosti iznad raspona mjerenja označene su kao > 1500 pmol/L (ili do 30 000 pmol/L za uzorke razrijeđene faktorom 20). CA 125 ima linearnost mjerenja 0,600-5000 U/mL (definirano donjom granicom detekcije i maksimalnom glavne krivulje). Vrijednosti ispod donje granice detekcije označene su kao $< 0,600$ U/mL. Vrijednosti iznad raspona mjerenja označene su kao > 5000 U/mL ili razrijeđen faktorom 5 do 25000 U/mL. Izmjerene vrijednosti HE4 izražene su u mjernim jedinicama pmol/L, a koncentracija CA 125 U/mL. Za HE4 koristile su se odgovarajuće granične vrijednosti prema preporukama proizvođača ovisno o životnoj dobi, a preuzete od proizvođača Roche (86). Izmjerene vrijednosti HE4 izražene su u mjernim jedinicama pmol/L, a koncentracija CA 125 U/mL. Granične vrijednosti za HE4 su < 70 pmol/L za predmenopauzalne, a < 140 pmol/L za postmenopauzalne. Za CA 125 granične vrijednosti < 35 U/mL. Za HE4 koriste se dobne granice jer je primijećeno da se vrijednosti HE4 razlikuju sa životnom dobi.

Matematički algoritam za određivanje rizika od raka jajnika ili ROMA indeks izračunao se po formulama opisanim u Uvodu, stranica 22. Ispitanice su se diferencirale ovisno o menopauzalnom statusu kao što je prikazano na Slici 2, stranica 23. Za ROMA indeks koristile su se granične vrijednosti prema preporukama proizvođača kako bi se osigurala razina specifičnosti od 75 % (vrijednost za predmenopauzalne žene ROMA $\geq 11,4$ % upućuje na visoki rizik; ROMA $< 11,4$ % upućuje na nizak rizik; kod žena u postmenopauzi ROMA vrijednosti $\geq 29,9$ % upućuje na visoki rizik, a ROMA $< 29,9$ % upućuje na nizak rizik od pronalaženja epitelnih karcinoma jajnika).

6.6. Principi patohistološke dijagnostike

Za imunohistokemijsku analizu HE4 i Ki-67 koristili su se deparafinirani i demaskirani rezovi tumorskoga tkiva tretirani pet minuta 3 %-nim vodikovim peroksidom kako bi se inhibirale endogene peroksidaze. Nakon ispiranja puferom preparati su bili tretirani primarnim protutijelima. Za detekciju čimbenika proliferacije Ki-67, koristilo se mišje protuljudsko monoklonsko protutijelo (Ki-67, kat. br. M7240, Dako, Glostrup, Danska), a za određivanje HE4 monoklonsko protutijelo (AntiHE4 antibody, kat.br. ab200828, klon EPR16658, Abcam, Velika Britanija). Nakon inkubacije i ispiranja, nastali kompleks antigena i antitijela tretirao se

s EnVision™ FLEX /HRP detekcijskim reagensom (EnVision Flex, High pH sustav; kat. br. K8010, Dako, Danska). Specifična reakcija antigena i protutijela je vizualizirana s DAB kromogenom. Pozadinskim bojanjem preparata s hematoksilinom i kontrastnim plavim obojenjem vizualizirale su se strukture i morfologija tkiva. Bojanje preparata provodilo se u automatiziranom Dako Autostainer uređaju (Dako, Danska). Rezultati imunohistokemijske analize izražene su semikvantitativnom metodom kao postotak imunoreaktivnih stanica određen na 1000 tumorskih stanica: 0 – negativna reakcija, nema obojenja; 1 – slabo pozitivna reakcija, do 10 % pozitivnih stanica; 2 – srednje pozitivna reakcija, 10 % - 50 % pozitivnih stanica; 3 – jako pozitivna reakcija, više od 50 % pozitivnih stanica pod svjetlosnim mikroskopom pod povećanjem 400 puta, a prema procijeni patologa.

6.7. Analiza protoka i volumena tumora u skupinama prema patohistološkom tipu bolesti

Parametri protoka i volumena tumora bili su dostupni iz bolničkog informacijskog sustava Wemis. Dobiveni su tehnikom pretrage transvaginalnog 3D ultrazvuka uz obojeni i pulsirajući dopler kojim se pomoću zvučnih valova visoke frekvencije mjeri smjer i brzina protoka krvi u krvnim žilama jajnika (a. i v. ovarica). Iako tumorske žile potječu od krvnih žila domaćina, njihova organizacija može biti potpuno drukčija, ovisna o tipu tumora, njegovu smještaju i brzini rasta. Volumen tumora računao se po formuli $V = 0,52 \times \text{duljina} \times \text{visina} \times \text{širina}$, identičnoj kao u biometriji jajnika. Protoci krvi analizirali su se prema zapisima pulsirajućeg doplera koji se uobičajeno analiziraju s pomoću dvaju standardnih indeksa: indeksa otpora i indeksa pulsatilnosti. Maligni tumori znatno su bolje prokrvljeni od benignih, pokazuju znatno intenzivniju prokrvljenost u solidnim i središnjim dijelovima lezije, imaju snižen otpor protoku zbog abnormalne građe stijenki krvnih žila, te velike brzine protoka (87).

6.8. Statistička obrada

Priprema podataka izvršena je pomoću računalnog tabličnog kalkulatora Microsoft Office Excel. Podaci su prikazani tablično i grafički. Kolmogorov-Smirnovljevim testom analizirana je raspodjela kontinuiranih numeričkih vrijednosti te su se shodno dobivenim podacima primijenili odgovarajući neparametrijski testovi. Kategorijske i nominalne vrijednosti su prikazane kroz odgovarajuće frekvencije i udjele, dok su se razlike između njih analizirale X^2 testom odnosno Fisherovim egzaktnim testom kada je broj ispitanika po podskupini bio manji

od 5. Kontinuirane vrijednosti prikazane su kroz medijane i interkvartilne raspone, a razlike između njih analizirane Kruskal-Wallisovim testom s dodatnom post-hoc analizom Mann-Whitneyjevim U testom. Načinjeni dijagrami brkate kutije unutar kojih su prikazane vrijednosti medijana, interkvartilnih raspona, minimalnih i maksimalnih vrijednosti te stršćih vrijednosti (engl. *outliers*) koje se od medijana razlikuju za više od 1,5 standardne devijacije (SD) (*), tj. ekstremnih stršćih vrijednosti koje se od medijana razlikuju za više od 3 SD (°). Povezanost kliničkog značaja ekspresije i serumske koncentracije HE4, Ki-67 i ROMA indeksa s FIGO klasifikacijom kao i procjena kliničkog značaja serumske koncentracije HE4 usporedbom s ekspresijom HE4 u tkivu sa stadijem bolesti analizirana je Spearmanovim koeficijentom korelacije ranga. Interpretacija rezultata analize povezanosti temeljena je na radu (88) (Tablica 2).

Tablica 2. Kriteriji za interpretaciju korelacijskog koeficijenta dobivenog analizom povezanosti

Koeficijent korelacije	Interpretacija
0,76-1,00	Izvrсна povezanost
0,51-0,75	Umjerená povezanost
0,26-0,50	Slaba povezanost
0,00-0,25	Nema povezanosti

U analizi se koristila programska podrška IBM SPSS Statistics, verzija 25.0 (<https://www.ibm.com/analytics/spss-statistics-software>). Dijagnostička točnost serumskog HE4, CA 125 i ROMA indeksa određena je na temelju različitih kvantitativnih pokazatelja dobivenih obradom podataka u statističkom programu MedCalc 17.6 (Mariakereke, Belgija): površina ispod krivulje (engl. *area under the curve*, AUC) dobivena ROC analizom (engl. *receiver operating characteristic curves*), dijagnostička osjetljivost i specifičnost, omjeri vjerojatnosti (LR; engl. *likelihood ratio*), pozitivna i negativna prediktivna vrijednost. P vrijednosti manje od 0,05 smatrane su statistički značajnima.

7. REZULTATI

7.1. Analiza raspodjele ispitanica prema patohistološkim tipovima bolesti prema menopauzalnom statusu ispitanica

U Tablica 3 prikazan je apsolutni broj ispitanica u skupinama predmenopauza i postmenopauza kao i njihov relativni udio, a prema podjeli u podskupine po patohistološkom tipu bolesti. Temeljem tih podataka načinjen je X^2 test. U postmenopauzalnih ispitanica dokazan je značajno veći udio zloćudnih tumora (84,2 %), dok je u predmenopauzalnih ispitanica dokazan statistički značajno veći udio TLL (65,22 %), $P = 0,001$.

Tablica 3. Raspodjela ispitanica prema menopauzalnom statusu po podskupinama patohistoloških tipova tumora jajnika

Skupina	Ukupno N = 140	Predmenopauza N = 44 (31,4 %)	Postmenopauza N = 96 (68,6 %)	P-vrijednost
Benigni tumori	53 (37,9 %)	17 (32,1 %)	36 (67,9 %)	0,001
Tumori niskog zloćudnog potencijala (<i>borderline</i>)	14 (10,0 %)	4 (28,6 %)	10 (71,4 %)	
TLL	23 (16,4 %)	15 (65,2 %)	8 (34,8 %)	
Zloćudni tumori	38 (27,1 %)	6 (15,8 %)	32 (84,2 %)	
Presadnice	12 (8,6 %)	2 (16,7 %)	10 (83,3 %)	

7.2. Dobne razlike između skupina ispitanica prema patohistološkom tipu tumora

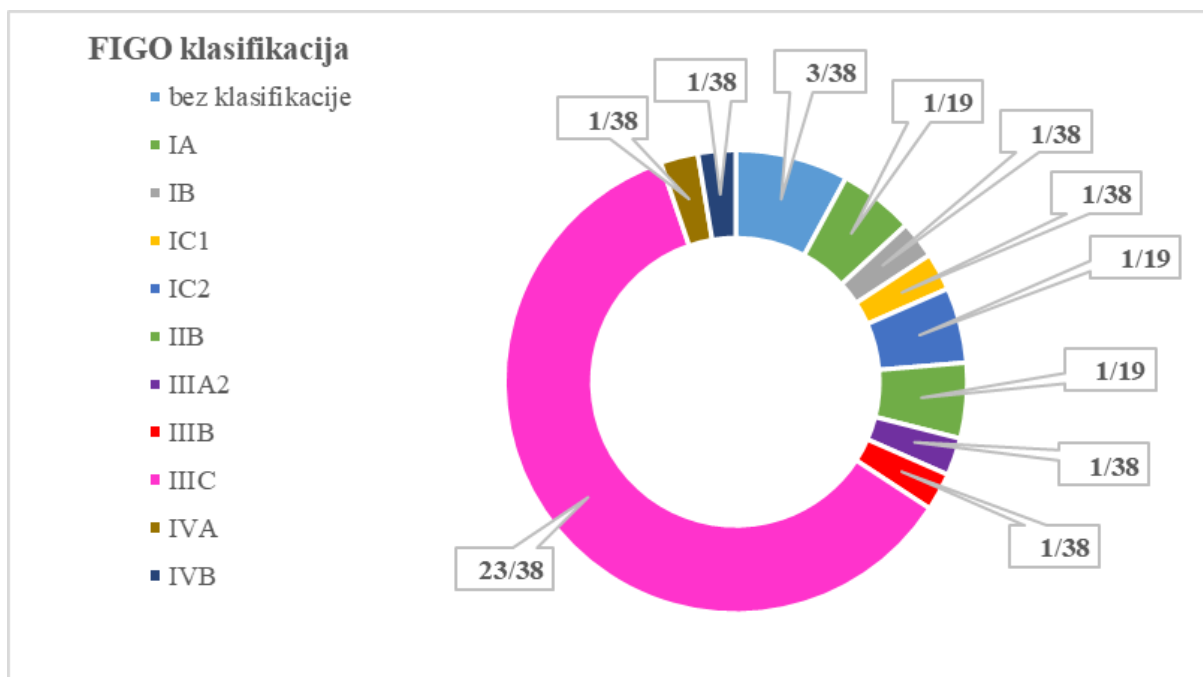
Dobne razlike ispitanica u podskupinama prema patohistološkom tipu bolesti ispitane su Kruskal-Wallisovim testom s post-hoc Mann-Whitney U testom (Tablica 4). Najmlađe su bile ispitanice koje su imale TLL s medijanom (IQR – interkvartilni raspon) dobi od 49 (IQR: 44-54) godina te su bile značajno mlađe od ispitanica s benignim tumorima ($P = 0,003$), tumorima niskog zloćudnog potencijala ($P = 0,010$), zloćudnim tumorima ($P < 0,001$) i presadnicama ($P < 0,001$). Između ostalih skupina nije utvrđena statistički značajna razlika prema dobi.

Tablica 4. Dobne razlike između podskupina patohistoloških tipova bolesti: Kruskal-Wallis test

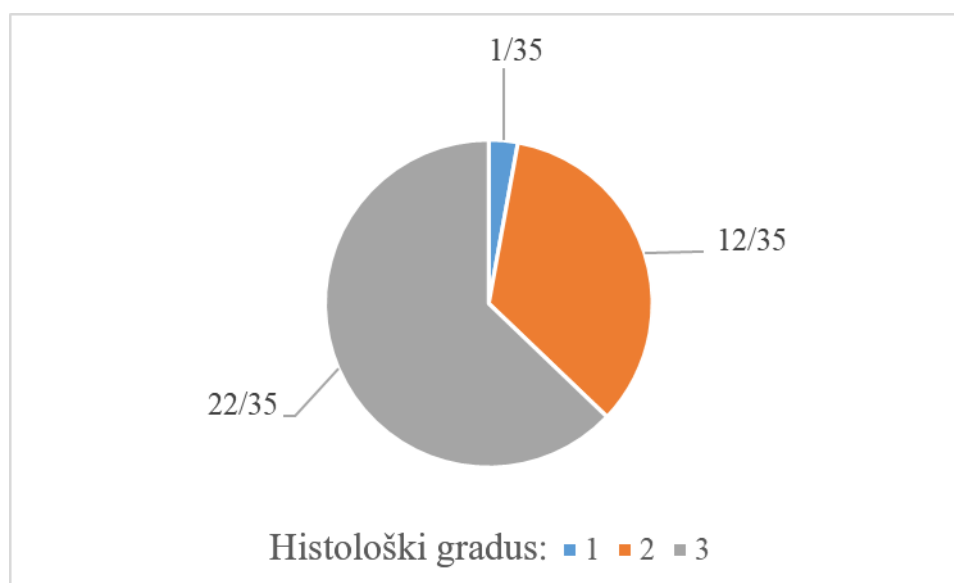
	Skupina	N = 140	Raspon (min-max)	Medijan (IQR)	P-vrijednost
Dob (godine)	Benigni tumori	53	28-86	55 (49-67)	< 0,001
	Tumori niskog zloćudnog potencijala (<i>borderline</i>)	14	34-74	61 (53-64)	
	TLL	23	23-7,	49 (44-54)	
	Zloćudni tumori	38	38-84	61 (54-69)	
	Presadnice	12	49-73	64 (54-70)	

7.3. Histološki gradus i FIGO klasifikacija u skupini zloćudnih tumora

Histološki gradus i FIGO klasifikacija kod zloćudnih tumora prikazan je na slikama 3 i 4. Od FIGO klasifikacija najzastupljeniji je bio status IIIC kod 23 od 38 ispitanica u podskupini zloćudnih tumora. Najzastupljeniji bio histološki gradus 3 kod 22 od 35 ispitanica u podskupini zloćudnih tumora.



Slika 3. Udio pojedinih FIGO klasifikacija u podskupini zloćudnih tumora



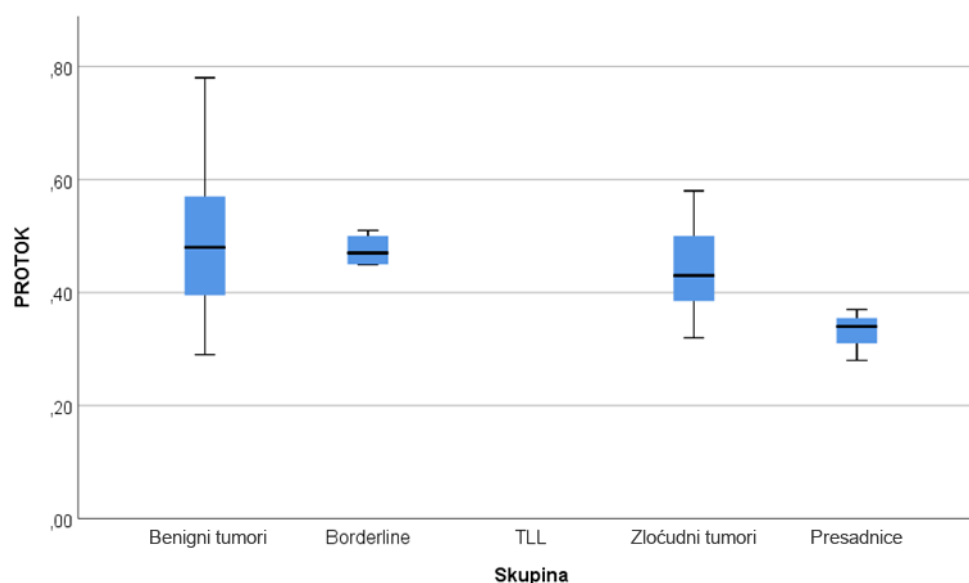
Slika 4. Udio pojedinih histoloških gradusa u podskupini zloćudnih tumora (3 uzorka nemaju opisan histološki gradus)

7.4. Analiza protoka i volumena tumora u skupinama prema patohistološkom tipu bolesti

U Tablica 5 i na **Error! Reference source not found.** prikazane su razlike u protoku krvi u tumorima u podskupinama patohistoloških tipova, za koje su bili dostupni podaci mjerenja. Provedenim Kruskal-Wallisovim testom nije dokazana značajna razlika u ($P = 0,080$).

Tablica 5. Razlike u protoku između podskupina patohistoloških tipova bolesti: Kruskal-Wallisov test

Protok	Skupina	N = 43	Raspon	Medijan (IQR)	P-vrijednost
			(min-max)		
	Benigni tumori	23	0,29-0,78	0,48 (0,39-0,58)	0,080
	Tumori niskog zloćudnog potencijala (<i>borderline</i>)	5	0,45-0,51	0,47 (0,45-0,51)	
	TLL	0	/	/	
	Zloćudni tumori	12	0,32-0,58	0,43 (0,38-0,52)	
	Presadnice	3	0,28-0,37	0,34 (0,28-0,37)	

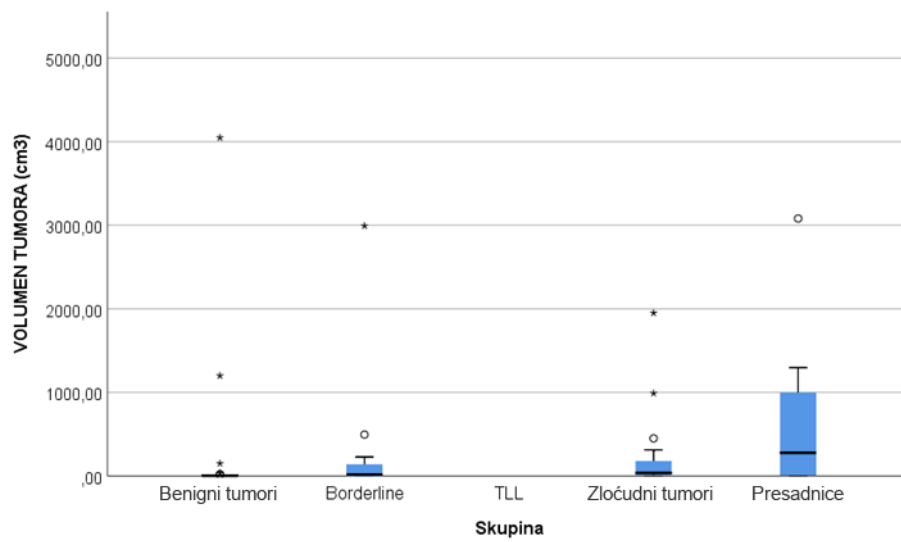


Slika 5. Grafički prikaz razlika u protoku između podskupina patohistoloških tipova bolesti

Razlike u volumenu tumora između podskupina patohistoloških tipova bolesti prikazane su u Tablica 6 te na slici 5. Kruskal-Wallisovim testom s post-hoc Mann-Whitney U testom utvrđeno je da su benigni tumori bili volumno značajno manji u odnosu na zloćudne tumore ($P < 0,001$) i presadnice ($P = 0,021$). Između ostalih skupina nije utvrđena statistički značajna razlika u veličini tumora.

Tablica 6. Razlike u volumenu tumora između podskupina patohistoloških tipova bolesti: Kruskal-Wallisov test

	Skupina	N = 90	Raspon (min-max)	Medijan (IQR)	P-vrijednost
Volumen tumora (cm³)	Benigni tumori	42	0,70-4048,00	3,25 (1,20-7,63)	< 0,001
	Tumori niskog zloćudnog potencijala (<i>borderline</i>)	12	1,38-2992,00	17,25 (17,25-184,13)	
	TLL	0	/	/	
	Zloćudni tumori	28	0,30-1950,00	35,85 (35,85-195,00)	
	Presadnice	8	0,18-3080,00	276,75 (4,83-1147,50)	



Slika 6. Grafički prikaz razlika u volumenu tumora (cm³) između podskupina patohistoloških tipova bolesti pri čemu su znakovima * i ° prikazane stršeće, tj. ekstremno stršeće vrijednosti

7.5. Utjecaj pušenja

U istraživanju je ispitana razlika u pojavnosti određenih tipova tumora između pušača i nepušača te između skupina ispitanika prema količini popušanih cigareta dnevno (manje ili više od 10 cigareta). Rezultati su prikazani u Tablica 7 i Tablica 8 iz kojih je vidljivo da ne postoji povezanost patohistoloških tipova bolesti s pušačkim statusom i brojem popušanih cigareta dnevno.

Tablica 7. Raspodjela patohistoloških tipova bolesti u odnosu na pušački status

Skupina	N = 140	Nepušači N = 110 (78,6 %)	Pušači N = 30 (21,4 %)	P-vrijednost
Benigni tumori	53	41 (77,4 %)	12 (22,6 %)	0,201
Tumori niskog zloćudnog potencijala (borderline)	14	10 (71,4 %)	4 (28,6 %)	
TLL	23	20 (87,0 %)	3 (13,0 %)	
Zloćudni tumori	38	27 (71,1 %)	11 (28,9 %)	
Presadnice	12	12 (100,0 %)	0 (0,0 %)	

Tablica 8. Raspodjela patohistoloških tipova bolesti u odnosu na broj popušenih cigareta dnevno

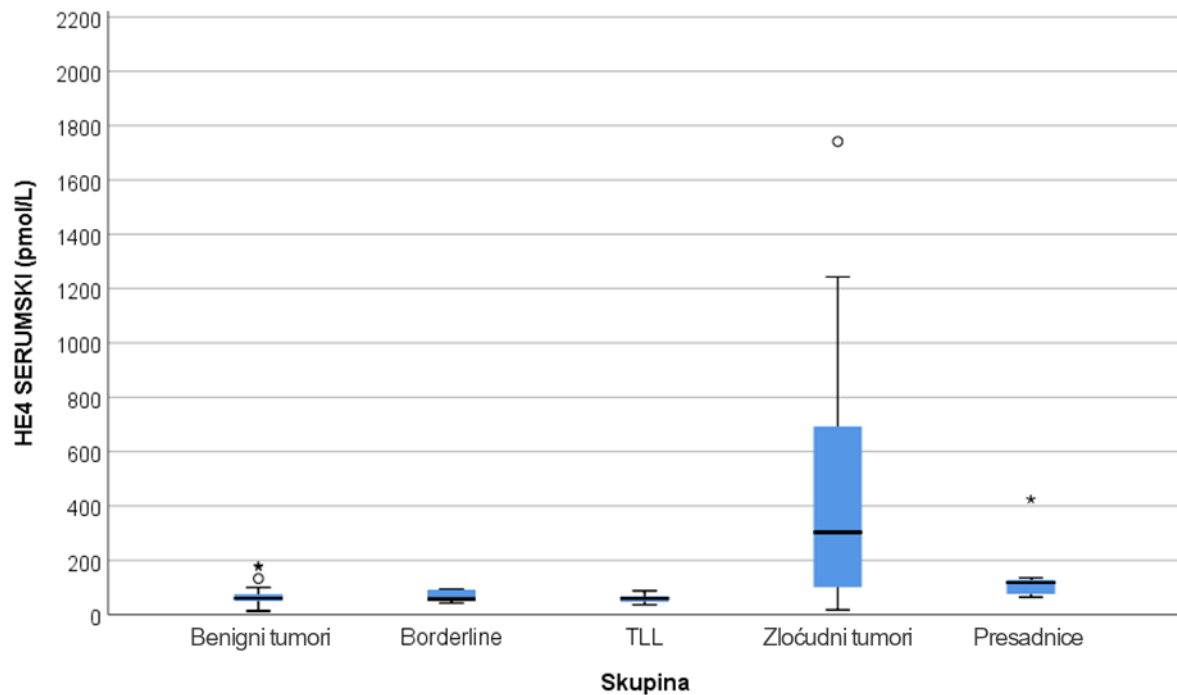
Skupina	N = 140	Broj cigareta dnevno < 10 N = 118 (84,3 %)	Broj cigareta dnevno > 10 N = 22 (15,7 %)	P-vrijednost
Benigni tumori	53	42 (79,2 %)	11 (20,8 %)	0,123
Tumori niskog zloćudnog potencijala (borderline)	14	10 (71,4 %)	4 (28,6 %)	
TLL	23	22 (95,7 %)	1 (4,3 %)	
Zloćudni tumori	38	32 (84,2 %)	6 (15,8 %)	
Presadnice	12	12 (100,0 %)	0 (0,0 %)	

7.6. HE4 u serumu i tkivu

Razlike u izmjerenim vrijednostima serumskog HE4 između podskupina patohistoloških tipova bolesti prikazane su u Tablica 9 i na Slika 7. Najniža izmjerena vrijednost HE4 u serumu je 13,10 pmol/L, a najviša 7700,00 pmol/L. Kruskal-Wallisovim testom s post-hoc Mann-Whitney U testom utvrđeno je da je podskupina sa zloćudnim tumorima imala najveće vrijednosti serumskog HE4 s medijanom 302,7 pmol/L (IQR 16,7-7700,0) koje su bile značajno veće od svih ostalih podskupina ($P < 0,001$) uključujući i presadnice ($P = 0,010$). Podskupina presadnica imala je značajno veće vrijednosti od podskupina benigni tumori i TLL ($P < 0,001$) te *borderline* podskupine ($P = 0,003$) s medijanom 117,65 pmol/L (IQR: 75,9-127,7). Između ostalih skupina nije utvrđena statistički značajna razlika u serumskim koncentracijama HE4.

Tablica 9. Razlike između koncentracija serumskog HE4 kod podskupina patohistoloških tipova bolesti: Kruskal-Wallisov test

	Skupina	N = 140	Raspon (min-max)	Medijan (IQR)	P-vrijednost
HE4 - serumski (pmol/L)	Benigni tumori	53 (37,9 %)	13,1-179,0	59,8 (48,7-75,1)	< 0,001
	Tumori niskog zloćudnog potencijala (<i>borderline</i>)	14 (10,0 %)	42,4-93,3	57,0 (50,0-91,2)	
	TLL	23 (16,4 %)	36,0-87,3	59,4 (59,4-67,8)	
	Zloćudni tumori	38 (27,1 %)	16,7-7700,0	302,7 (302,7-695,6)	
	Presadnice	12 (8,6 %)	64,-424,0	117,7 (75,9-127,7)	

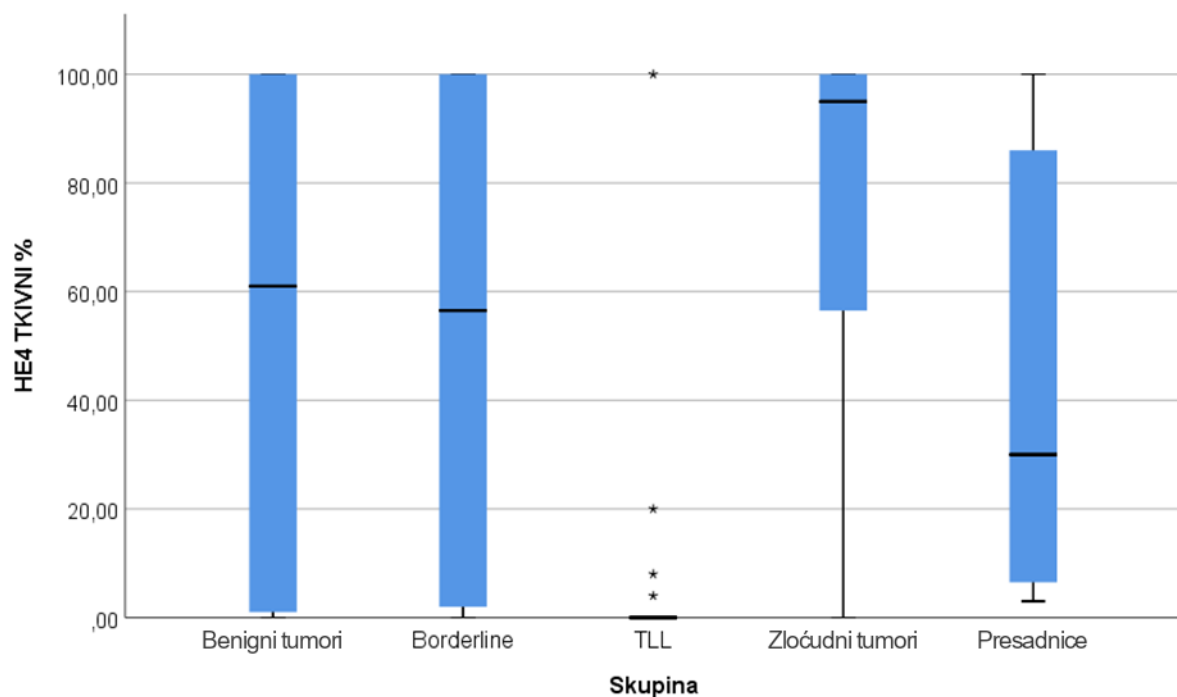


Slika 7. Grafički prikaz razlika u koncentracijama serumskog HE4 (pmol/L) između podskupina patohistoloških tipova bolesti pri čemu su znakovima * i ° prikazane stršeće, tj. ekstremno stršeće vrijednosti

Razlike u vrijednostima tkivnog HE4 između podskupina patohistoloških tipova bolesti prikazane su u Tablica 10 i na Slika 8. Kruskal-Wallisovim testom s post-hoc Mann-Whitney U testom dokazano je da je podskupina zloćudnih tumora imala najveće vrijednosti tkivnog HE4 koje su bile značajno veće od podskupine benignih tumora ($P = 0,049$), podskupine TLL ($P < 0,001$) i podskupine presadnice ($P = 0,032$). Podskupina TLL je imala najmanju vrijednost tkivnog HE4: medijan 0 (IQR: 0 – 0) koja je bila značajno manja u odnosu na sve ostale podskupine ($P < 0,001$), dakle nije imala uopće izražen tkivni HE4. Između ostalih skupina nije utvrđena statistički značajna razlika u ekspresiji tkivnog HE4.

Tablica 10. Razlike u tkivnom HE4 između podskupina patohistoloških tipova bolesti: Kruskal-Wallisov test

	Skupina	N = 140	Medijan (IQR)	P-vrijednost
HE4 – tkivni (%)	Benigni tumori	53 (37,8 %)	61 (0-100)	< 0,001
	Tumori niskog zloćudnog potencijala (<i>borderline</i>)	14 (10,4 %)	57 (2-100)	
	TLL	23 (17,0 %)	0 (0-0)	
	Zloćudni tumori	38 (25,9 %)	95 (56-100)	
	Presadnice	12 (8,9 %)	30 (6-88)	



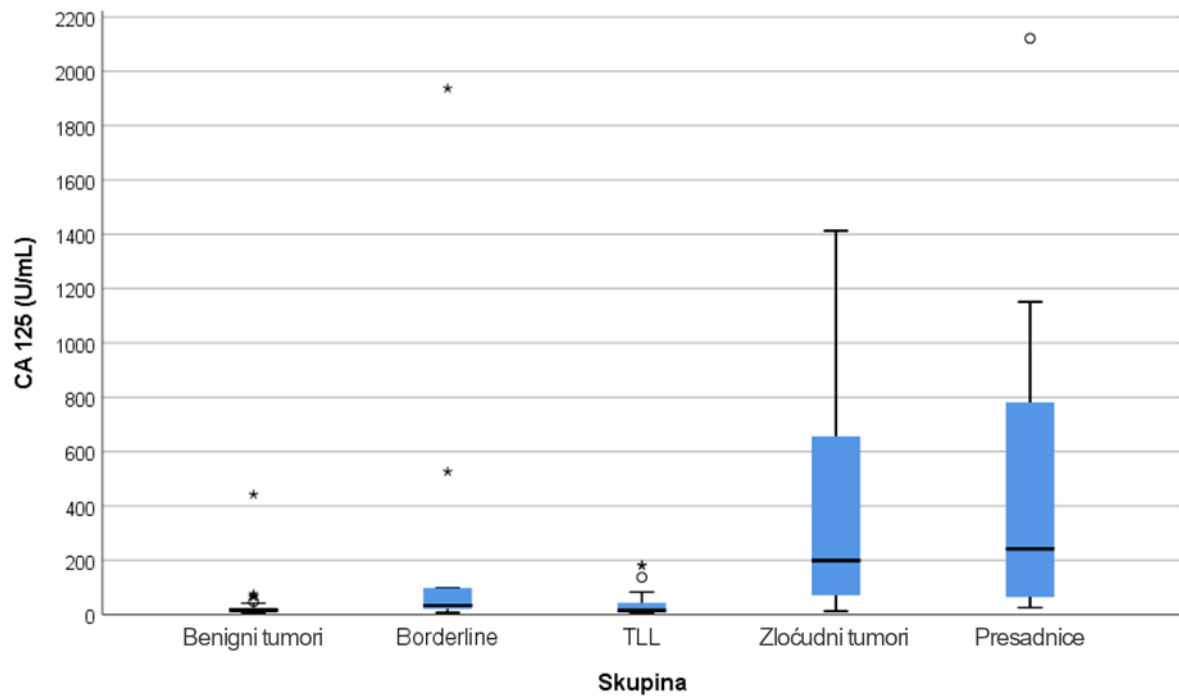
Slika 8. Grafički prikaz razlika u ekspresiji tkivnog HE4 između podskupina patohistoloških tipova bolesti pri čemu su znakovima * prikazane stršeće vrijednosti

7.7. CA 125 u serumu

Razlike u izmjerenim vrijednostima CA 125 između podskupina patohistoloških tipova bolesti prikazane su u Tablica 11 i na Slika 9. Kruskal-Wallisovim testom s post-hoc Mann-Whitney U testom utvrđeno je da su najveće vrijednosti zabilježene u skupini presadnice s medijanom 241,8 U/mL; (IQR: 63,9-966,4 U/mL) i značajno veće od podskupina benignih tumora i TLL ($P < 0,001$) te tumora niskog zloćudnog potencijala ($P = 0,016$), izuzev zloćudnih tumora s medijanom koncentracija od 199,15 U/mL (IQR: 69,3-702,6). Podskupina zloćudnih tumora imala je značajno veće koncentracije CA 125 od podskupina benignih tumora i TLL ($P < 0,001$) te tumora niskog zloćudnog potencijala ($P = 0,002$). Također je utvrđeno da su vrijednosti CA 125 značajno više u podskupini tumora niskog zloćudnog potencijala u odnosu na benigne tumore ($P = 0,003$) i TLL ($P = 0,042$). Nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentracijama CA 125 između podskupina benignih tumora i TLL.

Tablica 11. Razlike u serumskim koncentracijama CA 125 između podskupina patohistoloških tipova bolesti: Kruskal-Wallisov test

	Skupina	N = 140	Raspon (min-max)	Medijan (IQR)	P-vrijednost
CA 125 (U/mL)	Benigni tumori	53	6,6-442,0	15,6 (12,4-26,5)	< 0,001
	Tumori niskog zloćudnog potencijala (<i>borderline</i>)	14	7,4-1937,0	33,0 (20,7-97,7)	
	TLL	23	6,1-180,9	14,7 (10,8-58,0)	
	Zloćudni tumori	38	12,4-6090,0	199,2 (69,3-702,6)	
	Presadnice	12	25,3-2121,0	241,8 (63,9-966,4)	



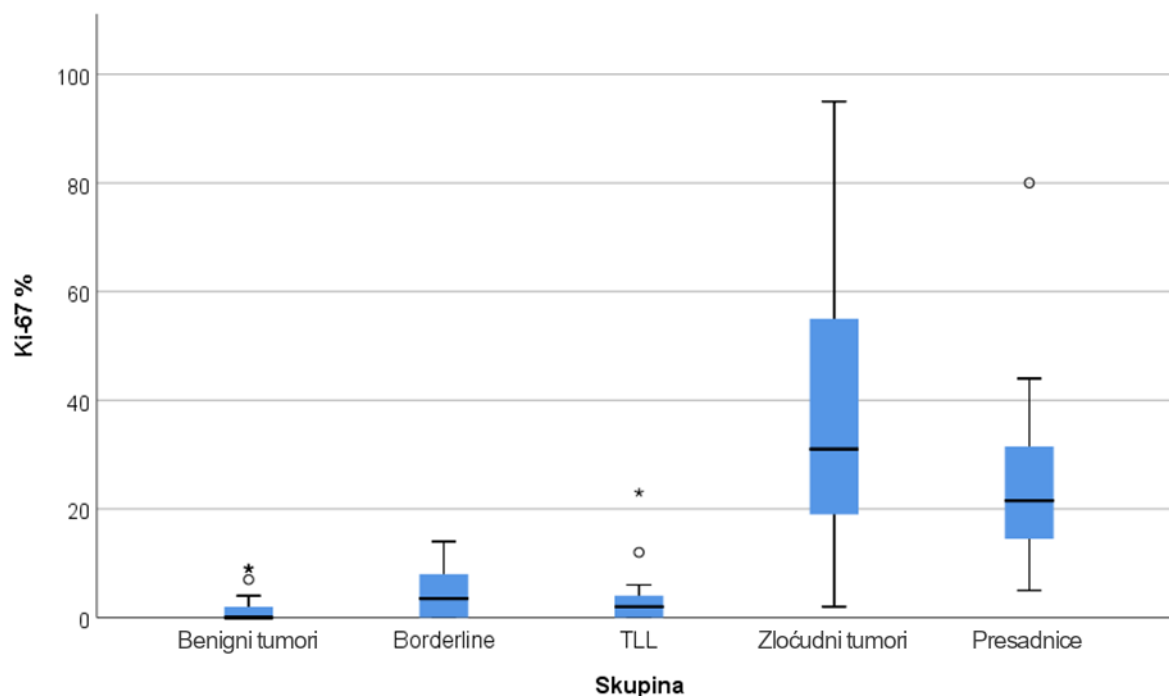
Slika 9. Grafički prikaz razlika u koncentracijama CA 125 između podskupina patohistoloških tipova bolesti pri čemu su znakovima * i ° prikazane stršeće, tj. ekstremno stršeće vrijednosti

7.8. Ki-67 antigen u tkivu jajnika

Razlike u Ki-67 između podskupina patohistoloških tipova bolesti prikazane su u Tablica 12 i Slika 10. Kruskal-Wallisovim testom s post-hoc Mann-Whitney U testom utvrđeno je da je ekspresija Ki-67 značajno veća u podskupini zloćudnih tumora u odnosu na sve ostale patohistološke tipove ($P < 0,001$) osim presadnica. Podskupina presadnica je također imala značajno više vrijednosti u ekspresiji tkivnog Ki-67 u odnosu na sve podskupine ($P < 0,001$) izuzev zloćudnih tumora. Podskupina tumora niskog zloćudnog potencijala je imala više vrijednosti u odnosu na benigne tumore ($P = 0,019$), ali one nisu bile značajno više u odnosu na podskupinu TLL. Između podskupina benignih tumora i TLL je razina značajnosti bila granična ($P = 0,050$).

Tablica 12. Razlike u Ki-67 između podskupina patohistoloških tipova bolesti: Kruskal-Wallisov test

	Skupina	N = 140	Raspon (min-max)	Medijan (IQR)	P-vrijednost
Ki-67 (%)	Benigni tumori	53	0,0-9,0	0,0 (0,0-2,0)	< 0,001
	Tumori niskog zloćudnog potencijala (<i>borderline</i>)	14	0,0-14,0	3,5 (0,0-8,8)	
	TLL	23	0,0-23,0	2,0 (0,0-5,0)	
	Zloćudni tumori	38	2,0-95,0	31,0 (19,0-58,0)	
	Presadnice	12	5,0-80,0	21,5 (13,3-33,8)	



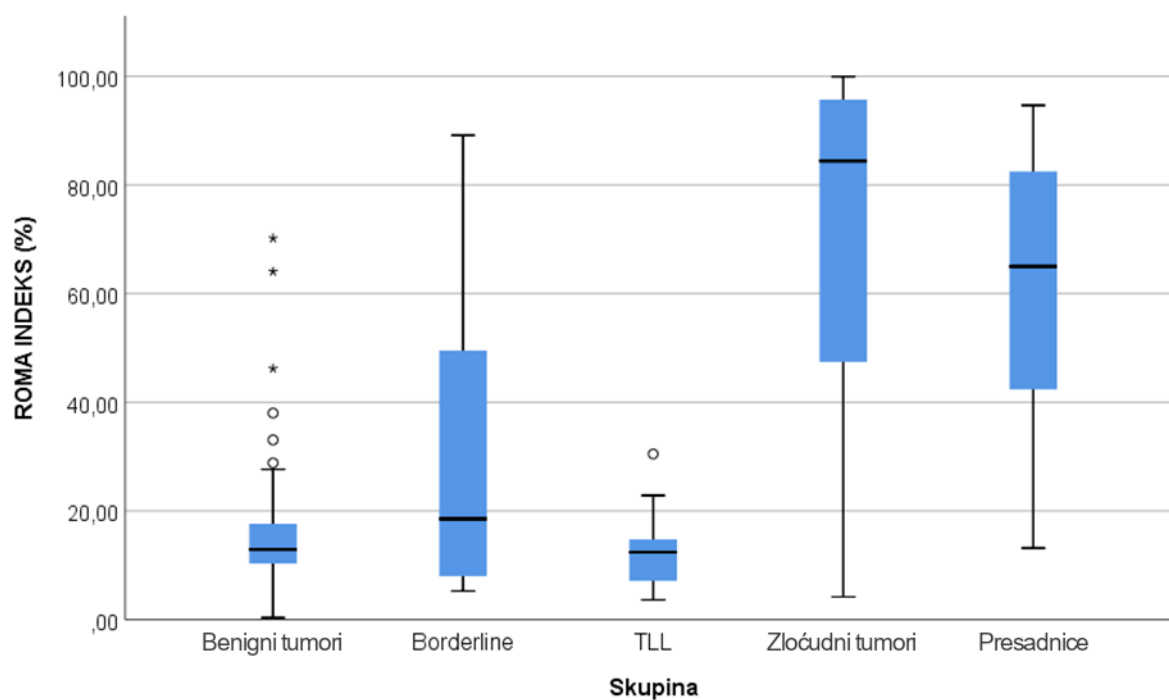
Slika 10. Grafički prikaz razlika u ekspresiji Ki-67 između podskupina patohistoloških tipova bolesti pri čemu su znakovima * i ° prikazane stršeće, tj. ekstremno stršeće vrijednosti

7.9. ROMA indeks

S obzirom na to da se ROMA indeks računa iz vrijednosti HE4 i CA 125 razlike između podskupina su slične kao i kod tih parametara. Kruskal-Wallisovim testom s post-hoc Mann-Whitney U testom utvrđeno je da su najveće vrijednosti ROMA indeksa kod podskupine zloćudnih tumora s medijanom 84,4 % (IQR: 46,-96,3) kao što je vidljivo u Tablica 13 i na Slika 11. One su bile značajno veće u odnosu na sve ostale podskupine ($P < 0,001$) izuzev presadnica. Vrijednosti ROMA indeksa u podskupini presadnica također su bile značajno više u odnosu na benigne tumore i TLL ($P < 0,001$) te tumore niskog zloćudnog potencijala ($P = 0,007$). Između ostalih podskupina nije utvrđena statistički značajna razlika u vrijednostima ROMA indeksa.

Tablica 13. Razlike u vrijednostima ROMA indeksa između podskupina patohistoloških tipova bolesti: Kruskal-Wallisov test

	Skupina	N = 140	Raspon (min-max)	Medijan (IQR)	P-vrijednost
ROMA indeks (%)	Benigni tumori	53	0,4-70,2	12,9 (9,9-18,2)	< 0,001
	Tumori niskog zloćudnog potencijala (<i>borderline</i>)	14	5,3-89,1	18,5 (7,9-49,5)	
	TLL	23	3,6-30,5	12,4 (7,1-14,8)	
	Zloćudni tumori	38	4,2-100,0	84,4 (46,8-96,3)	
	Presadnice	12	13,1-94,7	65,0 (39,4-85,8)	



Slika 11. Grafički prikaz razlika u vrijednostima ROMA indeksa između podskupina patohistoloških tipova bolesti pri čemu su znakovima * i ° prikazane stršeće, tj. ekstremno stršeće vrijednosti

U Tablica 14 prikazana je usporedba raspodjele ispitanica u skupine visokog i niskog rizika na temelju ROMA indeksa (s obzirom na menopauzalni status) prema pojedinim kliničkim varijablama (patohistološki tip bolesti, pušački status, FIGO klasifikacija i histološki gradus tumora) te rezultati analize razlika u raspodjeli navedenih kategoričkih varijabli na temelju X^2 testa, tj. Fisherovog egzaktnog testa. U skupini s visokim rizikom najzastupljeniji su bili zloćudni tumori (45,3 %), dok su u skupini s niskim rizikom najzastupljeniji benigni tumori (63,1 %; $P < 0,001$). Kod podskupine zloćudnih tumora, u skupini s visokim rizikom na temelju ROMA indeksa najzastupljenija je bila FIGO klasifikacija IIIC s 23 od 34 ispitanica, a u skupini niskog rizika klasifikacija IIB s 2 od 4 ispitanice ($P = 0,001$). Nije utvrđena razlika u udjelu ispitanica s niskim i visokim rizikom na temelju pušačkog statusa te histološkog gradusa tumora.

Tablica 14. Usporedba raspodjele ispitanica u skupine visokog i niskog rizika na temelju ROMA indeksa prema pojedinim kliničkim varijablama (patohistološki tip bolesti, pušački status, FIGO klasifikacija i histološki gradus tumora): χ^2 i Fisherov egzaktni test

ROMA indeks		Niski rizik		Visoki rizik		P-vrijednost
		N	%	N	%	
Patohistološki tip bolesti N = 140	Benigni tumori	41	63,1 %	12	16,0 %	< 0,001
	<i>Borderline</i>	8	12,3 %	6	8,0 %	
	TLL	12	18,5 %	11	14,7 %	
	Zloćudni tumori	4	6,2 %	34	45,3 %	
	Presadnice	0	0,0 %	12	16,0 %	
Pušenje	Ne	50	76,9 %	60	80,0 %	0,658
	Da	15	23,1 %	15	20,0 %	
Broj cigareta dnevno	< 10	52	80,0 %	66	88,0 %	0,195
	> 10	13	20,0 %	9	12,0 %	
FIGO klasifikacija*	Bez klasifikacije	2	50,0 %	1	2,9 %	0,001
	IA	0	0,0 %	2	5,9 %	
	IB	0	0,0 %	1	2,9 %	
	IC1	0	0,0 %	1	2,9 %	
	IC2	0	0,0 %	2	5,9 %	
	IIB	2	50,0 %	0	0,0 %	
	IIIA2	0	0,0 %	1	2,9 %	
	IIIB	0	0,0 %	1	2,9 %	
	IIIC	0	0,0 %	23	67,6 %	
	IVA	0	0,0 %	1	2,9 %	
	IVB	0	0,0 %	1	2,9 %	
Histološki gradus*	1	0	0,0 %	1	3,0 %	0,168
	2	2	100,0 %	10	30,3 %	
	3	0	0,0 %	22	66,7 %	

*Podaci samo za zloćudne tumore (Fisherov egzaktni test)

7.10. Analiza povezanosti između određenih kliničkih parametara s histološkim gradusom tumora, FIGO klasifikacijom i vrijednostima ROMA indeksa

U Tablica 15 prikazani su rezultati analize povezanosti ekspresije tkivnog HE4 i Ki-67, serumske koncentracije HE4 i CA 125, ROMA indeksa te protoka i volumena tumora s histološkim gradusom tumora, FIGO klasifikacijom i vrijednostima ROMA indeksa.

Histološki gradus tumora značajno ne korelira ni sa jednim od navedenih kliničkih parametara, dok veća FIGO klasifikacija statistički značajno pozitivno korelira s koncentracijama serumskog HE4 (slaba povezanost: $\rho = 0,475$; $P = 0,004$) i CA 125 (umjerena povezanost: $\rho = 0,530$; $P = 0,001$) te ROMA indeksom (umjerena povezanost: $\rho = 0,546$; $P = 0,001$). Dokazana je i slaba pozitivna povezanost između ekspresije tkivnog HE4 i vrijednosti ROMA indeksa ($\rho = 0,396$; $P = 0,018$), dok ekspresija tkivnog HE4 nije značajno korelirala s histološkim gradusom i stupnjem FIGO klasifikacije. Protok, volumen tumora te ekspresija Ki-67 nisu značajno korelirali s niti jednim od ispitanih kliničkih parametara.

Tablica 15. Analiza povezanosti između pojedinih kliničkih parametara (histološkog gradusa tumora, FIGO klasifikacije i ROMA indeksa) i određenih parametara (serumski i tkivni HE4, CA 125, ROMA indeks, Ki-67, protok i volumen tumora) u skupini zloćudnih tumora: Spearmanov koeficijent korelacije

		Histološki gradus	FIGO klasifikacija	ROMA indeks (%)
HE4 - serumski (pmol/L)	Korelacijski koeficijent	0,312	0,475	NP
	P- vrijednost	0,068	0,004	NP
	N	35	35	NP
HE4 - tkivni (%)	Korelacijski koeficijent	0,246	-0,031	0,396
	P- vrijednost	0,175	0,868	0,018
	N	32	32	35
CA 125 (U/mL)	Korelacijski koeficijent	0,165	0,530	NP
	P- vrijednost	0,344	0,001	NP
	N	35	35	NP
ROMA indeks (%)	Korelacijski koeficijent	0,226	0,546	NP
	P- vrijednost	0,191	0,001	NP
	N	35	35	NP
Ki-67 (%)	Korelacijski koeficijent	0,135	-0,030	0,178
	P- vrijednost	0,461	0,872	0,307
	N	32	32	35
Protok	Korelacijski koeficijent	0,244	0,117	0,067
	P- vrijednost	0,497	0,748	0,837
	N	10	10	12
Volumen tumora (cm³)	Korelacijski koeficijent	0,013	-0,247	-0,244
	P- vrijednost	0,949	0,235	0,210
	N	25	25	28

NP – nije primjenjivo

7.11. Ispitivanje razlika u vrijednostima kliničkih parametara s histološkim gradusom tumora u skupini zloćudnih tumora

Kruskal-Wallisovim testom nije utvrđena statistički značajna razlika u vrijednostima serumskih koncentracija HE4 i CA 125, ROMA indeksa, ekspresiji tkivnog HE4 i Ki-67 te protoku i volumenu tumora između 3 skupine histoloških gradusa tumora kod ispitanica sa zloćudnim tumorima (Tablica 16).

Tablica 16. Razlika u vrijednostima određivanih parametara (serumski i tkivni HE4, CA 125, ROMA indeks, Ki-67, protok i volumen tumora) između 3 skupine histoloških gradusa kod zloćudnih tumora: Kruskal-Wallisov test

	Histološki gradus	N	Medijan (IQR)	P-vrijednost
HE4 - serumski (pmol/L)	1	1	NP	0,191
	2	12	254,5 (101,1-471,7)	
	3	22	596,3 (119,3-901,8)	
CA 125 (U/mL)	1	1	NP	0,454
	2	12	320,0 (92,2-626,5)	
	3	22	225,2 (115,2-875,1)	
ROMA indeks (%)	1	1	NP	0,392
	2	12	79,6 (50,8-95,0)	
	3	22	92,7 (46,8-98,2)	
HE4 - tkivni (%)	1	1	NP	0,190
	2	11	91,0 (45,0-100,0)	
	3	20	97,5 (84,3-100,0)	
Ki-67 (%)	1	1	NP	0,285
	2	11	31,0 (28,0-47,0)	
	3	20	40,5 (19,8-65,5)	
Protok	1	1	NP	0,200
	2	3	0,38 (0,32-0,39)	
	3	6	0,43 (0,37-0,57)	
Volumen tumora (cm³)	1	1	NP	0,912
	2	9	72,0 (4,3-381,0)	
	3	15	36,0 (12,0-150,0)	

NP – nije primjenjivo

7.12. Dijagnostička točnost serumskog HE4, CA 125 i ROMA indeksa u predmenopauzalnoj i postmenopauzalnoj grupi

Budući da osjetljivost i specifičnost nekog testa nisu konstantne mjere dijagnostičke točnosti nego se mijenjaju s izborom granične vrijednosti, za svaku pojedinačnu graničnu vrijednost postoji par dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti. Nanošenjem tih parova vrijednosti na graf kojemu su osi: apcisa = $1 -$ dijagnostička specifičnost, i ordinata = dijagnostička osjetljivost, nastaje krivulja ROC. Po obliku krivulje ROC i površini ispod krivulje (AUC) možemo procijeniti kolika je učinkovitost pretrage, tj. njena dijagnostička točnost. Po obliku krivulje i površini ispod nje stječemo dojam o učinkovitosti pretrage. Što je krivulja bliže gornjem lijevom kutu grafa, dijagnostička točnost ispitivane pretrage je veća. Također, dijagnostička točnost korelira s površinom ispod ROC krivulje. ROC analizom doznajemo i optimalnu graničnu vrijednost. Optimalna granična vrijednost je ona uz koju se postiže najučinkovitija diskriminacija. Optimalna granična vrijednost je tangenta krivulje u točki najbližoj gornjem lijevom kutu grafa, odnosno točka u kojoj je zbroj dijagnostičke specifičnosti i osjetljivosti najveća (89).

7.12.1. Predmenopauzalna grupa

Za sve bolesnice predmenopauzalnog statusa (grupa sa zloćudnim tumorima, grupa s benignim tumorima, te grupa s tumorima niskog zloćudnog potencijala) izračunat je medijan i interkvartilni raspon za parametre: serumski HE4, CA 125 i ROMA indeks. Za sve ispitanice predmenopauzalne grupe medijan serumskog HE4 je 54,7 (44,3-64,8) pmol/L, medijan vrijednosti koncentracija CA 125 je 25,3 (15,3-50,7) U/mL, a medijan vrijednosti izračunatog ROMA indeksa 9,5 (5,9-13,8) % (Tablica 17).

U predmenopauzalnoj grupi sa zloćudnim tumorima jajnika najniža izmjerena vrijednost HE4 je 38,4 pmol/L dok je najviša 297,6 pmol/L. Za CA 125 najniža vrijednost u istoj grupi izmjerena je 20,3 U/mL, a najviša 714,9 U/mL. Računski određen ROMA indeks za grupu sa zloćudnim tumorima ima najniže vrijednosti od 4,1 % a najviše od 80,6 %. U predmenopauzalnoj grupi s benignim tumorima jajnika najniža izmjerena vrijednost HE4 je 32,6 pmol/L, a najviša 63,7 pmol/L. Za CA 125 najniža vrijednost u istoj grupi izmjerena je 34,0 U/mL, a najviša 193,7 U/mL. Računski dobiven ROMA indeks za grupu s benignim tumorima jajnika iznosi najniži 4,2 % a najviši 15,6 %. Normalnost distribucije ispitana je Kolmogorov–Smirnovim testom za grupu sa zloćudnim tumorima jajnika, grupu s benignim

tumorima, te grupu s tumorima *borderline* te je utvrđeno da raspodjela podataka ne slijedi normalnu raspodjelu ($P < 0,001$).

Tablica 17. Medijan i interkvartilni raspon izmjerenih parametara (HE4, CA 125 i ROMA indeks) u predmenopauzalnoj grupi ispitanica prema vrsti tumora

PREDMENOPAUZALNA GRUPA (N = 57)	Parametar	Medijan (IQR)	P-vrijednost*
Grupa sa zloćudnim tumorima (N = 7)	HE4 (pmol/L)	128,2 (88,4-230,2)	> 0,001
	CA 125 (U/mL)	116,4 (55,5-287,9)	> 0,001
	ROMA indeks (%)	47,4 (25,3-76,8)	> 0,001
Grupa s tumorima niskog zloćudnog potencijala (N = 3)	HE4 (pmol/L)	50 (44,3–52,9)	uzorak premale veličine
	CA 125 (U/mL)	25 (22,1-29,5)	
	ROMA indeks (%)	7,6 (5,9-8,8)	
Grupa s benignim tumorima (N = 47)	HE4 (pmol/L)	54,3 (44,1-62,6)	< 0,001
	CA 125 (U/mL)	20,3 (13,6-62,6)	< 0,001
	ROMA indeks (%)	9,4 (5,9-12,2)	< 0,001

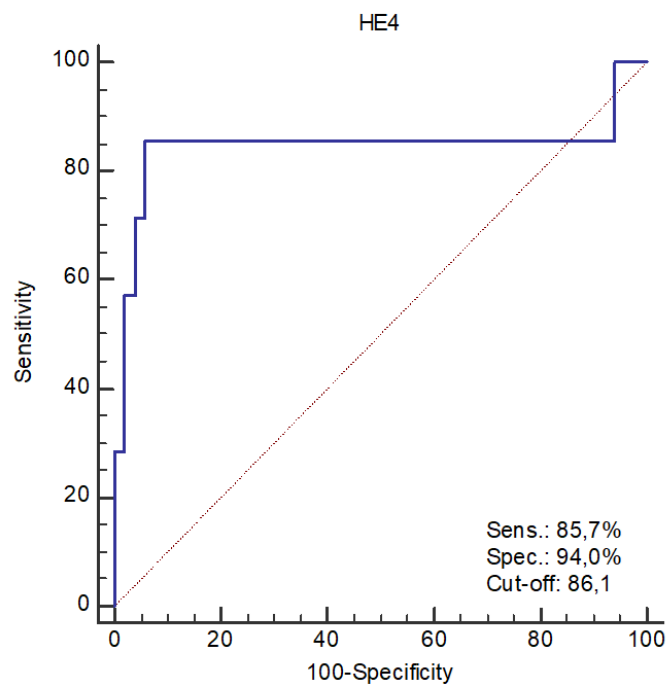
*Kolmogorov-Smirnov test

Granične vrijednosti dobivene analizom ROC krivulja su 86,1 pmol/L za HE4, 40,7 U/mL za CA 125 te 21,9 % za ROMA indeks (

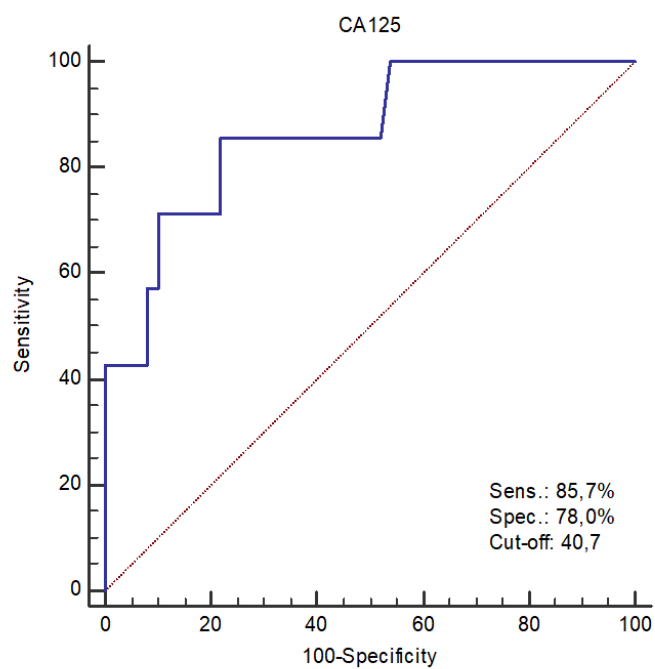
Slika 12. ROC krivulja za HE4

Slika 13 i Slika 14).

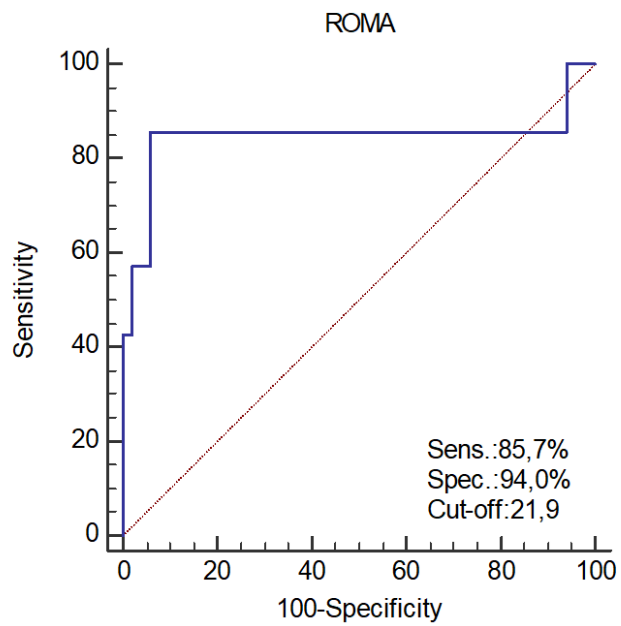
Dijagnostička osjetljivost HE4, CA 125 i ROMA indeksa je 85,7 %, dok je dijagnostička specifičnost za HE4 i ROMA indeks od 94 % viša u usporedbi s dijagnostičkom specifičnosti od 78 % za CA 125. Rezultati pokazuju da površina ispod ROC krivulje u predmenopauzalnoj grupi za HE4 iznosi 84,6 %, za CA 125 86,7 % i 84,6 % za ROMA indeks. Svi pokazatelji dijagnostičke točnosti prikazani su u Tablica 18.



Slika 12. ROC krivulja za HE4 u predmenopauzalnoj grupi ispitanica



Slika 13. ROC krivulja za CA 125 u predmenopauzalnoj grupi ispitanica



Slika 14. ROC krivulja za ROMA indeks u predmenopauzalnoj grupi ispitanica

Tablica 18. Dijagnostička osjetljivost i specifičnost HE4, CA 125 I ROMA indeksa u predmenopauzalnoj grupi ispitanica

Parametar	HE4	CA 125	ROMA indeks
AUC (95 % CI)	0,846 (0,726 - 0,928)	0,867 (0,751 - 0,942)	0,846 (0,726 - 0,928)
Standardna pogreška	0,132	0,077	0,132
Granična vrijednost	> 86,1	> 40,7	> 21,9
Dijagnostička osjetljivost (95 % CI)	85,71 (42,1 - 99,6) 85,7 % *	85,71 (42,1 - 99,6) 75 % *	85,71 (42,1 - 99,6) 85 % *
Dijagnostička specifičnost (95 % CI)	94,00 (83,5 - 98,7) 80 % *	78,0 (64,0 - 88,5) 69,3 % *	94,00 62 % *
+ LR	14,29	3,90	14,29
- LR	0,15	0,18	0,15
P-vrijednost	0,009	< 0,001	0,009
PPV	67 % 37,5 % *	35,3 % 28,5 % *	67 % 24 % *
NPV	92,4 % 94,6 % *	91,9 % 92,7 % *	95,2 % 94,6 % *

Kratice: AUC – površina ispod krivulje; 95 % CI – 95 %-tni interval pouzdanosti; LR – omjer izgleda; PPV – pozitivna prediktivna vrijednost; NPV – negativna prediktivna vrijednost

*granična vrijednost proizvođača

7.12.2. Postmenopauzalna grupa

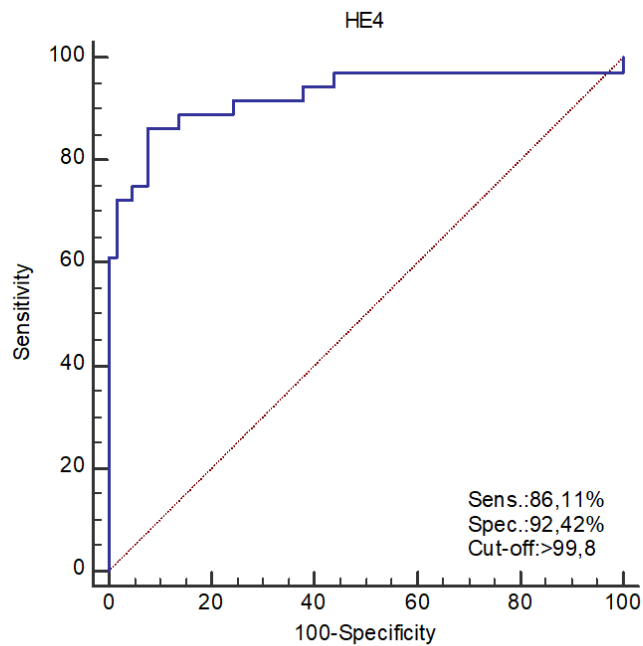
Za sve bolesnice postmenopauzalnog statusa (grupa sa zloćudnim tumorima, grupa s benignim tumorima, te grupa s tumorima niskog zloćudnog potencijala) izračunat je medijan i interkvartilni raspon za parametre: serumski HE4, CA 125 i ROMA indeks. Za sve bolesnice postmenopauzalne grupe medijan serumskog HE4 je 78,1 (56,0-170,2) pmol/L, CA 125 je 28,8 (12,9-166,6) U/mL, a računski dobiven ROMA indeks 23,5 (13,1-73,8) %. U postmenopauzalnoj grupi sa zloćudnim tumorima najniža izmjerena vrijednost HE4 je 16,72 pmol/ dok je najviša 7700 pmol/L. Za CA 125 najniža vrijednost u istoj grupi izmjerena je 12,2 U/mL, a najviša 6090 U/mL. Računski dobiven ROMA indeks za grupu sa zloćudnim tumorima iznosi najniži 11,5 % a najviši 99,9 %. U postmenopauzalnoj grupi s benignim tumorima jajnika najniža izmjerena vrijednost HE4 je 40,8 pmol/L, a najviša 175,4 pmol/L. Za CA 125 najniža vrijednost u istoj grupi izmjerena je 6,6 U/mL, a najviša 442,0 U/mL. Računski dobiven ROMA indeks za grupu s benignim tumorima jajnika iznosi najniži 6,6 %, a najviši 79,7 %. Normalnost distribucije ispitana je Kolmogorov–Smirnovim testom za grupu sa zloćudnim tumorima, grupu s benignim tumorima, te grupu s tumorima niskog zloćudnog potencijala što je prikazano u Tablica 19.

Tablica 19. Medijan i interkvartilni raspon izmjerenih parametara (HE4, CA 125 i ROMA indeks) u postmenopauzalnoj grupi ispitanica prema vrsti tumora

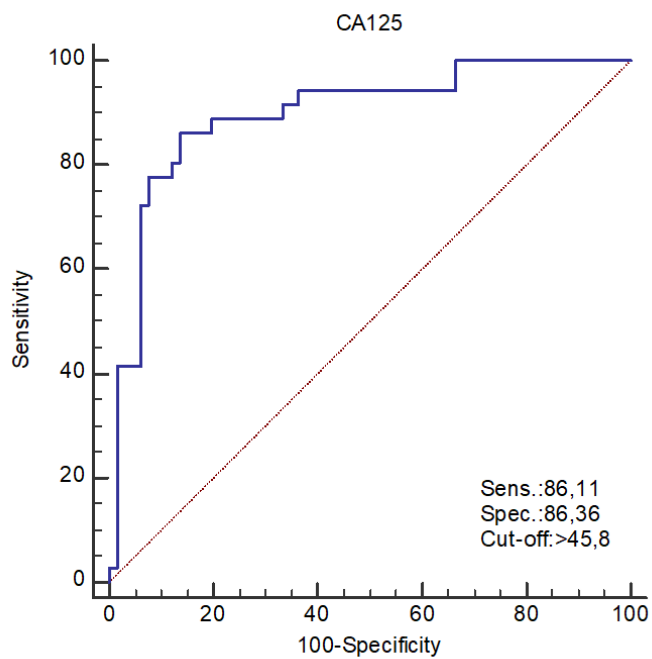
POSTMENOPAUZALNA GRUPA (N = 102)	Parametar	Medijan (IQR)	P-vrijednost*
Grupa sa zloćudnim tumorima (N = 36)	HE4, pmol/L	278,1 (115,8-698,4)	< 0,001
	CA 125, U/mL	263,1 (105,8-806,6)	< 0,001
	ROMA, %	88,5 (60,4-96,8)	< 0,001
Grupa s tumorima niskog zloćudnog potencijala (N = 8)	HE4, pmol/L	65,8 (55,6-89,5)	> 0,100
	CA 125, U/mL	35,7 (19,1-311,9)	< 0,001
	ROMA, %	26,9 (13,9-60,9)	> 0,100
Grupa s benignim tumorima (N = 58)	HE4, pmol/L	62,8 (51,9-78,9)	< 0,001
	CA 125, U/mL	15,1 (11,2-28,4)	< 0,001
	ROMA, %	14,7 (11,5-23,1)	< 0,001

*Kolmogorov-Smirnov test

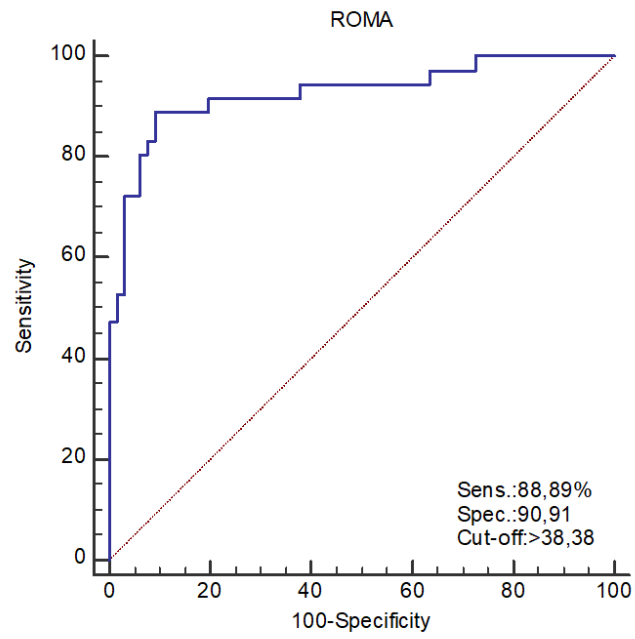
ROC krivulje HE4, CA 125, ROMA indeks u postmenopauzalnoj grupi ispitanica prikazane su na Slikama 14,15 i 16. Granična vrijednost korištena za analizu ROC krivulje je 99,8 pmol/L za HE4, a za CA 125 iznosi 45,8 U/mL dok je za ROMA indeks 38,38 %. Dijagnostička osjetljivost za HE4 i CA 125 iznosi 86,11 %, a za ROMA indeks je 88,89 %. Dijagnostička specifičnost za HE4 je 92,4, za ROMA indeks 90,91 %, a viša u usporedbi s dijagnostičkom specifičnosti od 86 % za CA 125. Rezultati pokazuju da površina ispod ROC krivulje u postmenopauzalnoj grupi za HE4 iznosi 0,928, za CA 125 iznosi 0,899 i 0,927 za ROMA indeks. Svi pokazatelji dijagnostičke točnosti prikazani su u **Error! Reference source not found.**



Slika 15. ROC krivulja za HE4 u postmenopauzalnoj grupi ispitanica



Slika 16. ROC krivulja za CA 125 u postmenopauzalnoj grupi ispitanica



Slika 17. ROC krivulja ROMA indeks u postmenopauzalnoj grupi ispitanica

Tablica 20. Dijagnostička osjetljivost i specifičnost HE4, CA 125 i ROMA indeksa u postmenopauzalnoj grupi ispitanica

Parametar	HE4	CA 125	ROMA indeks
AUC (95 % CI)	0,928 (0,859-0,970)	0,899 (0,823-0,950)	0,927 (0,726-0,969)
Standardna pogreška	0,0328	0,0338	0,0301
Granična vrijednost	> 99,8	> 45,8	> 38,4
Dijagnostička osjetljivost (95 % CI)	86,1 (70,5-95,3)	86,1 (70,5-95,3)	88,9 (73,9-96,9)
	91,2 % *	88,9 % *	91,7 % *
Dijagnostička specifičnost (95 % CI)	92,4 (83,2-97,5)	86,4 (75,7-93,6)	90,9 (81,3-96,6)
	80,3 % *	77,2 % *	80,3 % *
+ LR	11,37	6,31	9,78
- LR	0,15	0,16	0,12
P-vrijednost	< 0,001	< 0,001	< 0,001
PPV	75,6 %	77,5 %	91,2 %
	71,7 % *	68 % *	71,7 % *
NPV	92,4 %	91,9 %	95,2 %
	94,6 % *	92,7 % *	94,6 % *

Kratice: AUC – površina ispod krivulje; 95 % CI – 95 %-tni interval pouzdanosti; LR – omjer izgleda; PPV – pozitivna prediktivna vrijednost; NPV – negativna prediktivna vrijednost

*granična vrijednost proizvođača

8. RASPRAVA

Rak jajnika svoj naziv *tihi ubojica* duguje činjenici da je vodeći uzrok smrti između svih malignih bolesti ženskog reproduktivnog sustava, pri čemu većina bolesnica nema gotovo nikakve simptome u ranom stadiju bolesti. Rak jajnika predstavlja 8. sijelo prema učestalosti u žena s globalnom godišnjom incidencijom od 313 959 slučajeva. Činjenica da godišnje globalno 207 252 žena umre (90) od ove dijagnoze potvrđuje tezu da se kod većine bolesnica bolest otkriva u podmaklom stadiju. U uznapredovalom stadiju javljaju se nespecifični simptomi koji često zbunjuju jer upozoravaju na moguća benigna gastrointestinalna, urogenitalna i ginekološka stanja što dodatno odgađa trenutak dijagnoze. Otkrije li se rak jajnika u stadiju I prema FIGO klasifikaciji, nakon kirurškog i kemoterapijskog liječenja stopa petogodišnjeg preživljenja je iznad 90 %; čak i kada se bolest u stadiju II proširi na zdjelicu 70 % bolesnica preživi 5 godina. Međutim, kao što nažalost i naši rezultati potvrđuju, u najvećem udjelu bolesnica rak jajnika se otkriva prekasno (stadiji III i IV) radi čega prvih pet godina preživi tek jedna od pet bolesnica. Rak jajnika se primarno liječi citoredukcijskom kirurgijom nakon koje slijedi adjuvantna terapija platinom i taksanima, odnosno neoadjuvantnom terapijom na koju se nastavlja intervalna citoredukcija.

S obzirom na epidemiološke podatke i činjenicu da ne postoji dovoljno učinkovita metoda probira na rak jajnika, za ovo tumorsko sijelo bi iznimno bilo važno postojanje validiranog biljega kojeg karakterizira dostatna dijagnostička osjetljivost i dijagnostička specifičnost kako bi postavljanje dijagnoze bilo pouzdano i pravovremeno. Pri tome je prednost ukoliko je taj biljeg lako dostupan (cirkulirajući) i prognostički pouzdan. Uzimajući u obzir karakteristike patofiziološkog entiteta i epidemiološke reperkusije raka jajnika, težnja je k postojanju biljega koji bi ujedno bio pouzdan i u procjeni podtipova raka jajnika a ovisno o biološkim i kliničkim svojstvima (histološko podrijetlo, molekularne promjene). Nažalost, CA 125, premda najšire korišten serumski biljeg s u ginekološkoj onkologiji, kao individualni biljeg ranog stadija karcinoma jajnika epitelnog podrijetla ne pokazuje zadovoljavajuću osjetljivost, odnosno ne prepoznaje bolest. Više od pola bolesnica s karcinomom jajnika u ranom stadiju ima će vrijednosti CA 125 (<35 U/mL) niže od graničnih, dok su u predmenopauzalnih žena vrijednosti CA 125 nerijetko iznad graničnih. Dodatno, uz neka već prethodno spomenuta benigna stanja, CA 125 može biti povećan i radi menstruacije, endometrioze, upalnih bolesti zdjelice, ciroze, ali i u malignim bolestima koje nisu karcinom jajnika (karcinom endometrija, dojke, pluća i gušterače).

Značajan iskorak u ovoj problematici načinio je Moore prije 15-ak godina kada je postavio matematički model koji je osim CA 125 uključivao i HE4. Povezivanjem predoperacijskih vrijednosti tumorskih biljega CA 125, HE4 i menopauzalnog statusa u bolesnica s prisutnom masom u zdjelici nepoznate etiologije sa statusom bolesti (patohistološki nalaz) uspostavljena je formula za matematički izračun kojim se iskazuje vjerojatnost maligniteta od raka jajnika. Pri tome su konstante korištene u izračunu i granične vrijednosti različite s obzirom radi li se o ženama koje su u pre ili postmenopauzi. Klinika za tumore Centar za maligne bolesti Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice je visoko specijalizirana tercijarna zdravstvena institucija koja bilježi 55 godina kontinuiranog multidisciplinarnog pristupa u liječenju onkoloških bolesnika s načelom multidisciplinarnosti od osnutka do danas. Dugogodišnja tradicija i iskustvo kliničara u svim aspektima dijagnostike, liječenja i praćenja (specijalista ginekologije i opstetricije, internističkih onkologa, radioterapeuta, radiologa, citologa, patologa, medicinskog biokemičara) uzrok je povjerenja u instituciju i priljeva značajnog udjela od ukupnog broja žena oboljelih od raka jajnika u Republici Hrvatskoj. Načelo multidisciplinarnosti u pristupu liječenja onkoloških bolesnika je imperativ, kako nacionalnih tako i strateških dokumenata Europske Unije.

Na temelju članka 11. Zakona o sustavu strateškog planiranja i upravljanja razvojem Republike Hrvatske, Hrvatski sabor je na sjednici 15. prosinca 2020. donio Nacionalni strateški okvir protiv raka do 2030. (NN 141/2020) u kojem se navodi: „Kako bi se poboljšalo, i uz postojeće resurse optimiziralo, onkološko liječenje u Republici Hrvatskoj, sukladno Nacionalnom strateškom okviru protiv raka do 2030., potrebno je značajno unaprijediti organizaciju onkološke skrbi. Pri tome značajan segment predstavlja upravo promicanje multidisciplinarnih onkoloških timova koji donose odluke o racionalnoj dijagnostičkoj obradi pacijenta, čime se omogućuje brža obrada i efikasnije liječenje pacijenta sa zloćudnom bolešću.“ (91)

Sukladno dokumentu Europske komisije (Komunikacija Komisije Europskom parlamentu i Vijeću Europski plan za borbu protiv raka od 3.2.2021.) vodeća inicijativa je u poglavlju 5. Osiguravanje visokih standarda skrbi povezane s rakom je osnivanje nacionalnih centara za sveobuhvatnu skrb o oboljelima od raka u svim državama članicama (92). U ovom dokumentu istaknuto je da visokokvalitetna skrb povezana s rakom ovisi o više čimbenika, primjerice o visokokvalitetnoj radnoj snazi koja radi u multidisciplinarnim timovima, pravodobnom pristupu specijaliziranim uslugama za liječenje raka radi optimalnog liječenja uz zajamčeno osiguranje kvalitete i dostupnosti osnovnih lijekova i inovacija. Stoga ne čudi činjenica da je upravo u Klinici za tumore Centru za maligne bolesti KBC Sestre Milosrdnice načinjena prva

implementacija novog biljega HE4 u Republici Hrvatskoj. Svoja iskustva nakon dvije godine primjene ovog novog biljega i računskog izračuna ROMA indeksa podijeljena su organiziranjem multidisciplinarnih edukacija prilagođenih u jednom obliku za specijaliste ginekologije i opstetricije, a u drugom za medicinske biokemičare. Raznovrsnost specijalizacija predavača potvrdila je načelo multidisciplinarnosti jer su, pored ginekologa i medicinskih biokemičara, predavači bili specijalisti iz područja epidemiologije, patologije, citogije, radiologije, farmacije, onkologije te profesori s Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Nakon toga se dogodila značajna diseminacija određivanja ovog biljega u medicinsko-biokemijskim laboratorijima u RH, potaknuta vjerojatno i u međuvremenu rastućim brojem studija koje su ukazale na komparativnu prednost HE4 u odnosu na CA 125 kod bolesnica sa suspektom masom u zdjelici nepoznate etiologije. Pri tome je apsolutno najznačajniji argument značajno niži udio lažno pozitivnih rezultata HE4 kod benignih bolesti (ciste, miomi) u odnosu na CA 125.

Osim pokazatelja koji opisuju dijagnostičku značajnost HE4 u razlikovanju benignih i malignih tumora, za što je iz literature znano da ovaj biljeg ima prednost, ovim se istraživanjem ispitala značajnost sva tri parametra: HE4, CA 125 i ROMA indeksa u zloćudnim tumorima jajnika i ostalim podtipovima koje pokazuju osobine rasta i proliferacije, a koji mogu biti potencijalno malignog karaktera.

Životna dob predstavlja značajan neovisni čimbenik rizika za razvoj maligniteta jajnika u općoj populaciji. Medijan dobi se u većini zapadnih zemalja kreće oko 63 godine (93). U našem istraživanju 33 žene s rakom jajnika bile su prosječne životne dobi 62 godine (medijan je bio 61 godinu). Najmlađe su bile ispitanice koje su imale TLL s medijanom dobi od 49,0 (43,5-53,5) godina. Podskupina TLL koja je u ovom istraživanju poslužila i kao *kontrolna* grupa koja obuhvaća funkcionalne ciste koje nisu maligne i koje se javljaju tijekom reproduktivne dobi. Ispitanice s TLL su bile statistički značajno mlađe od ispitanica s benignim tumorima ($P = 0,003$); *borderline* promjenama ($P = 0,010$); ispitanica sa zloćudnim tumorima ($P < 0,001$) i presadnicama ($P < 0,001$). Posredni zaključak je da naši rezultati potvrđuju da učestalost raka jajnika raste sa životnom dobi. Starenje dovodi do brojnih promjena koje mogu utjecati na mnoge komponente imunološkog sustava. U novijim istraživanjima opisuje se proces imunološke disfunkcije i remodeliranja imunoloških organa što dovodi do promjena u imunološkoj funkciji koja je usko povezano s razvojem infekcija, autoimunih bolesti i malignih tumora (94). Upala se smatra ključnim mehanizmom za karcinogenezu (95), jer dolazi do lučenja interleukina i kemokina, reaktivnih kisikovih spojeva, čimbenika nekroze tumora i

prekomjerne produkcije lipidnih peroksida (31). Životna dob povezuje se s lošijom prognozom i većom stopom smrtnosti (96). Postoji nekoliko različitih hipoteza o patogenezi raka jajnika, a zajedničko im je da sve navode dugotrajan vremenski period koji je potreban da nastanu promjene povezane s proliferacijom i mogućom karcinogenezom. Približno 90 % tumora jajnika se razvija iz epitelnih stanica koje oblažu površinu jajnika (97), a 10-15 % je genetski uvjetovano (*BRCA* mutacije, Lynch sindrom i sl.) (98). Ove potonje se javljaju u ranijoj dobi.

Uz životnu dob, jedan od najvažnijih čimbenika rizika koji se povezuju s nastankom raka jajnika je menopauzalni status. Rak jajnika se može razviti kao rezultat dugotrajnog i nebalansiranog izlaganja estrogenima kao segmenta zamjenske hormonske terapije koja sadrži samo estrogen (99). Meta-analiza 52 europskih i američkih prospektivnih studija s obuhvaćenih 12 110 žena u postmenopauzi, dokazala je da visoki postotak korisnica hormonske nadomjesne terapije, njih 55 %, razvilo je rak jajnika neovisno kombinaciji trenutne ili nedavne uporabe, te duljini trajanja uzimanja (100). Rizik od raka jajnika bio je značajno povećan kod trenutnih korisnica, čak i kod onih koje su koristile hormonsku terapiju manje od 5 godina. U bivših korisnica, rizici su se smanjili prije nego što je primjena hormonske terapije prestala, ali su rizici tijekom prvih nekoliko godina nakon prestanka ostali značajni. Rizik od raka jajnika dokazan je kod trenutačnih korisnica hormonske terapije, a niži je nakon prestanka uporabe i varira ovisno o vrsti tumora, te snažno upućuju na uzročno-posljedičnu vezu. Uporaba hormonske terapije povećava vjerojatnost razvoja dva najčešća tipa raka jajnika: epitelnog i endometroidnog tipa.

Uporište ovim teorijama nalazimo i u našim rezultatima s obzirom da je potvrđen statistički značajno viši udio zloćudnih tumora (84,2 %; $P < 0,01$) u starijih žena (postmenopauzalna skupina ispitanica), dok je pak u predmenopauzalnih ispitanica dokazan statistički značajno veći udio TLL (65,22 %; $P = 0,001$). Time je potvrđeno da postmenopauzalne pacijentice treba dijagnostički obrađivati s posebnim oprezom ukoliko se postavi bilo kakva sumnja o postojanju tumorske mase. Objašnjenje zašto se rak jajnika javlja u značajno češće u postmenopauzi može se potkrijepiti i tzv. gonadotropinskom hipotezom o nastanku raka jajnika. Prema ovoj hipotezi rak jajnika se razvija uslijed prekomjerne stimulacije tkiva jajnika hipofiznim gonadotropinima (FSH i LH) čija je sekrecija kontrolirana s gonadotropin oslobađajućim hormonom (engl. *gonadotropin releasing hormone*, GnRH) iz hipotalamusa (101). GnRH je ključan u kontroli hipofiziotropne funkcije. GnRH je važan kao regulator proliferacije stanica i invazije u brojnim ljudskim malignim bolestima, uključujući karcinom jajnika. Specifično vezanje GnRH na njegov receptor dovodi do konformacijske promjene i aktivira heterotrimernu podjedinicu G-

proteina, što dovodi do prijenosa signala zbog otpuštanja iona kalcija i posljedično aktivaciju fosfolipaze c. Hidroliza fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfata stvara diacilglicerol i inozitol-1,4,5-trifosfat. Dolazi do difuzije iz membrane i aktiviranja receptora na endoplazmatskom retikulumu. To dovodi do odljeva kalcija u citosol, a diacilglicerol ostaje u membrani i inducira kalcijem ovisnu protein kinazu C koja u tijeku indukcije dovodi do sinteze gonadotropina (102). Neizravan dokaz koji ide u prilog ovoj hipotezi je činjenica da je u žena koje su u liječenju neplodnosti prolazile kroz cikluse indukcije ovulacije visokim dozama gonadotropina veća učestalost raka jajnika (103,104).

Općenito je prihvaćeno da je rak jajnika heterogena bolest kod koje čak i onda kada su prisutni individualni čimbenici rizika, postojanje okolišnih čimbenika predstavlja ključni okidač za inicijaciju bolesti (105–107).

TNM klasifikacija je podjela koju je predložila Međunarodna unija za borbu protiv karcinoma UICC (engl. *International Union Against Cancer*), pri čemu T označava lokalizaciju i opsežnost primarnog tumora, N regionalne limfne čvorove, a M označava prisustvo presadnica izvan regionalnog predjela (108). Pored TNM klasifikacije postoji i zbog praktičnosti je vrlo korištena FIGO podjela na stadije i proširenosti bolesti koju je predložila Međunarodna federacija ginekologa i opstetričara.

U našem istraživanju prema FIGO klasifikaciji u ispitanih bolesnica sa zloćudnim tumorima, s gotovo dvije trećine, najzastupljeniji je bio stadij IIIc (65,7 %). U skladu s time u ispitanica koje su imale zloćudne tumore najzastupljeniji je bio visoki histološki gradus 3 (kod 22 od 33 bolesnice ili 62,9 %). Dobiveni rezultati nažalost pokazatelji su proširenosti bolesti i povezani su sa agresivnijim tijekom uz skromnije mogućnosti liječenja. Razlog za to je vjerojatno kasno otkrivanje bolesti zbog nespecifičnih simptoma. Nespecifični znaci raka jajnika su: nelagoda i pritisak u zdjelici i abdomenu, osjećaj napuhnutosti i oticanja trbuha uslijed stvaranja i zadržavanja vode, poteškoće s probavom tj. osjećaj sitosti neposredno nakon započinjanja obroka, nemogućnost probavljanja hrane, konstipacija različitog intenziteta zbog narušene prohodnosti debelog crijeva, najčešće završnog dijela. Potom promjene u načinu mokrenja (npr. učestalije mokrenje), dispareunija (bol prilikom spolnog odnosa), mučnina uz gubitak apetita i kratkoća daha – obično radi nakupljanja tekućine u grudnom košu i trbušnoj šupljini također mogu ukazati na rak jajnika.

U našem istraživanju ispitano je postoji li razlika u protoku krvi u tumorima jajnika, a između podskupina patohistoloških tipova bolesti Kruskal-Wallisovim testom. Nisu utvrđene statistički

značajne razlike između svake od podskupina. Ovaj parametar protoka dobiven je primjenom ultrazvučne metode kolor doplerom kojim se pomoću zvučnih valova visoke frekvencije mjeri smjer i brzina protoka krvi u žilama. Dijagnoza tumora jajnika uz pomoć pulsno-kolor doplera temelji se na detekciji koju karakterizira niski otpor i visoki krvni protok koji su karakteristični za neovaskularizaciju. Fiziološki arteriole imaju unutrašnji mišićni sloj koji u tumorskim krvnim žilama, kao posljedica neoangiogeneze, nedostaje. Parametri koji se pri tome mogu koristiti za razlikovanje benignih od malignih tumora su: pulsatilni indeks (Pi), indeks otpora (Ri) i maksimalni protok u sistoli. Indikator za malignitet je $Pi > 1,0$ i $Ri < 0,4$.

Za razliku od protoka, razlike u volumenu tumora između podskupina patohistoloških tipova bolesti bile su statistički značajne. U našem istraživanju benigni tumori bili su značajno manji u odnosu na zloćudne ($P < 0,001$) i presadnice ($P = 0,021$). Nije dokazana statistički značajna razlika između volumena podskupine benignih tumora s jedne strane te podskupine *borderline* tumora ($P = 0,077$), kao niti između volumena *borderline* tumora i zloćudnih tumora ($P = 0,323$). Izmjereni volumeni bili su najveći u podskupini presadnica s medijanom vrijednosti 276,75 cm³. Međutim, razlika u protocima krvi između pojedinih patohistoloških podtipova nije bila statistički značajna ($P = 0,080$). Medijani vrijednosti bili su podjednaki za sve ispitanice (0,34 za skupinu presadnica, 0,43 za podskupinu zloćudnih tumora, 0,47 za podskupinu *borderline* tumora, 0,48 za podskupinu benignih tumora). Naši rezultati potvrdili su da volumen tumora izmjeren ultrazvučnom dijagnostikom, može biti jedan od pokazatelja koji će pomoći u daljnjoj dijagnostičkoj obradi, ali nikako presudan, isključiv, i samo dostatan. Osjetljivost i specifičnost transvaginalnih pokazatelja u diskriminaciji benignog od malignog nastoji povećati multiparametrijskim modelima poput indeksa rizika od malignosti (109), IOTA (engl. *International Ovarian Tumor Analysis*) (110), ADNEX (engl. *Assessment of Different Neoplasias in the adneXa*) (111) i dr. Oni uz različite ultrazvučne pokazatelje uključuju i druge varijable: dob, menopauzalni status, tumorske biljege.

Pušenje kao štetna životna navika predstavlja generalni čimbenik rizika za razvoj karcinoma (112). S obzirom na činjenicu da su istraživanja pokazala da je u 17 % bolesnica mucinozni karcinom jajnika (113) povezan s pušenjem, a da je incidencija pušenja u RH na samom vrhu europske ljestvice (114), opravdano je bilo ispitati postojanje moguće povezanosti patohistoloških tipova bolesti i pušačkog statusa, odnosno broja popušanih cigareta dnevno. Prema našim rezultatima nije dokazana povezanost patohistoloških tipova bolesti u odnosu na pušački status i broj popušanih cigareta dnevno, pretpostavljamo zbog nedovoljnog broja ispitanica.

U zadnjih desetak godina serumski HE4 je zauzeo značajno mjesto u istraživanjima kod bolesnica s tumorom jajnika, bilo kao samostalan biljeg, bilo u kombinaciji s drugim laboratorijskim parametrima, najčešće s CA 125 kao komponenta ROMA indeksa. Brojni potencijalni serumski biljezi raka jajnika: inhibin (115) osteopontin (116), mezotelin (117), apolipoprotein-1 (118), alfa-folatni receptor (119), kalikrenini (120), bikunin (121), VEGF (122) su testirani s ciljem potencijalno bolje dijagnostičke osjetljivosti.

Praćenje kombinacije biljega CA 125 i HE4 u bolesnica s rakom jajnika rezultira boljom osjetljivošću i negativnom prediktivnom vrijednošću u usporedbi korištenja samo jednog biljega. Koncentracija HE4 je statistički značajno veća u bolesnica s rakom jajnika i endometrija u usporedbi s zdravim ženama, a najviše vrijednosti su zabilježene kod epitelnog karcinoma jajnika (85). Kombiniranje HE4 i CA 125 pruža najveću preciznost i osjetljivost u razlikovanju ne samo žena s rakom jajnika od zdravih žena, već i od onih koje imaju endometriozu jajnika. Ovo sve čini HE4 visoko pozicioniranim tumorskim biljegom u razlikovanju benignih tumora jajnika i karcinoma, uključujući i tumore niskog zloćudnog potencijala (123). Utjecaj menopausalnog statusa na odnos vrijednosti HE4 i CA 125, te njihovu funkcionalnu korelaciju s konačnim ishodom 2008. godine prvi je zamijetio Moore. Upravo na temelju tog zapažanja i egzaktnih rezultata je dao model različitih konstanti korištenih u izračunu za pre i postmenopausalne žene. Pri tome su granične vrijednosti ROMA indeksa za stariju populaciju više.

U našem istraživanju se također HE4 pokazao kao biljeg koji dobro diferencira podskupine bolesnica. Najviše vrijednosti medijana i interkvartilnog raspona izmjerene su u podskupini zloćudnih tumora 302,7 (98,9-695,6 pmol/L). Mann-Whitney-ovim testom su potvrđene statistički značajne razlike HE4 bolesnica skupine zloćudnih tumora i onih ubrojanih u skupine: benignih tumora, tumora niskog zloćudnog potencijala i tumorima s lezijama sličnih tumoru ($P < 0001$). Vrijednosti medijana HE4 u ove tri podskupine bile su gotovo šest puta niže od medijana vrijednosti HE4 izmjerenog u podskupini zloćudnih tumora. Nešto niža, ali još uvijek značajna razlika zabilježena je između skupina zloćudnih tumora i presadnica ($P = 0,010$). Vrijednosti medijana u podskupini zloćudnih tumora gotovo su trostruko više od podskupine presadnica. Osim nadmoćnosti HE4 u odgovarajućem prepoznavanju endometrioze u odnosu na CA 125 (124), ovaj biljeg je potvrđen kao najbolji za otkrivanje raka jajnika u ranom stadiju (65), poglavito kod mlađih bolesnica (125). Ovim istraživanjem je dokazana statistički značajna ($P = 0,00435$) pozitivna korelacija između vrijednosti HE4 i FIGO klasifikacije (korelacijski koeficijent 0,475). Nalaz ove korelacije može imati uporište u činjenici da je samo prije desetak

godina za HE4 bila dokazana prognostička korisnost u prepoznavanju rane faze bolesti ili I stadija prema FIGO klasifikaciji (126), osobito za epitelni tumor jajnika (127), kao i za endometroidni tumor jajnika (128). Nadalje, s obzirom na više nego solidan prognostički potencijal HE4 u smislu pravovremenog prepoznavanja povrata bolesti, vjerojatno će u budućnosti biti šire korišten ne samo kao detektor rekurentnih epizoda, već i kao pokazatelj stanja tijekom primjene druge i treće linije kemoterapije (129). Temeljem naših prijašnjih rezultata HE4 i ROMA indeks zaživio je kao standardni pokazatelj u praćenju učinka liječenja. Prije godinu i pol je objavljeno meta-istraživanje kojim je analizirano 38 istraživanja sa sveukupno 14 745 ispitanica. Objedinjene vrijednosti osjetljivosti, specifičnosti, ROC krivulja i *odds ratio* za HE4 iznosile su 0,79 (95 % CI: 0,75-0,82), 0,92 (95 % CI: 0,87-0,95), 0,88 (95 % CI: 0,85-0,91), i 43 (95 % CI: 25-72) (130).

Mjerenjem tkivne ekspresije HE4 u podskupini zloćudnih tumora dobivene su najveće vrijednosti medijana, 95 % koje su bile statistički značajno veće od podskupine benignih tumora (61 %; $P = 0,049$), podskupine TLL (0 %; $P < 0,001$) i podskupine presadnica (30 %; $P = 0,030$). U podskupini TLL izmjerena je najmanja vrijednost tkivnog HE4 medijana 0 (min.-max.: 0 – 100). Osim svoje dodatne diskriminirajuće uloge u diferencijalnoj dijagnozi među epitelnim karcinomima jajnika, tkivni HE4 bit će dodatni biljeg s jednostavnim protokolom primjene i kada su CA 125 i/ili p53 kao patohistološki biljezi žarišne i/ili negativne. Naši rezultati se slažu s prvim takvim istraživanjem uz isti zaključak (131).

S obzirom da je dokazana promjena ekspresije tkivnog HE4 uvjetovana primjenom progesterona u hormonskoj terapiji hiperplazije endometrija srednjeg i niskog rizika, postavljena je teorija o mogućoj primjeni tkivnog HE4 kao pokazatelja moguće rezistencije na hormonsku terapiju (132).

Tkivni HE4 se pokazao korisnim ($P = 0,022$) u predviđanju PFS (engl. *progression-free survival*) i OS (engl. *overall survival*) ($P = 0,047$) kod bolesnica s epitelnim tumorom jajnika. Ekspresija tkivnog HE4 ili HE4 u serumu nisu neovisni čimbenici rezistencije na kemoterapiju ili preživljavanja, ali serumski HE4 može predvidjeti rezistenciju na kemoterapiju i PFS u žena u postmenopauzi (133).

Poboljšanja u smislu proširenja raspona diferencijalno dijagnostičkih mogućnosti u prepoznavanju epitelnog raka jajnika pripisuju se određivanju ekspresije tkivnog HE4 koji je pokazao statistički značajno bolja svojstva od pojedinačnog mjerenja serumskih CA 125 ($P < 0,001$) i HE4 ($P = 0,016$) njihovoj CA 125 i HE4 kombinaciji ($P = 0,018$) (134).

Značajno je manji broj objavljenih istraživanja s tkivnim HE4 u odnosu na cirkulacijski. Neki od istraživača nerijetko posežu za novim, takozvanim kompozitnim *scoring* sustavom koji obuhvaća između ostalog i tkivni HE4 (127). Intenzitet ekspresije tkivnog HE4 određuje se imunohistokemijskim postupkom. Semikvantitativno se procjenjuje intenzitet obojenja citoplazme i u konačnici izražava postotkom *pozitivnih* stanica. Visoka HE4 ekspresija podrazumijeva > 50 % stanica pozitivnih odnosno obojenih, a niska < 50 %. Intenzitet obojenja citoplazme se stupnjuje: 0 = negativan, 1 = slab, 2 = umjeren, 3 = jak; pri čemu 0 znači da nema pozitivnih stanica; 1 da je 1-24 % pozitivnih stanica; 2 da je 25-49 %; 3 da je 50-74 % i 4 da je 75-100 %.

Ekspresija tkivnog HE4 može statistički značajno unaprijed diferencirati anatomske mjeste sjela tumora; odnosno razlikovati tumor jajnika od tumora uterusa. U 89,6 % žena s tumorom jajnika imunohistokemijski je dokazana pojačana ekspresija tkivnog HE4 za razliku od svega 39,1 % s tumorom uterusa (135).

Uz pomoć Cox regresijske analize u 90 žena s epitelnim karcinomom jajnika određivanje ekspresije tkivnog HE4 stavljeno je u korelaciju s prognostičkim čimbenicima: dubinom infiltracije, poslijeoperacijskim povratom bolesti te prisutnošću presadnica. Medijani PFS i OS su bili 26,1 i 30,2 mjeseca kod HE4-pozitivnog epitelnog tumora jajnika i statistički su se značajno razlikovali ($P < 0,05$) u usporedbi s 31,4 i 35,6 mjeseci kod HE4-negativnog epitelnog tumora jajnika (136).

Medijani vrijednosti CA 125 u našem istraživanju bili su: 14,7 U/mL za ispitanice s TLL, 33 U/mL za ispitanice sa *borderline* tumorima, 35 U/mL sa benignim tumorima i statistički su bile značajno niže u usporedbi sa zloćudnim tumorima i presadnicama čiji je medijan vrijednosti 199 i 241,8 U/mL. Kruskal-Wallis-ovim testom dobivena je razina statističke značajnosti $p < 0,001$ kada su se usporedile istovremeno svih pet podskupina vrijednosti CA 125. Mann-Whitney-evim U testom međusobno su uspoređivani svi mogući parovi podskupina. Uspoređivanjem podskupine zloćudnih tumora s benignim odnosno zloćudnih tumora s TLL-om dobivena je razina statističke značajnosti $P < 0,001$, dok je uspoređivanjem podskupine zloćudnih tumora s TLL dobiveno $P = 0,002$. Ovim istraživanjem je dokazana statistički značajna ($P = 0,001$) pozitivna korelacija između vrijednosti CA 125 i FIGO klasifikacije (korelacijski koeficijent 0,530). To dokazuje da je CA 125 kao tradicionalno korišten biljag itekako koristan.

U istraživanju koje je objavljeno prije godinu dana, ispitan je dijagnostički potencijal CA 125 i HE4 kod 49 žena s rakom jajnika i 63 s benignim tumorima jajnika. Vrijednosti CA 125 i HE4 bile su značajno veće kod žena s rakom jajnika ($P < 0,001$), a HE4 je pokazao veću osjetljivost (77,5 % vs. 69,4 %), specifičnost (96,8 % vs. 82,5 %), pozitivnu prediktivnu vrijednost (PPV) (95 % vs. 75,6 %) i negativnu prediktivnu vrijednost (84,7 % vs. 77,6 %) od CA 125 (137). Ograničenje ovog istraživanja je činjenica da su zbirno obrađivane pre i postmenopauzalne pacijentice. Predložili su uspostavu sljedećih graničnih vrijednosti za HE4, CA 125 i ROMA indeksa 46,5 pmol/L, 126 U/mL i 16,7 % za ROMA indeks za postmenopauzalne žene.

Načinjena je regresijska analiza dobivenih rezultata, zasebno za predmenopauzalnu i postmenopauzalnu skupinu. U predmenopauzalnoj skupini je dobivena površina ispod površina ispod krivulja ROC za HE4 84,6 %, za CA 125 86,7 %, a za ROMA indeks 84,6 %. Dobivene granične vrijednosti u ROC analize su 86,1 pmol/L za HE4, za CA 125 40,7 U/mL, a za ROMA indeks 21,9 %. Dijagnostička osjetljivost iznosila je za HE4 85,7 %, za CA 125 75 %, a za ROMA indeks 85 %. Dijagnostička specifičnost iznosila je za HE4 80 %, za CA 125 69,3 %, a za ROMA indeks 62 %. Pozitivna prediktivna vrijednost iznosila je za HE4 67 %, za CA 125 35,3 %, a za ROMA indeks 67 %. Negativna prediktivna vrijednost iznosila je 92,4 % za HE4, 91,9 % za CA 125 kao i 95,2 % ROMA indeks. U postmenopauzalnoj skupini je dobivena površina ispod površina ispod krivulja ROC za HE4 92,8 %, za CA 125 89,9 %, a za ROMA indeks 92,7 %. Dobivene granične vrijednosti u ROC analize su 99,8 pmol/L za HE4, za CA 125 45,8 U/mL, a za ROMA indeks 38,4 %. Dijagnostička osjetljivost iznosila je za HE4 91,2 %, za CA 125 88,9 %, a za ROMA indeks 91,7 %. Dijagnostička specifičnost iznosila je za HE4 80,3 %, za CA 125 77,2 %, a za ROMA indeks 80,3 %. Pozitivna prediktivna vrijednost iznosila je za HE4 75,6 %, za CA 125 77,5 %, a za ROMA indeks 91,2 %. Negativna prediktivna vrijednost iznosila je 92,4 % za HE4, 91,9 % za CA 125 kao i 95,2 % ROMA indeks. Tumorski biljeg HE4, primijenjen na ispitanicama u našem istraživanju, predstavlja veći dijagnostički kapacitet od CA 125 u diferencijalnoj dijagnozi tumora bolesti jajnika, uglavnom u bolesnica prije menopauze, dok je ROMA indeks u postmenopauzalnoj skupini najkorisniji u usporedbi s CA 125 i HE4.

Prije nekoliko godina objavili smo istraživanje u kojemu smo pokušali kvantificirati pojedine komponente ROMA indeksa u bolesnica s prisutnom adneksalnom masom. Načinjena je regresijska analiza pomoću koje su dobivene pripadajuće diferencijalno dijagnostičke karakteristike kako za pojedinačne parametre (HE4 i CA 125), tako i za ROMA indeks. Zaključili smo da se značajno bolji dijagnostički potencijal u smislu manjeg broja lažno

pozitivnih i lažno negativnih, te posljedično poboljšanom osjetljivošću i specifičnošću dobije upotrebom viših graničnih vrijednosti za ROMA indeks (21,9 % za predmenopauzalne i 38,4 % za postmenopauzalne žene, umjesto od proizvođača preporučenih 11,7 % za predmenopauzalne i 29,9 % za postmenopauzalne žene) (138). Dvije godine nakon objavljivanja ovog istraživanja skupina kineskih autora je na velikom uzorku od 534 žena s rakom jajnika predložila nove granične vrijednosti HE4, CA 125 i ROMA indeksa za predmenopauzalne (73,87 pmol/L, 61,60 U/mL i 18,47 %) i postmenopauzalne bolesnice (120,90 pmol/L, 76,21 U/mL i 26,48 %). Ovakvom modifikacijom graničnih vrijednosti dosežu se gotovo idealne odnosno maksimalne vrijednosti dijagnostičke osjetljivosti, specifičnosti te negativne i pozitivne prediktivne vrijednosti (139). ROMA indeks ima veći dijagnostički kapacitet od biljega HE4 i CA 125 zasebno, a odnosi se na procjenu tumora bolesti jajnika kod bolesnica u postmenopauzi.

Dok većina prethodno citiranih autora dijeli bolesnice u dvije skupine: benigno i maligno; u našem istraživanju su ispitanice klasificirane na temelju kasnijeg dobivenog patohistološkog nalaza na daleko rafiniraniji način u čak pet podskupina. Iako je donekle limitirajući čimbenik ukupan broj ispitanica, otkrivene statistički značajne razlike između podskupina između nekih od određivanih parametara, opravdalo je upravo ovaj način prikazivanja rezultata.

Epitelni karcinom jajnika nastaje iz površinskog epitela jajnika. Rana bolest ograničena je na jajnik u obliku cističnog rasta. Bolest se obično širi transperitonealnom diseminacijom zloćudnih stanica s površine primarnog tumora, pri čemu se one implantiraju po cijeloj peritonealnoj šupljini. Značajan je put širenja limfnim putovima preko ovarijalnih u hipogastrične, ilijakalne i paraaortalne limfne čvorove, čak do lijeve supraklavikularne regije (140).

Pouzdan predoperacijsko razlikovanje malignog od benignog olakšava operateru izbor optimalnog operacijskog pristupa o čemu djelom ovisi i prognoza. Laparotomija je invazivni kirurški postupak kojim se klasičnim rezom otvara trbušna šupljina. Radi se u općoj anesteziji i u onim slučajevima kada postoje zapreke za obavljanje operacije laparoskopskim putem. Primarna laparotomija ne samo da omogućava sigurniji uvid u opseg raširenosti tumora, već omogućava radikalniji način kirurškog liječenja ukoliko se za njim pokaže potreba (141).

Studija Saffarieh i suradnika pokušala je odrediti koji bi bio *cut off* tj. granična vrijednost serumskih vrijednosti CA 125 i HE4 u optimalnom predviđanju citoreduktivnog kirurškog zahvata. Kod 110 bolesnica se pristupilo procijeni optimalnog kirurškog citoreduktivnog

strateškog pristupa prije operacije. Koncentracija HE4 u serumu > 170 pmol/L i CA 125 > 320 U/mL s osjetljivošću od 80 % i specifičnošću od 70 % predviđa optimalni tip citoredukcije prije operacije (142).

Antigen Ki-67 je stanični proliferacijski biljeg koji se rutinski određuje imunohistokemijskom metodom kao segment patohistološke analize tkiva izuzetog operacijom kod onkoloških bolesnika. Prisutan je u stanici tijekom svih aktivnih faza staničnog ciklusa (G_1 , S, G_2 i mitoze) i predstavlja, kao biljeg intenziteta stanične proliferacije i transkripcije RNA u ribosomima, pouzdani indirektni pokazatelj udjela rasta određivane stanične populacije. Stoga je on ujedno prognostički pokazatelj; više vrijednosti antigena Ki-67 negativan su prognostički pokazatelj. Koristi se i kao pokazatelj uspješnosti terapije, poglavito kod metastatske bolesti.

Najviše vrijednosti antigena Ki-67 određene su u podskupini zloćudnih tumora s medijanom (interkvartilnim rasponom) 31 % (19 – 58 %). Ustanovljena je statistički značajna razlika ($P < 0,001$) ove podskupine s podskupinama: benignih tumora, *borderline*, presadnica i TLL. Nije ustanovljena statistički značajna razlika razine ekspresije antigena Ki-67 između podskupina zloćudnih tumora i presadnica ($P = 0,183$). Očekivano, najniže vrijednosti postotka antigena Ki-67 određene su u podskupini benignih tumora. Najveća razlika je zabilježena u vrijednostima antigena Ki-67 ove skupine i podskupine presadnica i zloćudnih tumora ($P < 0,001$), dok su nešto manje, ali još uvijek značajne razlike zabilježene između podskupina benignih tumora s jedne strane te *borderline* ($P = 0,019$) i TLL ($P = 0,050$) s druge. Dobiveni Spearmanovi korelacijski koeficijenti u skupini zloćudnih tumora nisu pokazali postojanje međusobne ovisnosti vrijednosti antigena Ki-67 s histološkim gradusom tumora, FIGO klasifikacijom i ROMA indeksom. Parametri deskriptivne statistike bolesnica sa zloćudnim tumorima svrstanih temeljem pripadnosti histološkom gradusu od 1 do 3 koji se odnose na vrijednost izmjerenog intenziteta antigena Ki-67 pokazali su očekivane vrijednosti. Aritmetička sredina histološkog gradusa 1 bila je 5 %, histološkog gradusa 2 bila je 38 % te histološkog gradusa 3 bila je 43,10 %.

Širokom sveobuhvatnom meta analizom u koju je uključeno više od pet tisuća bolesnica s rakom jajnika je dokazano da se visoka razina ekspresije antigena Ki-67 može povezati s niskim preživljenjem odnosno poslužiti kao prognostički biljeg u populaciji bolesnica s rakom jajnika (143). Antigen Ki-67 predložen je i kao koristan pokazatelj praćenja uspješnosti terapije. U 123 pacijentica s ostatnom bolešću nakon kemoterapije i operacije, dobivene su prosječne vrijednosti ekspresije Ki-67 od 20 % ($P = 0,0004$) i najveće vrijednosti ekspresije Ki-67 od 50 % ($P = 0,0002$) koje bi mogle poslužiti kao granične vrijednosti razlikovanja pacijentica s

minimalnim odgovorom na kemoterapiju od grupe pacijentica s umjerenim odgovorom na kemoterapiju (144).

Medijani vrijednosti ROMA indeksa u našem istraživanju bili su: 12,41 % za ispitanice s TLL, 12,9 % s benignim tumorima, 18,53 % za ispitanice sa *borderline* tumorima, i statistički su bili značajno niži u usporedbi sa zloćudnim tumorima i presadnicama čiji su medijani vrijednosti iznosili 84,41 i 65 %. Kruskal-Wallis-ovim testom dobivena je razina statističke značajnosti $P < 0,001$ kada su se usporedile istovremeno svih pet podskupina vrijednosti ROMA indeksa. Mann-Whitney-evim U testom međusobno su uspoređivani svi mogući parovi podskupina. Uspoređivanjem podskupine zloćudnih tumora s benignim, odnosno zloćudnih tumora s TLL-om i zloćudnih tumora s *borderline* dobivena je razina statističke značajnosti $P < 0,001$. Podskupina *borderline* se statistički značajno razlikovala od TLL, presadnica i već gore spomenutih zloćudnih tumora. Ovim istraživanjem je dokazana statistički značajna ($P = 0,001$) pozitivna korelacija između vrijednosti ROMA indeksa i FIGO klasifikacije (korelacijski koeficijent 0,546). Vrijednost ROMA indeksa je statistički značajno pozitivno i visoko korelirala s vrijednostima HE4 i CA 125 ($P < 0,001$). Ovaj rezultat je logičan i razumljiv s obzirom da je ROMA indeks rezultat dobiven deriviranjem ovih pojedinačnih biljega.

U tablici 12. su prikazani objedinjeni podatci svih ispitanica temeljem vrijednosti ROMA indeksa svrstanih u skupine niskog i visokog rizika (pre i postmenopauzalne su diferencirane temeljem pripadajućih graničnih vrijednosti). Pomoću Fisherova egzaktnog testa utvrđena je statistički značajna razlika u: a) podskupini benignih tumora: 41 bolesnica (63,1 %) imalo je vrijednost ROMA indeksa u granicama niskog rizika, b) podskupini zloćudnih tumora: 34 bolesnice (45,3 %) imalo je vrijednost ROMA indeksa u granicama visokog rizika. Istražujući u više od 370 bolesnica s rakom jajnika potvrđeno je da su HE4, CA 125 i ROMA indeks pouzdaniji u diferencijaciji rizika kod postmenopauzalnih nego u predmenopauzalnih žena. Pri tome dijagnostičko – prognostičke karakteristike ROMA i HE4 ne samo da su bolje od CA 125, nego su ovisne i o patološkom tipu tumora (139).

Meta analizom ispitan je dijagnostički značaj istodobnog mjerenja serumskih koncentracija CA 125, CA 19-9 i HE4 u više od 20 istraživanja publiciranih između 2005. i 2021. godine. Ustanovljeno je da određivanje ova tri biljega u kombinaciji značajno povećava diskriminacijski potencijal, točnost i dijagnostičku učinkovitost u usporedbi sa samostalnim određivanjem CA 125 (145).

U postmenopauzalnoj skupini rezultati pokazuju da je površina ispod ROC krivulje u postmenopauzalnoj skupini za HE4 92,8 %, za CA 125 89,9 % i 92,7 % za ROMA indeks. Granična vrijednost korištena u analizi ROC krivulje iznosi 99,8 pmol/L za HE4, 45,8 U/mL za CA 125. Granica koja je dobila maksimalnu osjetljivost i specifičnost za ROMA indeks bila je 38,4 %. Dijagnostička osjetljivost ROMA indeksa (88,9 %) je bolja u odnosu na HE4 i CA 125 (86,1 %). S druge strane, dijagnostička specifičnost HE4 (92,4 %) veća je u usporedbi s CA 125 (86,4 %) i ROMA indeksom (90,9 %). Pozitivna prediktivna vrijednost za HE4 bile su 75,6 % za HE4, te 77,5 % za CA 125 u usporedbi s 91,2 % ROMA indeksom što dokazuje superiornost ROMA indeksa u postmenopauzalnoj skupini ispitanica. Negativna prediktivna vrijednost bila je visoka i podjednaka za sva tri ispitivana parametra: 94,6 % HE4, 92,7 % CA 125 i 94,6 % za ROMA indeks. Predoperacijski izmjereni rezultati dokazali su pouzdanost biljega HE4 i ROMA indeksa za razlikovanje benignih od malignih tumora jajnika i to uz višu graničnu vrijednost nego što je deklarirano od strane proizvođača.

9. ZAKLJUČAK

- Regresijskom analizom uspoređene su predoperacijske vrijednosti CA 125, HE4 i ROMA indeksa kod bolesnica s tumorima jajnika koji su naknadno klasificirani prema patohistološkoj analizi. Provjerila se pouzdanost HE4 i ROMA indeksa u usporedbi s CA 125 za usmjeravanje na karcinom jajnika kod bolesnica s prisutnom tumorskom adneksalnom masom u zdjelici nejasne etiologije neposredno prije same operacije, za razliku od ostalih patohistoloških podtipova. HE4 biljeg poboljšava dijagnostičku specifičnost CA 125 pri razlikovanju između benigne i maligne patologije, omogućujući kiruršku anticipaciju u slučaju mogućeg rezultata malignosti.
- Regresijska analiza rezultata pokazala je različitosti za predmenopauzalnu i postmenopauzalnu skupinu. U predmenopauzalnoj skupini dobivena je površina ispod krivulja ROC za HE4 84,6 %, za CA 125 86,7 %, a za ROMA indeks 84,6 %. Dobivene granične vrijednosti u ROC analizi jesu 86,1 pmol/L za HE4, za CA 125 40,7 U/mL, a za ROMA indeks 21,9 %. U postmenopauzalnoj skupini dobivena je površina ispod krivulja ROC za HE4 92,8 %, za CA 125 89,9 %, a za ROMA indeks 92,7 %. Dobivene granične vrijednosti u ROC analize jesu 99,8 pmol/L za HE4, za CA 125 45,8 U/mL, a za ROMA indeks 38,4 %. ROC krivulja potvrđuje da biljeg HE4 označava bolji izbor zbog dijagnostičkog kapaciteta nego biljeg CA 125 u svrhu diferencijalne dijagnoze tumora jajnika. Granične vrijednosti više su nego deklarirane prema proizvođaču te su se dokazale kao optimalne. Odabirom optimalnih graničnih vrijednosti može se poboljšati razlikovanje bolesnih od zdravih.
- Biljeg HE4 pokazao je najveću dijagnostičku specifičnost kod dijagnoze tumora jajnika u pacijentica u predmenopauzi. Dijagnostička specifičnost iznosila je za HE4 80 %, za CA 125 69,3 %, a za ROMA indeks 62 %. Dijagnostička osjetljivost iznosila je za HE4 85,7 %, za CA 125 75 %, a za ROMA indeks 85 % iz čega se vidi podjednaka snaga HE4 i ROMA indeksa za razvrstavanje bolesnica kao stvarno pozitivnih uz odabranu graničnu vrijednost. Pozitivna prediktivna vrijednost za HE4 jest 67 %, za CA 125 35,3 %, a za ROMA indeks 67 %. Negativna prediktivna vrijednost jest 92,4 % za HE4, 91,9 % za CA 125 kao i 95,2 % ROMA indeks.
- Dijagnostička osjetljivost iznosila je za HE4 91,2 %, za CA 125 88,9 %, a za ROMA indeks 91,7 %. Dijagnostička specifičnost iznosila je za HE4 80,3 %, za CA 125 77,2 %, a za ROMA indeks 80,3 %. Pozitivna prediktivna vrijednost iznosila je za HE4 75,6 %, za CA 125 77,5 %, a za ROMA indeks 91,2 %. Negativna prediktivna vrijednost iznosila je 92,4

% za HE4, 91,9 % za CA 125 kao i 95,2 %. Time je dokazano da ROMA indeks ima najbolju dijagnostičku sposobnost diferencijacije malignoga od benignog tumora u bolesnica u postmenopauzi.

- Navedeni rezultati potvrđuju zastupljenost zloćudnih tumora u skupini s visokim rizikom, dok su benigni tumori bili najzastupljeniji u skupini s niskim rizikom (usporedbom raspodjele visokoga i niskog rizika iz ROMA indeksa s obzirom na predmenopauzu i postmenopauzu).
- Na temelju dobivenih rezultata, a u skladu s objavljenim studijama, možemo zaključiti da HE4 i ROMA indeks nadmašuju CA 125 u diferencijalnoj dijagnozi tumora jajnika.
- Osjetljivost CA 125 u početnim fazama raka jajnika viša je od biljega HE4. S obzirom na veličinu uzorka naše studije, broj bolesnica u ranoj fazi bolesti nije bio statistički značajan te podupire potrebu provođenja većih multicentričnih studija.
- Ispitivanjem raspodjele patohistoloških tipova bolesti u skupinama ispitanica prema menopauzalnom statusu dokazan je značajno veći udio zloćudnih tumora, dok je u predmenopauzalnih ispitanica dokazan statistički značajno veći udio tumoru sličnih lezija. Karcinom jajnika javlja češće u postmenopauzi, pa svaku tumorsku masu treba pažljivo diferencijalno-dijagnostički obraditi. Vrijedi i suprotno, svaka se tumorska masa ne mora nužno smatrati malignom u reproduktivnoj fazi žene. Ograničenje je što su bolesnice uključene u ovo ispitivanje usmjerene u našu ustanovu koja je visoko specijalizirana za ginekološku onkologiju.
- Prema rezultatima, zloćudni tumori imali su najveće vrijednosti serumskog HE4. Najveće vrijednosti serumskog CA 125 zabilježene su u skupini presadnica. S obzirom na to da se ROMA indeks računa iz vrijednosti HE4 i CA 125, razlike u vrijednostima slične su kao i kod tih vrijednosti. Najveće vrijednosti ROMA indeksa bile su u zloćudnim tumorima. Dobivena je potvrda njegove hipotetske vrijednosti kao specifičnog biljega za karcinom jajnika. Taj je zaključak u skladu sa znanstvenim dokazima temeljem istraživanja na sličnim populacijama bolesnica.
- Antigen Ki-67 bio je eksprimiran u svim podskupinama ispitanica, a u skupini zloćudnih tumora značajno su veće vrijednosti u odnosu na sve ostale patohistološke tipove osim presadnica. To dokazuje da je proliferacija stanica važan međukorak prema mogućoj karcinogenezi te se može zaključiti da je Ki-67 koristan tkivni biljeg.
 - Tkivni HE4 bio je eksprimiran u svim podtipovima tumora jajnika, osim kod kontrolne grupe, što je bilo iznenađujuće. Može se zaključiti da dobiveni rezultati

nisu potvrdili literaturne podatke koji navode da je tkivni HE4 kao biljeg eksprimiran i u zdravom tkivu jajnika što označava kontrolna skupina. Zloćudni tumori imali su najveće vrijednosti tkivnog HE4 što upozorava na malignost, pa se može zaključiti da je određivanje tkivnog HE4 za karcinome jajnika korisno.

- Podudarnost kliničkog značaja ekspresije i serumske koncentracije HE4, Ki-67 i ROMA indeksa s FIGO klasifikacijom kao i procjena kliničkog značaja serumske koncentracije HE4 usporedbom s ekspresijom HE4 u tkivu sa stadijem bolesti razlikovala se po pojedinom parametru. Podaci se odnose na zloćudne tumore. Veća FIGO klasifikacija značajno pozitivno korelira s serumskim HE4 ($\rho = 0,475$, $P = 0,004$), CA 125 ($\rho = 0,530$, $P = 0,001$) te ROMA indeksom ($\rho = 0,546$, $P = 0,001$). S obzirom na jačinu korelacijskih koeficijenata najjača je značajna korelacija sa samim ROMA indeksom što upućuje i na kliničku važnost. Ki-67 nije značajno korelirao ni s histološkim gradusom, FIGO klasifikacijom, kao i ni s ROMA indeksom. Također, tkivni HE4 nije značajno korelirao s histološkim gradusom tumora i FIGO klasifikacijom. Histološki gradus tumora značajno ne korelira ni s jednom od navedenih kliničkih vrijednosti. Zaključak je da je najkorisniji ROMA indeks s obzirom na to da proizlazi kao matematički izračun, a temeljen je na izmjerenim vrijednostima HE4 i CA 125. Veće vrijednosti HE4 i CA 125 upozoravaju na uznapredovalu fazu bolesti kada dolazi do širenja izvan jajnika odnosno jajovoda.
- Možemo potvrditi, potkrijepljeno rezultatima dobivenima u našem istraživanju, da i HE4 i ROMA indeks ispunjavaju zahtjeve da budu katalogizirani kao učinkovite dijagnostičke metode za diferencijalnu dijagnostiku tumora jajnika, odnosno točnije zloćudnih tumora jajnika.

10. POPIS LITERATURE

1. Jordan SM, Bristow RE. Ovarian cancer biomarkers as diagnostic triage tests. *Curr Biomark Find.* veljača 2013.;3:35–42.
2. Petrić Miše B, Matković V, Belac Lovasić I, Fröbe A, Boraska-Jelavić T, Katić K, i ostali. Kliničke smjernice za dijagnozu, liječenje i praćenje bolesnica oboljelih od raka jajnika, jajovoda i potrbušnice. *Liječnički Vjesn.* prosinac 2021.;143(11–12):416–28.
3. Goff BA, Lowe KA, Kane JC, Robertson MD, Gaul MA, Andersen MR. Symptom triggered screening for ovarian cancer: a pilot study of feasibility and acceptability. *Gynecol Oncol.* veljača 2012.;124(2):230–5.
4. Menon U, Gentry-Maharaj A, Burnell M, Singh N, Ryan A, Karpinskyj C, i ostali. Ovarian cancer population screening and mortality after long-term follow-up in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial. *The Lancet.* lipanj 2021.;397(10290):2182–93.
5. Atallah GA, Abd. Aziz NH, Teik CK, Shafiee MN, Kampan NC. New Predictive Biomarkers for Ovarian Cancer. *Diagnostics.* ožujak 2021.;11(3):465.
6. Vanderpuye VD, Clemenceau JRV, Temin S, Aziz Z, Burke WM, Cevallos NL, i ostali. Assessment of Adult Women With Ovarian Masses and Treatment of Epithelial Ovarian Cancer: ASCO Resource-Stratified Guideline. *JCO Glob Oncol.* prosinac 2021.;(7):1032–66.
7. Sölétormos G, Duffy MJ, Hassan SOA, Verheijen RHM, Tholander B, Bast RC, i ostali. Clinical Use of Cancer Biomarkers in Epithelial Ovarian Cancer: Updated Guidelines From the European Group on Tumor Markers. *Int J Gynecol Cancer.* siječanj 2016.;26(1).
8. Sturgeon CM, Duffy MJ, Stenman UH, Lilja H, Brünner N, Chan DW, i ostali. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for Use of Tumor Markers in Testicular, Prostate, Colorectal, Breast, and Ovarian Cancers. *Clin Chem.* prosinac 2008.;54(12):e11–79.
9. Colombo N, Sessa C, du Bois A, Ledermann J, McCluggage WG, McNeish I, i ostali. ESMO–ESGO consensus conference recommendations on ovarian cancer: pathology and molecular biology, early and advanced stages, borderline tumours and recurrent disease†. *Ann Oncol.* svibanj 2019.;30(5):672–705.

10. Rutten MJ, Sonke GS, Westermann AM, van Driel WJ, Trum JW, Kenter GG, i ostali. Prognostic Value of Residual Disease after Interval Debulking Surgery for FIGO Stage IIIC and IV Epithelial Ovarian Cancer. *Obstet Gynecol Int.* svibanj 2015.;2015:464123.
11. National Comprehensive Cancer Network. Ovarian Cancer Including Fallopian Tube Cancer and Primary Peritoneal Cancer (Version 1.2024) [Internet]. 2024 [citirano 07. svibanj 2024.]. Dostupno na: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/ovarian.pdf
12. Marchetti C, Muzii L, Romito A, Benedetti Panici P. First-line treatment of women with advanced ovarian cancer: focus on bevacizumab. *OncoTargets Ther.* veljača 2019.;12:1095–103.
13. Tomao F, Bardhi E, Di Pinto A, Sassu CM, Biagioli E, Petrella MC, i ostali. Parp inhibitors as maintenance treatment in platinum sensitive recurrent ovarian cancer: An updated meta-analysis of randomized clinical trials according to BRCA mutational status. *Cancer Treat Rev.* studeni 2019.;80:101909.
14. Mancari R, Cutillo G, Bruno V, Vincenzoni C, Mancini E, Baiocco E, i ostali. Development of new medical treatment for epithelial ovarian cancer recurrence. *Gland Surg.* kolovoz 2020.;9(4):1149–63.
15. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, i ostali. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer.* kolovoz 2021.;149(4):778–89.
16. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske. Incidencija raka u Hrvatskoj 2020. Zagreb; 2022. Report No.: Bilten br. 45.
17. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Svjetski dan borbe protiv raka jajnika [Internet]. 2017 [citirano 18. svibanj 2024.]. Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/rak-jajnika/>
18. Sant M, Chirlaque Lopez MD, Agresti R, Sánchez Pérez MJ, Holleccek B, Bielska-Lasota M, i ostali. Survival of women with cancers of breast and genital organs in Europe 1999–2007: Results of the EURO CARE-5 study. *Eur J Cancer.* listopad 2015.;51(15):2191–205.
19. Mohammadian M, Ghafari M, Khosravi B, Salehiniya H, Aryaie M, Bakeshei FA, i ostali. Variations in the Incidence and Mortality of Ovarian Cancer and Their Relationship with the Human Development Index in European Countries in 2012. *Biomed Res Ther.* kolovoz 2017.;4(08):1541–57.

20. Fujita M, Tase T, Kakugawa Y, Hoshi S, Nishino Y, Nagase S, i ostali. Smoking, Earlier Menarche and Low Parity as Independent Risk Factors for Gynecologic Cancers in Japanese: A Case-Control Study. *Tohoku J Exp Med.* listopad 2008.;216(4):297–307.
21. Chiaffarino F, Pelucchi C, Parazzini F, Negri E, Franceschi S, Talamini R, i ostali. Reproductive and hormonal factors and ovarian cancer. *Ann Oncol.* ožujak 2001.;12(3):337–41.
22. Pearce CL, Templeman C, Rossing MA, Lee A, Near AM, Webb PM, i ostali. Association between endometriosis and risk of histological subtypes of ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. *Lancet Oncol.* travanj 2012.;13(4):385–94.
23. Momenimovahed Z, Tiznobaik A, Taheri S, Salehiniya H. Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. *Int J Womens Health.* travanj 2019.;11:287–99.
24. Bandera EV, Lee VS, Qin B, Rodriguez-Rodriguez L, Powell CB, Kushi LH. Impact of body mass index on ovarian cancer survival varies by stage. *Br J Cancer.* srpanj 2017.;117(2):282–9.
25. Camargo MC, Stayner LT, Straif K, Reina M, Al-Alem U, Demers PA, i ostali. Occupational Exposure to Asbestos and Ovarian Cancer: A Meta-analysis. *Environ Health Perspect.* rujan 2011.;119(9):1211–7.
26. Wentzensen N, O'Brien KM. Talc, body powder, and ovarian cancer: A summary of the epidemiologic evidence. *Gynecol Oncol.* listopad 2021.;163(1):199–208.
27. Faber MT, Kjær SK, Dehlendorff C, Chang-Claude J, Andersen KK, Høgdall E, i ostali. Cigarette smoking and risk of ovarian cancer: a pooled analysis of 21 case-control studies. *Cancer Causes Control.* svibanj 2013.;24(5):989–1004.
28. Gram IT, Lukanova A, Brill I, Braaten T, Lund E, Lundin E, i ostali. Cigarette smoking and risk of histological subtypes of epithelial ovarian cancer in the EPIC cohort study. *Int J Cancer.* svibanj 2012.;130(9):2204–10.
29. Webb PM, Jordan SJ. Global epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* svibanj 2024.;21(5):389–400.
30. Nik NN, Vang R, Shih IM, Kurman RJ. Origin and Pathogenesis of Pelvic (Ovarian, Tubal, and Primary Peritoneal) Serous Carcinoma. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* siječanj 2014.;9(Volume 9, 2014):27–45.

31. Sánchez-Prieto M, Sánchez-Borrego R, Lubián-López DM, Pérez-López FR. Etiopathogenesis of ovarian cancer. An inflamm-aging entity? *Gynecol Oncol Rep. kolovoz 2022.*;42:101018.
32. Browning L, Patel MR, Horvath EB, Tawara K, Jorcyk CL. IL-6 and ovarian cancer: inflammatory cytokines in promotion of metastasis. *Cancer Manag Res. prosinac 2018.*;10:6685–93.
33. Fathalla MF. Incessant ovulation - a factor in ovarian neoplasia? *The Lancet. srpanj 1971.*;298(7716):163.
34. Kurman RJ, Shih IM. The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer: A Proposed Unifying Theory. *Am J Surg Pathol. ožujak 2010.*;34(3):433.
35. Shih IM, Wang Y, Wang TL. The Origin of Ovarian Cancer Species and Precancerous Landscape. *Am J Pathol. siječanj 2021.*;191(1):26–39.
36. Kurman R, Carcangiu M, Herrington C, Young R, urednici. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. 4. izd. Lyon: IARC; 2014.
37. Babarović E, Krašević M, Eminović S. Novi model patogeneze karcinoma jajnika. *Med Flum. rujan 2016.*;52(3):362–9.
38. Cree IA, White VA, Indave BI, Lokuhetty D. Revising the WHO classification: female genital tract tumours. *Histopathology. siječanj 2020.*;76(1):151–6.
39. Yin BWT, Dnistrian A, Lloyd KO. Ovarian cancer antigen CA125 is encoded by the MUC16 mucin gene. *Int J Cancer. travanj 2002.*;98(5):737–40.
40. Bottoni P, Scatena R. The Role of CA 125 as Tumor Marker: Biochemical and Clinical Aspects. U: Scatena R, urednik. *Advances in Cancer Biomarkers: From biochemistry to clinic for a critical revision.* Dordrecht: Springer Netherlands; 2015. str. 229–44.
41. Streppel MM, Vincent A, Mukherjee R, Campbell NR, Chen SH, Konstantopoulos K, i ostali. Mucin 16 (cancer antigen 125) expression in human tissues and cell lines and correlation with clinical outcome in adenocarcinomas of the pancreas, esophagus, stomach, and colon. *Hum Pathol. listopad 2012.*;43(10):1755–63.
42. Yin BWT, Lloyd KO. Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *J Biol Chem. srpanj 2001.*;276(29):27371–5.

43. Bast RC, Feeney M, Lazarus H, Nadler LM, Colvin RB, Knapp RC. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest.* studeni 1981.;68(5):1331–7.
44. Seki K, Kikuchi Y, Uesato T, Kato K. Increased Serum Ca 125 Levels During the First Trimester of Pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand.* siječanj 1986.;65(6):583–5.
45. Čvorišćec D. Tumorski biljezi u kliničkoj praksi [Internet]. 2012 [citirano 09. svibanj 2024.]. Dostupno na: https://www.hkmb.hr/dokumenti/2012/Tumorski-biljezi-u-klin-praksi_HKMB.pdf
46. Falconer H, Bambra CS, Chai D, Cornillie FJ, Hill JA, D’Hooghe TM. The effect of endometriosis, cycle stage, lymphocyte suppression and pregnancy on CA-125 levels in peritoneal fluid and serum in baboons. *Hum Reprod.* studeni 2005.;20(11):3033–8.
47. Sevinc A, Adli M, Kalender ME, Camci C. Benign causes of increased serum CA-125 concentration. *Lancet Oncol.* prosinac 2007.;8(12):1054–5.
48. Miralles C, Orea M, España P, Provencio M, Sánchez A, Cantos B, i ostali. Cancer Antigen 125 Associated With Multiple Benign and Malignant Pathologies. *Ann Surg Oncol.* ožujak 2003.;10(2):150–4.
49. Hu X, Zhang J, Cao Y. Factors associated with serum CA125 level in women without ovarian cancer in the United States: a population-based study. *BMC Cancer.* svibanj 2022.;22(1):544.
50. Duffy MJ, Bonfrer JM, Kulpa J, Rustin GJS, Soletormos G, Torre GC, i ostali. CA125 in ovarian cancer: European Group on Tumor Markers guidelines for clinical use. *Int J Gynecol Cancer.* rujan 2005.;15(5).
51. Molina R, Escudero JM, Augé JM, Filella X, Foj L, Torné A, i ostali. HE4 a novel tumour marker for ovarian cancer: comparison with CA 125 and ROMA algorithm in patients with gynaecological diseases. *Tumor Biol.* prosinac 2011.;32(6):1087–95.
52. Fotopoulou C, Sehouli J, Ewald-Riegler N, Gregorio N de, Reuss A, Richter R, i ostali. The Value of Serum CA125 in the Diagnosis of Borderline Tumors of the Ovary: A Subanalysis of the Prospective Multicenter ROBOT Study. *Int J Gynecol Cancer.* rujan 2015.;25(7).
53. National Institute for Health and Care Excellence. Appendix: Risk of malignancy index (RMI I) [Internet]. 2023 [citirano 07. svibanj 2024.]. Dostupno na:

<https://www.nice.org.uk/guidance/cg122/chapter/Appendix-Risk-of-malignancy-index-RMI-I>

54. Timmerman D, Ameye L, Fischerova D, Epstein E, Melis GB, Guerriero S, i ostali. Simple ultrasound rules to distinguish between benign and malignant adnexal masses before surgery: prospective validation by IOTA group. *BMJ*. prosinac 2010.;341:c6839.
55. Merlo S, Besic N, Drmota E, Kovacevic N. Preoperative Serum CA-125 Level As a Predictor for The Extent of Cytoreduction in Patients with Advanced Stage Epithelial Ovarian Cancer. *Radiol Oncol. kolovoz 2021.*;55(3):341–6.
56. Gupta M, Patel SM, Arora R, Tiwari R, Dave P, Desai A, i ostali. Does preoperative CA-125 cutoff value and percent reduction in CA-125 levels correlate with surgical and survival outcome after neoadjuvant chemotherapy in patients with advanced-stage ovarian cancer? – Our experience from a tertiary cancer institute. *South Asian J Cancer. ožujak 2020.*;9(1):30–3.
57. Yoo SC, Yoon JH, Lyu MO, Kim WY, Chang SJ, Chang KH, i ostali. Significance of postoperative CA-125 decline after cytoreductive surgery in stage IIIC/IV ovarian cancer. *J Gynecol Oncol. rujan 2008.*;19(3):169–72.
58. Kirchhoff C, Habben I, Ivell R, Krull N. A Major Human Epididymis-Specific cDNA Encodes a Protein with Sequence Homology to Extracellular Proteinase Inhibitors1. *Biol Reprod. kolovoz 1991.*;45(2):350–7.
59. Welsh JB, Zarrinkar PP, Sapinoso LM, Kern SG, Behling CA, Monk BJ, i ostali. Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci. siječanj 2001.*;98(3):1176–81.
60. Fejzo MS, Dering J, Ginther C, Anderson L, Ramos L, Walsh C, i ostali. Comprehensive analysis of 20q13 genes in ovarian cancer identifies ADRM1 as amplification target. *Genes Chromosomes Cancer. listopad 2008.*;47(10):873–83.
61. Bingle L, Cross SS, High AS, Wallace WA, Rassl D, Yuan G, i ostali. WFDC2 (HE4): A potential role in the innate immunity of the oral cavity and respiratory tract and the development of adenocarcinomas of the lung. *Respir Res. travanj 2006.*;7(1):61.
62. Galgano MT, Hampton GM, Frierson HF. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. *Mod Pathol. siječanj 2006.*;19(6):847–53.

63. Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, Mok SC, Crum CP, Welch WR, i ostali. Human Epididymis Protein 4 (HE4) Is a Secreted Glycoprotein that Is Overexpressed by Serous and Endometrioid Ovarian Carcinomas. *Cancer Res.* ožujak 2005.;65(6):2162–9.
64. Hellström I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, Ledbetter JA, Schummer M, McIntosh M, i ostali. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res.* srpanj 2003.;63(13):3695–700.
65. Moore RG, Brown AK, Miller MC, Skates S, Allard WJ, Verch T, i ostali. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol.* veljača 2008.;108(2):402–8.
66. Moore RG, McMeekin DS, Brown AK, DiSilvestro P, Miller MC, Allard WJ, i ostali. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol.* siječanj 2009.;112(1):40–6.
67. Moore RG, Miller MC, Eklund EE, Lu KH, Bast RC, Lambert-Messerlian G. Serum levels of the ovarian cancer biomarker HE4 are decreased in pregnancy and increase with age. *Am J Obstet Gynecol.* travanj 2012.;206(4):349.e1-349.e7.
68. Bolstad N, Øijordsbakken M, Nustad K, Bjerner J. Human epididymis protein 4 reference limits and natural variation in a Nordic reference population. *Tumor Biol.* veljača 2012.;33(1):141–8.
69. Anastasi E, Granato T, Marchei GG, Viggiani V, Colaprisca B, Comploj S, i ostali. Ovarian tumor marker HE4 is differently expressed during the phases of the menstrual cycle in healthy young women. *Tumor Biol.* listopad 2010.;31(5):411–5.
70. Nagy B, Krasznai ZT, Balla H, Csobán M, Antal-Szalmás P, Hernádi Z, i ostali. Elevated human epididymis protein 4 concentrations in chronic kidney disease. *Ann Clin Biochem.* srpanj 2012.;49(4):377–80.
71. Hellstrom I, Heagerty PJ, Swisher EM, Liu P, Jaffar J, Agnew K, i ostali. Detection of the HE4 protein in urine as a biomarker for ovarian neoplasms. *Cancer Lett.* listopad 2010.;296(1):43–8.
72. Wang L, Sun Y, Cai X, Fu G. The diagnostic value of human epididymis protein 4 as a novel biomarker in patients with renal dysfunction. *Int Urol Nephrol.* studeni 2018.;50(11):2043–8.

73. Chudecka-Głaz AM. ROMA, an algorithm for ovarian cancer. *Clin Chim Acta*. veljača 2015.;440:143–51.
74. Moore RG, Miller MC, Disilvestro P, Landrum LM, Gajewski W, Ball JJ, i ostali. Evaluation of the Diagnostic Accuracy of the Risk of Ovarian Malignancy Algorithm in Women With a Pelvic Mass. *Obstet Gynecol*. kolovoz 2011.;118(2 Pt 1):280–8.
75. Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*. lipanj 2018.;127(2):175–86.
76. Uxa S, Castillo-Binder P, Kohler R, Stangner K, Müller GA, Engeland K. Ki-67 gene expression. *Cell Death Differ*. prosinac 2021.;28(12):3357–70.
77. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol*. ožujak 2000.;182(3):311–22.
78. Sobocki M, Mrouj K, Colinge J, Gerbe F, Jay P, Krasinska L, i ostali. Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels. *Cancer Res*. svibanj 2017.;77(10):2722–34.
79. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M, i ostali. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat*. lipanj 2013.;139(2):539–52.
80. Sylvia MT, Kumar S, Dasari P. The expression of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, Her-2-neu, p53 and Ki-67 in epithelial ovarian tumors and its correlation with clinicopathologic variables. *Indian J Pathol Microbiol*. 2012.;55(1):33–7.
81. Mahadevappa A, Krishna SM, Vimala MG. Diagnostic and Prognostic Significance of Ki-67 Immunohistochemical Expression in Surface Epithelial Ovarian Carcinoma. *J Clin Diagn Res JCDR*. veljača 2017.;11(2):EC08-EC12.
82. Ethier JL, Fuh KC, Arend R, Konecny GE, Konstantinopoulos PA, Odunsi K, i ostali. State of the Biomarker Science in Ovarian Cancer: A National Cancer Institute Clinical Trials Planning Meeting Report. *JCO Precis Oncol*. prosinac 2022.;(6):e2200355.
83. Heo J, Kim YN, Shin S, Lee K, Lee JH, Lee YJ, i ostali. Serial Circulating Tumor DNA Analysis with a Tumor-Naïve Next-Generation Sequencing Panel Detects Minimal

- Residual Disease and Predicts Outcome in Ovarian Cancer. *Cancer Res.* veljača 2024.;84(3):468–78.
84. Szczerba A, Śliwa A, Pieta PP, Jankowska A. The Role of Circulating Tumor Cells in Ovarian Cancer Dissemination. *Cancers.* siječanj 2022.;14(24):6030.
 85. Matsas A, Stefanoudakis D, Troupis T, Kontzoglou K, Eleftheriades M, Christopoulos P, i ostali. Tumor Markers and Their Diagnostic Significance in Ovarian Cancer. *Life.* kolovoz 2023.;13(8):1689.
 86. F. Hoffmann-La Roche Ltd. ROCHE - eLabDoc [Internet]. 2024 [citirano 10. svibanj 2024.]. Dostupno na: <https://elabdoc-prod.roche.com/eLD/web/global/en/home>
 87. Kurjak A, i suradnici. *Ultrazvuk u ginekologiji i perinatologiji.* 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2019.
 88. Udovičić M, Baždarić K, Bilić-Zulle L, Petrovečki M. Što treba znati kada izračunavamo koeficijent korelacije? *Biochem Medica.* lipanj 2007.;17(1):10–5.
 89. Šimundić AM. Dijagnostička točnost. U: Petrovečki, Mladen, Bilić-Zulle, Lidija, urednici. *Statistička obradba podataka u biomedicinskim istraživanjima.* Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 95–102.
 90. World Cancer Research Fund. Ovarian cancer statistics [Internet]. 2022 [citirano 10. svibanj 2024.]. Dostupno na: <https://www.wcrf.org/cancer-trends/ovarian-cancer-statistics/>
 91. Narodne novine. Nacionalni strateški okvir protiv raka do 2030. [Internet]. 2020. Dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2020_12_141_2728.html
 92. Europska komisija. Europski plan za borbu protiv raka [Internet]. 2021. Dostupno na: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=COM:2021:44:FIN>
 93. Bandera EV, Lee VS, Rodriguez-Rodriguez L, Powell CB, Kushi LH. Racial/Ethnic Disparities in Ovarian Cancer Treatment and Survival. *Clin Cancer Res.* studeni 2016.;22(23):5909–14.
 94. Feehan J, Tripodi N, Apostolopoulos V. The twilight of the immune system: The impact of immunosenescence in aging. *Maturitas.* svibanj 2021.;147:7–13.
 95. Savant SS, Sriramkumar S, O'Hagan HM. The Role of Inflammation and Inflammatory Mediators in the Development, Progression, Metastasis, and Chemoresistance of Epithelial Ovarian Cancer. *Cancers.* kolovoz 2018.;10(8):251.

96. Tortorella L, Vizzielli G, Fusco D, Cho WC, Bernabei R, Scambia G, i ostali. Ovarian Cancer Management in the Oldest Old: Improving Outcomes and Tailoring Treatments. *Aging Dis.* listopad 2017.;8(5):677.
97. Bell R, Petticrew M, Luengo S, Sheldon T. Screening for ovarian cancer: a systematic review. *Health Technol Assess.* 1998.;2(2):i–iv, 1–84.
98. Lynch HT, Snyder C, Casey MJ. Hereditary ovarian and breast cancer: what have we learned? *Ann Oncol.* studeni 2013.;24:viii83–95.
99. Trifanescu OG, Gales LN, Trifanescu RA, Anghel RM. Clinical Prognostic Factors in pre- and Post-Menopausal Women with Ovarian Carcinoma. *Acta Endocrinol Buchar.* rujanj 2018.;14(3):353–9.
100. Collaborative Group On Epidemiological Studies Of Ovarian Cancer, Beral V, Gaitskell K, Hermon C, Moser K, Reeves G, i ostali. Menopausal hormone use and ovarian cancer risk: individual participant meta-analysis of 52 epidemiological studies. *Lancet.* svibanj 2015.;385(9980):1835–42.
101. Lukanova A, Kaaks R. Endogenous Hormones and Ovarian Cancer: Epidemiology and Current Hypotheses. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* siječanj 2005.;14(1):98–107.
102. Gründker C, Emons G. Role of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) in Ovarian Cancer. *Cells.* veljača 2021.;10(2):437.
103. Tomao F, Lo Russo G, Spinelli GP, Stati V, Prete AA, Prinzi N, i ostali. Fertility drugs, reproductive strategies and ovarian cancer risk. *J Ovarian Res.* svibanj 2014.;7(1):51.
104. Rizzuto I, Behrens RF, Smith LA. Risk of ovarian cancer in women treated with ovarian stimulating drugs for infertility. *Cochrane Database Syst Rev.* lipanj 2019.;(6).
105. Kachuri L, Graff RE, Smith-Byrne K, Meyers TJ, Rashkin SR, Ziv E, i ostali. Pan-cancer analysis demonstrates that integrating polygenic risk scores with modifiable risk factors improves risk prediction. *Nat Commun.* studeni 2020.;11(1):6084.
106. Huang M, Xiao J, Nasca PC, Liu C, Lu Y, Lawrence WR, i ostali. Do multiple environmental factors impact four cancers in women in the contiguous United States? *Environ Res.* prosinac 2019.;179:108782.
107. Tanha K, Mottaghi A, Nojomi M, Moradi M, Rajabzadeh R, Lotfi S, i ostali. Investigation on factors associated with ovarian cancer: an umbrella review of systematic review and meta-analyses. *J Ovarian Res.* studeni 2021.;14(1):153.

108. Rosen RD, Sapra A. TNM Classification. U: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024.
109. Jacobs I, Oram D, Fairbanks J, Turner J, Frost C, Grudzinskas JG. A risk of malignancy index incorporating CA 125, ultrasound and menopausal status for the accurate preoperative diagnosis of ovarian cancer. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* listopad 1990.;97(10):922–9.
110. Timmerman D, Testa AC, Bourne T, Ameye L, Jurkovic D, Van Holsbeke C, i ostali. Simple ultrasound-based rules for the diagnosis of ovarian cancer. *Ultrasound Obstet Gynecol.* lipanj 2008.;31(6):681–90.
111. Sayasneh A, Ferrara L, De Cock B, Saso S, Al-Memar M, Johnson S, i ostali. Evaluating the risk of ovarian cancer before surgery using the ADNEX model: a multicentre external validation study. *Br J Cancer.* kolovoz 2016.;115(5):542–8.
112. Centers for Disease Control and Prevention (US), National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US), Office on Smoking and Health (US). *How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General.* Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2010.
113. Zhang Y, Coogan PF, Palmer JR, Strom BL, Rosenberg L. Cigarette Smoking and Increased Risk of Mucinous Epithelial Ovarian Cancer. *Am J Epidemiol.* siječanj 2004.;159(2):133–9.
114. OECD, European Observatory on Health Systems and Policies. *Hrvatska: pregled stanja zdravlja i zdravstvene zaštite 2021.* Paris: OECD Publishing; 2022.
115. Modarres Guilani M, Karimi M. Inhibin as A Tumor Marker in Postmenopausal Women with Ovarian Malignancies. *Basic Clin Cancer Res.* travanj 2014.;6(2):23–6.
116. Rani S, Sehgal A, Kaur J, Pandher DK, Punia RS. Osteopontin as a Tumor Marker in Ovarian Cancer. *J -Life Health.* rujan 2022.;13(3):200.
117. Giordano G, Ferioli E, Tafuni A. The Role of Mesothelin Expression in Serous Ovarian Carcinoma: Impacts on Diagnosis, Prognosis, and Therapeutic Targets. *Cancers.* siječanj 2022.;14(9):2283.

118. Macuks R, Baidekalna I, Gritcina J, Avdejeva A, Donina S. Apolipoprotein A1 and Transferrin as Biomarkers in Ovarian Cancer Diagnostics. *Acta Chir Latv.* siječanj 2010.;10(2):16–20.
119. Farran B, Albayrak S, Abrams J, Tainsky MA, Levin NK, Morris R, i ostali. Serum folate receptor α (sFR) in ovarian cancer diagnosis and surveillance. *Cancer Med.* ožujak 2019.;8(3):920–7.
120. Riedel M, Bronger H, Magdolen V, Dreyer T. The prognostic and diagnostic potential of kallikrein-related peptidases in ovarian cancer. *Expert Rev Mol Diagn.* lipanj 2021.;21(6):535–45.
121. Chałupnik A, Chilimoniuk Z, Dobosz M, Sobstyl A, Sobstyl M. The latest reports on biomarkers used in the diagnosis of ovarian cancer. *J Educ Health Sport.* kolovoz 2022.;12(7):799–809.
122. Giampaolino P, Foreste V, Della Corte L, Di Filippo C, Iorio G, Bifulco G. Role of biomarkers for early detection of ovarian cancer recurrence. *Gland Surg.* kolovoz 2020.;9(4):1102–11.
123. Huhtinen K, Suvitie P, Hiissa J, Junnila J, Huvila J, Kujari H, i ostali. Serum HE4 concentration differentiates malignant ovarian tumours from ovarian endometriotic cysts. *Br J Cancer.* travanj 2009.;100(8):1315–9.
124. Braicu EI, Krause CL, Torsten U, Mecke H, Richter R, Hellmeyer L, i ostali. HE4 as a serum biomarker for the diagnosis of pelvic masses: a prospective, multicenter study in 965 patients. *BMC Cancer.* srpanj 2022.;22(1):831.
125. Chen X, Zhou H, Chen R, He J, Wang Y, Huang L, i ostali. Development of a multimarker assay for differential diagnosis of benign and malignant pelvic masses. *Clin Chim Acta.* veljača 2015.;440:57–63.
126. Kondalsamy-Chennakesavan S, Hackethal A, Bowtell D, Obermair A. Differentiating stage 1 epithelial ovarian cancer from benign ovarian tumours using a combination of tumour markers HE4, CA125, and CEA and patient's age. *Gynecol Oncol.* lipanj 2013.;129(3):467–71.
127. Sethi A, Kumar L, Mathur S, Mahey R, Kachhawa G, Bhatla N. Prognostic Significance of HE4 Tissue Expression in Serous Epithelial Ovarian Carcinoma. *South Asian J Cancer.* travanj 2022.;11(2):125–32.

128. Presl J, Ovesna P, Novotny Z, Vlasak P, Bouda J, Kostun J, i ostali. Importance of Preoperative Knowledge of the Biomarker HE4 in Early-stage Endometrial Cancer Regarding Surgical Management. *Anticancer Res.* svibanj 2017.;37(5):2697–702.
129. Chudecka-Głaz A, Strojna A, Michalczyk K, Wieder-Huszla S, Safranow K, Skwirczyńska E, i ostali. Evaluation of He4 Use in the Diagnosis of Ovarian Cancer: First and Second Recurrence, and an Analysis of HE4 Concentration during Second- and Third-Line Chemotherapy. *Diagnostics.* siječanj 2023.;13(3):452.
130. Nalini N, Kumar A, Sharma S, Singh B, Singh AV, Prakash J, i ostali. The Diagnostic Accuracy of Serum and Urine Human Epididymis Protein 4 (HE4) in Ovarian Cancer in 15,394 Subjects: An Updated Meta-Analysis. *Cureus.* listopad 2022.;14(10):e30457.
131. Bulut T, Celik B, Yalcin AD, Keser S. Tissue expression of HE4 and its correlation with CA125 and p53 in high grade serous ovarian carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol.* listopad 2017.;38(5):745–9.
132. Devan SM, Pailoor J, Sthaneshwar P, Narayanan V. Pattern of Tissue Expression of CA-125 and HE4 in Primary Epithelial Ovarian Tumours and Correlation with Serum CA-125 Levels. *Asian Pac J Cancer Prev.* kolovoz 2013.;14(8):4545–8.
133. Aarenstrup Karlsen M, Høgdall C, Nedergaard L, Philipsen Prahm K, Schou Karlsen NM, Weng Ekmann-Gade A, i ostali. HE4 as a predictor of adjuvant chemotherapy resistance and survival in patients with epithelial ovarian cancer. *APMIS.* prosinac 2016.;124(12):1038–45.
134. Fawzy A, Mohamed MR, Ali MA, El-Magied MHA, Helal AM. Tissue CA125 and HE4 Gene Expression Levels Offer Superior Accuracy in Discriminating Benign from Malignant Pelvic Masses. *Asian Pac J Cancer Prev.* veljača 2016.;17(1):323–33.
135. Celik B, Bulut T, Yalcin AD. Tissue HE4 Expression Discriminates the Ovarian Serous Carcinoma but Not the Uterine Serous Carcinoma Patients. A New Adjunct to the Origin of the Tumor Site. *Pathol Oncol Res.* travanj 2020.;26(2):1145–51.
136. Li Y, Yu C, Li H, Feng Y, Fan P, Chen X. Relationship between human epididymal protein 4 and depth of tumor invasion, postoperative recurrence, and metastasis of epithelial ovarian cancer. *Asia Pac J Clin Oncol.* travanj 2024.;
137. Shittu KA, Rabiou KA, Akinola OI, Ahmed SB, Adewunmi AA. Comparison of the diagnostic accuracy of HE4 with CA125 and validation of the ROMA index in

- differentiating malignant and benign epithelial ovarian tumours among patients in Lagos, Nigeria. *ecancermedicalsceince*. srpanj 2023.;17:1568.
138. Špacir Prskalo Z, Bulić P, Langer S, Gaće M, Puljiz M, Danolić D, i ostali. Proofs for implementation of higher HE4 and ROMA index cut-off values in ovarian cancer preoperative stratification. *J Obstet Gynaecol*. veljača 2019.;39(2):195–201.
139. Zhao X, Zhao M, Gao B, Zhang A, Xu D. Modified HE4, CA125, and ROMA cut-off values and predicted probability of ovarian tumor in Chinese patients. *Gland Surg*. studeni 2021.;10(11):3097–105.
140. Bergman F. Carcinoma of the Ovary: A clinicopathological study of 86 autopsied cases with special reference to mode of spread. *Acta Obstet Gynecol Scand*. siječanj 1966.;45(2):211–31.
141. Orr B, Edwards RP. Diagnosis and Treatment of Ovarian Cancer. *Hematol Clin*. prosinac 2018.;32(6):943–64.
142. Saffarieh E, Nassiri S, Mirmohammadkhani M. Predicting value of HE4 and CA125 markers for optimal cytoreductive surgery in ovarian cancer patients. *Eur J Transl Myol*. kolovoz 2022.;32(3):10671.
143. Qiu D, Cai W, Zhang Z, Li H, Zhou D. High Ki-67 expression is significantly associated with poor prognosis of ovarian cancer patients: evidence from a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*. svibanj 2019.;299(5):1415–27.
144. Heayn M, Skvarca LB, Zhu L, Edwards RP, Olawaiye AB, Modugno F, i ostali. Impact of Ki-67 Labeling Index on Prognostic Significance of the Chemotherapy Response Score in Women With Tubo-ovarian Cancer Treated With Neoadjuvant Chemotherapy. *Int J Gynecol Pathol Off J Int Soc Gynecol Pathol*. svibanj 2021.;40(3):278–85.
145. Qing X, Liu L, Mao X. A Clinical Diagnostic Value Analysis of Serum CA125, CA199, and HE4 in Women with Early Ovarian Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. *Comput Math Methods Med*. svibanj 2022.;2022:e9339325.

11. PRILOZI

PRILOG 1

Špacir Prskalo, Zvezdana ; Bulić, Petra ; Langer Sanja ; Gaće, Mihaela ; Puljiz, Mario ; Danolić, Damir ; Alvir, Ilija ; Mamić, Ivica ; Šušnjar, Lucija ; Mayer, Ljiljana. Proofs for implementation of higher HE4 and ROMA index cut-off values in ovarian cancer preoperative stratification. // Journal of obstetrics and gynaecology, 39 (2018), 2; 195-201. doi: 10.1080/01443615.2018.1476471

12. ŽIVOTOPIS AUTORA

Zvezdana Špacir Prskalo rođena je 25. lipnja 1973. godine u Pakracu. Osnovnu i srednju školu pohađala je u Zagrebu. Farmaceutsko-biokemijski fakultet u Zagrebu upisala je 1991. godine i diplomirala 1996. godine. Diplomski rad „Utjecaj vinil - klorid monomera na pojavu limfocitoze“ izradila je u Institutu za medicinska istraživanja, a u suradnji s KBC Zagreb, pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Borisa Labara. Nakon obavljenog stručnog staža, 1996. godine, položila je državni ispit pri Ministarstvu zdravstva RH. Iste godine započinje raditi na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, te kratko na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu. Od 2007. zaposlena je do danas u Klinici za tumore Centar za maligne bolesti KBC Sestre milosrdnice kao medicinski biokemičar. Poslijediplomski studij medicinske biokemije upisala je 2008. godine i prešla na doktorski studij. Specijalistički studij medicinske biokemije završila je 2010. godine, te od tada radi kao specijalist medicinske biokemije. Pristupnica je članica Hrvatske komore medicinskih biokemičara i Hrvatskog društva medicinskih biokemičara.

POPIS RADOVA

1. Mayer, Ljiljana; Langer, Sanja; Gaće, Mihaela; Hrabač, Pero; Šoštarić, Milica; Fijan, Ines; Špacir Prskalo, Zvezdana; Cvetko, Ana; Periša, Josipa; Štefančić, Ljilja et al. Prediction score for complications after colorectal cancer surgery based on neutrophils/lymphocytes ratio, percentage of immature granulocytes, IG and IT ratios // *Libri Oncologici : Croatian Journal of Oncology*, 47 (2019), 1; 1-5
2. Špacir Prskalo, Zvezdana; Bulić, Petra; Langer Sanja; Gaće, Mihaela; Puljiz, Mario; Danolić, Damir; Alvir, Ilija; Mamić, Ivica; Šušnjar, Lucija; Mayer, Ljiljana. Proofs for implementation of higher HE4 and ROMA index cut-off values in ovarian cancer preoperative stratification. // *Journal of obstetrics and gynaecology*, 39 (2018), 2; 195-201 doi:10.1080/01443615.2018.1476471
3. Periša, Josipa; Bulić, Petra; Špacir Prskalo, Zvezdana; Gaće, Mihaela; Mayer, Ljiljana mogućnosti tekuće biopsije u kliničkoj praksi // *Libri oncologici : Croatian journal of oncology*, 45 (2017), 1; 23-30
4. Dobrijević Sanja, Mayer Ljiljana, Vrdoljak Danko Velimir, Gaće Mihaela, Špacir Prskalo Zvezdana, Pozaić Petra, Kirac Iva Povezanost vrijednosti prokalcitonina i C- reaktivnog

proteina prvi postoperativni dan s razdobljem oporavka pacijenta nakon operacija zloćudnih bolesti crijeva // *Biochemia Medica*, 25(Suppl 1) Zagreb, 2015. str. S56-S56

5. Gaće, Mihaela; Špacir Prskalo, Zvezdana; Dobrijević, Sanja; Mayer, Ljiljana Most common interferences in immunoassays // *Libri Oncologici : Croatian Journal of Oncology*, 43 (2015), 1-3; 23-27

6. Špacir Prskalo, Zvezdana HE4 i ROMA indeks u pre i postmenopausalnih žena // *Multidisciplinarni pristup u dijagnostici, liječenju i praćenju bolesnica s rakom jajnika; potencijal HE4 i ROMA indeksa / Mayer, Ljiljana (ur.)*. Zagreb: Hrvatska komora medicinskih biokemičara; Medicinska naklada, 2015. str. 83-88

7. Špacir Prskalo, Zvezdana; Gaće, Mihaela; Dobrijević, Sanja; Mayer, Ljiljana prednosti humanog epididimalnog proteina (HE4) u odnosu na tradicionalno korištene tumorske markere u ginekološkoj onkologiji // *Libri oncologici : Croatian journal of oncology*, 43 (2015), 1-3; 9-14

8. Puljiz, Mario; Danolić, Damir; Kostić, Lucija; Alvir, Ilija; Mamić, Ivica; Mayer, Ljiljana; Špacir Prskalo, Zvezdana; Gaće, Mihaela; Dobrijević, Sanja; Banović, Marija Diagnostic value of HE4, CA125, ROMA INDEX and ultrasound findings in epithelial ovarian cancer // *International Journal of Gynecological Cancer*. Vol 25, Supplement 2 / Uziel Beller (ur.). Nica, Francuska, 2015. str. 1326-1327

9. Špacir Prskalo, Zvezdana; Mayer, Ljiljana; Gaće, Mihaela; Dobrijević, Sanja; Puljiz, Mario; Alvir, Ilija; Mamić, Ivica; Danolić, Damir The diagnostic potential of human epididymis protein 4 (HE4) and ROMA index in women with ovarian cancer // *Biochemia Medica Rijeka, Croatia*, 2015. str. S57-S58

10. Mayer Ljiljana, Janušić Renato, Gaće Mihaela, Špacir Prskalo Zvezdana, Dobrijević Sanja, Pavlica Vesna connection between postoperative hypocalcaemia and pth measured in the first postoperative hours after the total thyroidectomy // *Clin Chem Lab Med*, Vol. 52, no. Supplement Istanbul, Turska, 2014. str. S769-S769 doi:10.1515/cclm-2014-4022

11. Ljiljana, Mayer; Gaće, Mihaela; Dobrijević, Sanja; Špacir-Prskalo, Zvezdana Comparison of FIT to gFOBT in colorectal cancer screening // *Libri Oncologici : Croatian Journal of Oncology*, 41 (2013), 1-3; 9-13

12. Mayer Ljiljana, Gaće Mihaela, Dobrijević Sanja, Špacir-Prskalo Zvezdana, Janušić Renato, Ramljak Vesna Intraoperative parathyroid hormon measurements in femal with parathyroid adenoma // *Biochemia medica*; 22(3) Zagreb, 2012. str. A202-A202
13. Mayer Ljiljana, Gaće Mihaela, Dobrijević Sanja, Špacir Prskalo Zvezdana, Janušić Renato, Ramljak Vesna, Knežević Fabijan intraoperative parathyroid hormone measurements in a female with parathyroid adenoma // *Libri oncologici : Croatian journal of oncology*, 39 (2011), 1-3; 45-49
14. Oršolić, Nada; Gajski, Goran; Garaj-Vrhovac, Vera; Đikić, Domagoj; Špacir Prskalo, Zvezdana; Sirovina, Damir DNA-protective effects of quercetin or naringenin in alloxan-induced diabetic mice. // *European journal of pharmacology*, 656 (2011), 1/3; 110-118 doi:10.1016/j.ejphar.2011.01.021
15. Prevendar Crnić, Andreja; Sakar, Darko; Pompe-Gotal, Jelena; Čajavec, Stanislav; Špacir, Zvezdana Učinak vakcinacije protiv zarazne bolesti burze na aktivnost mikrosomskih enzima jetre u pilića // *Zbornik radova V. simpozija s međunarodnim sudjelovanjem Peradarski dani 2003. = Proceedings of the 5th Symposium with International Participation Poultry Days 2003 / Wittner, Velimir (ur.)*. Zagreb: Hrvatski veterinarski institut, Centar za peradarstvo, 2003. str. 118-125
16. Sakar, Darko; Prevendar Crnić, Andreja; Pompe-Gotal, Jelena; Špacir, Zvezdana The effect of inactivated vaccine against infectious bursal disease of chickens on hepatic microsomal enzyme activities // *Abstracts of the 9th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology*; u: *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. Supplement 26 (2003) (S1) B-61 Lisabon, Portugal, 2003. str. 184-185
17. Srebočan, Emil; Pompe-Gotal, Jelena; Kiš, Ivana; Pirkić, Boris; Artuković, Branka; Špacir-Prskalo, Zvezdana Lead intoxication in a puppy - a case report // *Veterinary Medicine - Czech*, 47 (2002), 10-11; 323-324
18. Srebočan, Emil; Pompe-Gotal, Jelena; Prevendar Crnić, Andreja; Špacir, Zvezdana Effect of sublethal lead concentrations in feed on δ -aminolevulinic acid dehydratase activity in young carp // *Veterinarski arhiv*, 71 (2001), 6; 337-344
19. Fučić, Aleksandra; Špacir, Zvezdana; Barković, Danica; Jazbec, Anamarija; Mijić, A.; Labar, Boris Relative Lymphocytosis-Disorder Caused by Occupational Exposure to Vinyl

Chloride Monomer // Bulletin of environmental contamination and toxicology, 61 (1998), 583-590

Proofs for implementation of higher HE4 and ROMA index cut-off values in ovarian cancer preoperative stratification

Zvezdana Špacir Prskalo, Petra Bulić, Sanja Langer, Mihaela Gaće, Mario Puljiz, Damir Danolić, Ilija Alvir, Ivica Mamić, Lucija Šušnjar & Ljiljana Mayer

To cite this article: Zvezdana Špacir Prskalo, Petra Bulić, Sanja Langer, Mihaela Gaće, Mario Puljiz, Damir Danolić, Ilija Alvir, Ivica Mamić, Lucija Šušnjar & Ljiljana Mayer (2018): Proofs for implementation of higher HE4 and ROMA index cut-off values in ovarian cancer preoperative stratification, Journal of Obstetrics and Gynaecology, DOI: [10.1080/01443615.2018.1476471](https://doi.org/10.1080/01443615.2018.1476471)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/01443615.2018.1476471>



Published online: 12 Sep 2018.



Submit your article to this journal [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Proofs for implementation of higher HE4 and ROMA index cut-off values in ovarian cancer preoperative stratification

Zvezdana Špacir Prskalo^a, Petra Bulić^a, Sanja Langer^a, Mihaela Gaće^a, Mario Puljiz^b, Damir Danolić^b, Ilija Alvir^b, Ivica Mamić^b, Lucija Šušnjar^b and Ljiljana Mayer^a

^aDepartment of Medical Biochemistry in Oncology, University Hospital for Tumors, Sestre milosrdnice University Hospital Center, Zagreb, Croatia; ^bDepartment of Gynecologic Oncology, University Hospital for Tumors, Sestre milosrdnice University Hospital Center, Zagreb, Croatia

ABSTRACT

This study aimed to identify and quantify the clinical significance of the HE4 and ROMA index in patients with an adnexal tumour. We recruited 159 women and the HE4 and CA125 were measured with an electrochemiluminescence immunoassay in the sera. We used the Kolmogorov–Smirnov test, Mann–Whitney's test and logistic regression to interpret the data. In the premenopausal group ($n = 57$), the ROC analysis (with cut-off: 86.1 pmol/L for HE4; 40.7 U/L for CA125 and 21.9% for ROMA) demonstrated the superior prognostic potential of those markers when the higher cut-offs used are compared to producers. The AUC for HE4/CA125/ROMA were 0.846/0.867/0.846, respectively. The HE4/ROMA showed 85.7% sensitivity and 94% specificity. In the postmenopausal group ($n = 102$), the ROC analysis cut-off values were: 99.8 pmol/L for HE4; 45.8 U/L for CA125 and 38.4% for ROMA. AUC for HE4/CA125/ROMA were 0.928/0.899/0.927, respectively. HE4 had an 86.1% sensitivity at 92.4% specificity, while ROMA showed an 88.9% sensitivity at a 90.9% specificity.

IMPACT STATEMENT

- **What is already known on this subject?** The incidence of ovarian cancer has been increasing, despite the improvement of diagnostic, operative and therapeutic procedures. As a part of the multi-parametric approach, the HE4 and ROMA index improve the diagnostic sensitivity and specificity of CA125 in the detection of ovarian cancer.
- **What the results of this study add?** The evaluation of HE4 and ROMA efficacy in the preoperative stratification was made by logistic regression analysis. The better prognostic potential of ROMA index, in patients with present adnexal mass, was obtained using our higher cut-offs for the ROMA index (21.9% for premenopausal and 38.4% for postmenopausal) in comparison to the producer's (11.7% for premenopausal and 29.9% for postmenopausal). The HE4 and ROMA index had 14.29 +LR, 0.15 -LR, 67% PPV and 97.9% NPV in the premenopausal patients. In the postmenopausal group, the HE4 had 11.37 +LR, 0.15 -LR, 75.6% PPV and 92.4% NPV, the ROMA showed 9.78 +LR, 0.12 -LR, 91.2% PPV and 95.2% NPV.
- **What the implications are of these findings for clinical practice and/or further research?** Application of a higher cut-off for HE4/CA125/ROMA index can significantly reduce the percentage of FP and FN in the preoperative stratification of ovarian cancer and justify speculations about this subject in the future.

KEYWORDS

HE4; CA125; ROMA index; ovarian cancer; biomarker

Introduction

Ovarian cancer is the fifth most common cancer in women worldwide, accounting for 5% of all newly diagnosed tumours (Ferlay et al. 2015). Due to the asymptomatic and unspecific nature of the disease, more than 80% of cases are diagnosed in advanced stage (Scaletta et al. 2017). It is the leading cause of death in Croatia among patients with gynaecological malignancies (Croatian Institute of Public Health 2016). Stages I and II have much a better outcome than stages III and IV (the 5-year overall survival rate is 92.5% in stage I vs. 73.0% in stage II vs. 28.9% in stage III and 25.1% in stage IV) (Cancer of the Ovary – Cancer Stat Facts. 2017).

If there were a new easily accessible circulating biomarker which is capable of detecting disease with the appropriate sensitivity and reliability, it would help in early diagnosis and eventually in enhancing the survival rate of ovarian cancer. Despite its disadvantages, carcinoembryonic antigen 125 (CA125) is still a leading marker in the detection of ovarian cancer, which can be found in the National Academy of Clinical Biochemistry (NACB) guidelines (Sturgeon et al. 2008). The human epididymis protein 4 (HE4) compared to the CA125 showed a better diagnostic potential for ovarian cancer (Hamed et al. 2013; Scaletta et al. 2017).

HE4 belongs to the WAP (whey acidic protein) four-disulphide core (WFDC) family of proteins characterised as serine and threonine protease inhibitors (Zhu et al. 2013).

Table 1. Patients' characterisation according to the World Health Organisation (WHO) histopathologic classification of tumours of the female reproductive organs (National Comprehensive Cancer Network 2017).

Number of patients			Premenopausal 57	Postmenopausal 102
Age (average ± SD)			36.9 ± 8.9	60.2 ± 9.6
Ovarian cancer	Epithelial	Serous		
		High-grade	4	31
		Low-grade		1
		Mucinous	1	
	Endometrioid	1		
	Clear cell		1	
	Sex-cord stromal FATWO malignant variant		1	2
Total		7	36	
Benign ovarian cyst	Epithelial	Serous	19	39
		Mucinous	3	4
		Seromucinous		1
		Endometrioid	19	6
	Sex-cord stromal		3	
	Fibroma		2	
	Germ-cell		6	3
Total		47	58	
Borderline ovarian tumour	Epithelial	Serous	1	4
		Mucinous	1	1
	Sex-cord-stromal	Seromucinous		1
		Cellular fibroma	1	2
Total		3	8	

HE4 was the first determined in the epithelium of the distal epididymis, but it is also found in ovarian tissue. An elevated mRNA expression of HE4 was found in the ovarian cancer tissues, especially in the serous type (Drapkin et al. 2005).

Moore et al. have made a significant contribution in the assessment of an adnexal tumour mass, introducing the Risk of Ovary Malignancy Algorithm (ROMA). ROMA is a mathematical multiparametric function combining HE4, CA125 and menopausal status (Moore et al. 2009, 2011).

This study aimed to evaluate the diagnostic potential of HE4 preoperative concentration and the ROMA index in patients with an adnexal tumour. The available literature data concerning the cut-offs for HE4, ROMA and CA125 in the preoperative stratification of ovarian cancer patients did not match between populations (Michalak et al. 2015; Xu et al. 2016). Therefore, we wanted to define the cut-off values in our patients.

Materials and methods

We designed a retrospective study which recruited women scheduled for elective surgery from May 2015 to May 2017, at the University Hospital for Tumors in Zagreb, Croatia. All of the patients signed an informed consent which was approved by the Ethics Committee of the Hospital.

The inclusion criterium was the presence of a suspected adnexal mass on a transvaginal ultrasound. The exclusion criteria were a previously applied neoadjuvant therapy, bilateral salpingo-oophorectomy, pregnancy, hepatic and renal impairment, paraovarian cysts and a metastatic disease.

A postmenopausal status was defined for the patients with more than 12 months of amenorrhoea. The research included 159 patients submitted to surgery because of a present adnexal mass: 57 premenopausal and 102 postmenopausal women.

Table 2. Ovarian cancer patients' stratification according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) classification (Prat J and FIGO Committee on Gynecologic Oncology 2014).

FIGO	Number of patients	
	Premenopausal 7	Postmenopausal 36
IA	2	3
IB	1	
IC	1	1
IIB	1	
IIIA		1
IIIB	1	2
IIIC		25
IVA	1	3
IVB		1

We divided the patients into four groups based on the postoperative pathohistological report: (a) ovarian cancer; (b) benign ovarian cyst; (c) borderline ovarian tumour (BOT); (d) all of the patients. The patients' characteristics are given in Tables 1 and 2.

The biomarkers were analysed at the hospital's Department of Medical Biochemistry in Oncology. We used fresh, unfrozen serum samples. After being left at room temperature for 30 minutes, we centrifuged the samples at 3500 rpm/10 minutes. We measured HE4 and CA125 by electrochemiluminescence immunoassay on the Cobas e411 analyser (Hitachi, Tokyo, Japan; Roche, Mannheim, Germany).

A predictive index (PI) was calculated for premenopausal and postmenopausal patients separately using the following equations:

$$(PI = -12.0 + 2.38 \times \ln[HE4] + 0.0626 \times \ln[CA125])$$

and

$$(PI = 8.09 + 1.04 \times \ln[HE4] + 0.732 \times \ln[CA125])$$

The ROMA value had been calculated by using the following equation, as described by Moore (Moore et al. 2009):

$$\text{ROMA (\%)} = \exp(\text{PI}) / [1 + \exp(\text{PI})] \times 100$$

Statistical analysis was made using the statistical programme MedCalc 17.6 (Mariakerke, Belgium). The value $p < .05$ was considered as statistically significant.

Results

The HE4, CA125 and ROMA median with the interquartile range from 25 to 75% (Q1–Q3) is shown in Table 3 (for premenopausal) and Table 4 (for the postmenopausal woman). The Kolmogorov–Smirnov test was performed for the testing of the normality of distribution.

In the premenopausal group, the highest values of HE4, CA125 and ROMA were recorded in patients who had ovarian cancer confirmed by pathohistological diagnosis. HE4/CA125/ROMA in those patients had the largest range both in a minimum of 38.4 pmol⁻¹/20.3 UL⁻¹/4.1% and maximum of 297.6 pmol⁻¹/714.9 UL⁻¹/87.1%. The values for HE4/CA125/ROMA were statistically significantly different ($p < .005$) between the groups of patients with ovarian cancer and with benign ovarian cysts.

In the postmenopausal group, HE4, CA125 and ROMA had the highest values in the patients who had ovarian cancer which had been confirmed by a pathohistological diagnosis. The HE4/CA125/ROMA in those patients had the widest range both in a minimum of 16.7 pmol⁻¹/12.2 UL⁻¹/11.5% and a maximum of 7700 pmol⁻¹/6900 UL⁻¹/99.9%. Statistically significant differences ($p < .005$) in values for HE4/CA125/ROMA were found between the groups of the patients with ovarian cancer and benign ovarian cysts, as well as between the patients with ovarian cancer and BOT.

The results showed that the area under the ROC curves (AUC) in the premenopausal group for HE4 are 84.6%, for CA125 is 86.7% and 84.6% for ROMA. The cut-off used in the ROC curve analysis, as shown in Figure 1, is 86.1 pmol/L for HE4, 40.7 U/L for CA125 and 21.9% for ROMA. The diagnostic sensitivity of HE4, CA125 and ROMA was 85.7%. The diagnostic specificity of HE4 and ROMA (94%) is superior compared to CA125 (78%). The highest+LR is noted for HE4 and ROMA

(14.29), while+LR for CA125 was 3.9. –LR values were in the range of 0.15–0.18.

The distribution of the false negative (FN)/false positive (FP)/true negative (TN)/true positive (TP) of HE4 in comparison ovarian cancer and benign ovarian cysts has been 1/3/47/6. The ratio FN/FP/TN/TP of CA125 and ROMA has been 2/11/38/6 and 1/3/47/6 for the comparison of ovarian cancer and benign ovarian cysts. We found that a positive predictive value (PPV) of HE4 and ROMA (67%) is higher than PPV of CA125 (35.3%). The negative predictive value (NPV) for HE4, CA125 and ROMA is quite high (97.9%, 95% and 98%). Tables 5 and 6 show the logistic regression analysis and ROC parameters. The data in Table 5 marked with asterisks are given using the producers’ cut-off values.

The results in Figure 2 showed that the AUC ROC in the postmenopausal group for HE4 is 92.8%, for CA125 is 89.9% and 92.7% for ROMA using the cut-off values 99.8 pmol/L for HE4, 45.8 U/L for CA125. The cut-off which gained the maximal sensitivity and specificity for ROMA was 38.4%. The diagnostic sensitivity of ROMA (88.9%) is superior regarding HE4 and CA125 (86.1%), the diagnostic specificity of HE4 (92.4%) is higher compared to CA125 (86.4%) and ROMA (90.9%).

High+LR for HE4 (sensitivity/1 – specificity) in both groups of patients (14.9 in pre- and 11.4 in postmenopausal) is four times higher than LR+for CA125 in premenopausal and about two times higher in postmenopausal group. High LR+suggests that HE4 is the better parameter for describing

Table 4. Median (interquartile range) of HE4, CA125 and ROMA index values and results of Mann–Whitney’s testing in postmenopausal patients.

Group	Parameter	Median (Q1–Q3)	Mann–Whitney’s test
Ovarian cancer	HE4, pmol/L	278.1 (115.8–698.4)	–
	CA125, U/L	263.1 (105.8–806.6)	–
	ROMA, %	88.5 (60.4–96.8)	–
Benign ovarian cyst	HE4, pmol/L	62.8 (51.9–78.6)	$p = .0035$
	CA125, U/L	15.1 (11.2–28.4)	$p = .0018$
	ROMA, %	14.7 (11.5–23.1)	$p = .0035$
Borderline ovarian tumour	HE4, pmol/L	65.8 (55.6–89.5)	$p > .05$
	CA125, U/L	35.7 (19.1–311.9)	$p > .05$
	ROMA, %	26.9 (13.9–60.9)	$p > .05$
All patients	HE4, pmol/L	78.1 (56.0–170.2)	–
	CA125, U/L	28.8 (12.9–166.6)	–
	ROMA, %	23.5 (13.1–73.8)	–

[#]Level of statistical significance performed by Mann–Whitney’s testing. ¹ p : ovarian cancer group vs. benign ovarian cysts, ² p : ovarian cancer vs. BOT.

Table 3. Median (interquartile range) of HE4, CA125 and ROMA index values and results of the Mann–Whitney testing in premenopausal patients.

Group	Parameter	Median (Q1–Q3)	Mann–Whitney’s test [#]
Ovarian cancer	HE4, pmol/L	128.2 (88.4–230.2)	–
	CA125, U/L	116.4 (55.5–287.9)	–
	ROMA, %	47.4 (25.3–76.8)	–
Benign ovarian cyst	HE4, pmol/L	54.3 (44.1–62.6)	¹ $p = .0035$
	CA125, U/L	20.3 (13.6–40.4)	¹ $p = .0018$
	ROMA, %	9.4 (5.9–12.2)	¹ $p = .0035$
Borderline ovarian tumour	HE4, pmol/L	50 (44.3–52.9)	² $p > .05$
	CA125, U/L	25 (22.1–29.5)	² $p > .05$
	ROMA, %	7.6 (5.9–8.8)	² $p > .05$
All patients	HE4, pmol/L	54.7 (44.3–64.8)	–
	CA125, U/L	25.3 (15.3–50.7)	–
	ROMA, %	9.5 (5.9–13.8)	–

[#]Level of statistical significance performed by Mann–Whitney’s testing. ¹ p : ovarian cancer group vs. benign ovarian cysts, ² p : ovarian cancer vs. BOT.

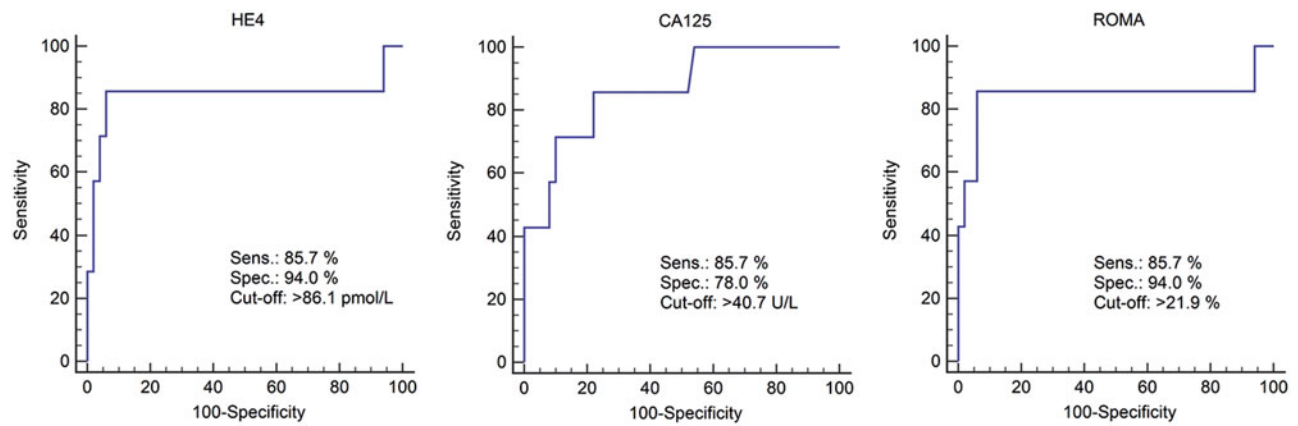


Figure 1. ROC curves of HE4, CA125 and ROMA index in premenopausal patients: ovarian cancer ($n = 7$) vs. benign ovarian cyst and BOT ($n = 50$).

Table 5. ROC statistical analysis parameters for HE4, CA125 and ROMA index values in premenopausal patients.

Parameter	HE4	CA 125	ROMA index
Area under the curve, AUC	0.846	0.867	0.846
Standard error	0.132	0.0766	0.132
95% confidence interval	0.726–0.928	0.751–0.942	0.726–0.928
Cut-off value	>86.1	>40.7	>21.9
Sensitivity (95% CI)	85.71 (42.1–99.6)	85.71 (42.1–99.6)	85.71 (42.1–99.6)
	85.7% ^a	75% ^a	85% ^a
Specificity (95% CI)	94 (83.5–98.7)	78 (64–88.5)	94 (83.5–98.7)
	80% ^a	69.3% ^a	62% ^a
+Likelihood ratio	14.29	3.90	14.29
–Likelihood ratio	0.15	0.18	0.15
Significance level p (area = 0.5)	.0088	<.001	.0088
Positive predictive value, %	67%	35.3%	67%
	37.5% ^a	28.5% ^a	24% ^a
Negative predictive value, %	97.9%	95%	98%
	97.5% ^a	94.4% ^a	97% ^a

^aAccording to producers' cut-off values.

Table 6. ROC statistical analysis parameters for HE4, CA125 and ROMA index values in postmenopausal patients.

Parameter	HE4	CA 125	ROMA index
Area under the curve, AUC	0.928	0.899	0.927
Standard error	0.0328	0.0338	0.0301
95% confidence interval	0.859–0.970	0.823–0.950	0.858–0.969
Cut-off value	>99.8	>45.8	>38.4
Sensitivity (95% CI)	86.1 (70.5–95.3)	86.1 (70.5–95.3)	88.9 (73.9– 96.9)
	91.2% ^a	88.9% ^a	91.7% ^a
Specificity (95% CI)	92.4 (83.2–97.5)	86.4 (75.7–93.6)	90.9 (81.3–96.6)
	80.3% ^a	77.2% ^a	80.3% ^a
+Likelihood ratio	11.37	6.31	9.78
–Likelihood ratio	0.15	0.16	0.12
Significance level p (area = 0.5)	<.0001	<.0001	<.0001
Positive predictive value, %	75.6%	77.5%	91.2%
	71.7% ^a	68% ^a	71.7% ^a
Negative predictive value, %	92.4%	91.9%	95.2%
	94.6% ^a	92.7% ^a	94.6% ^a

^aAccording to producers' cut-off values.

an ovarian cancer probability. The LR– (1 – sensitivity/specificity) for HE4 (Tables 5 and 6) was between 0.12 and 0.18.

In the group of postmenopausal women, the highest+LR is noted for HE4 (11.37), while+LR for ROMA and CA125 was 9.78 and 6.31. –LR values were in the range of 0.12–0.16. The distribution of FN/FP/TN/TP of HE4 was 5/5/61/31. The ratio FN/FP/TN/TP of CA125 was 5/9/57/31. The ratio FN/FP/TN/TP of ROMA was 3/6/60/33. PPV of ROMA (91.2%) is higher than the PPV of HE4 and CA125 (75.6% and 77.5%). The highest NPV found for

ROMA was 95.2% regarding 92.4% and 91.9% for HE4 and CA125. The data in Table 6 marked with asterisks have been given using the producers' cut-off values.

Discussion

Ovarian cancer is hard to diagnose at an advanced stage (Scaletta et al. 2017), thus it still seeks a set of methods or biomarkers for earlier detection. The most frequently used biomarker, CA125, does not meet the requirements for an

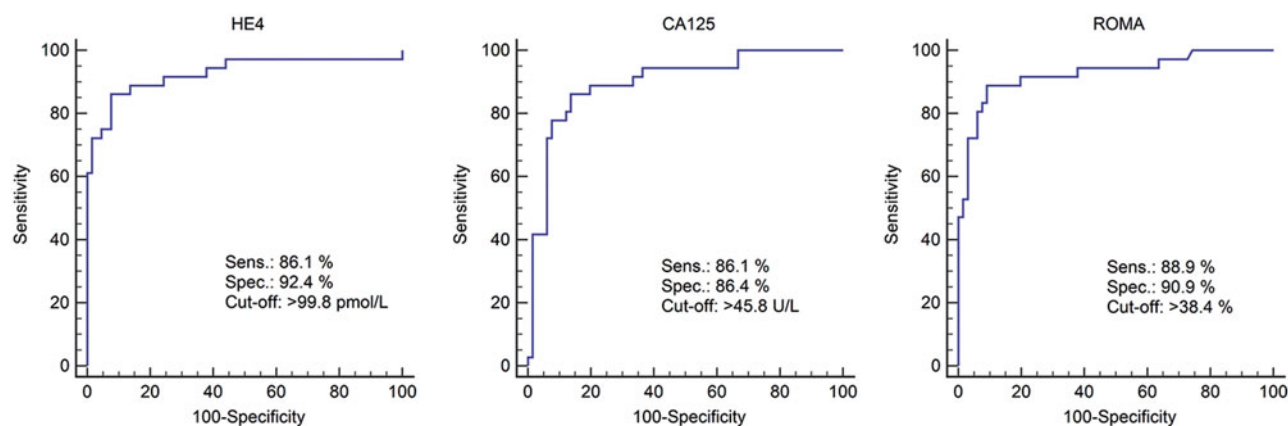


Figure 2. ROC curves of HE4, CA125 and ROMA index for postmenopausal patients ovarian cancer ($n = 36$) vs. benign ovarian cyst and BOT ($n = 64$).

early stage biomarker (high proportion of FPs, especially in the premenopausal woman). In our study, in the group of premenopausal women the FP rate was 19.2%, and in the group of postmenopausal women it was 8.8%, which is in line with previously reported data and is explained by the broad variety of pathophysiological conditions (Nossov et al. 2008).

The implementation of the multiparametric approach for risk estimation for ovarian cancer has been tested for the past decade. The most successful model so far is Moor's ROMA index (linking HE4, CA125 and menopausal status). However, this has not yet been widely accepted. Recent National Comprehensive Cancer Network (NCCN) recommendations in 2014 for the surveillance and monitoring of women with ovarian cancer suggested using CA125 or some other tumour marker without specifying HE4 (Morgan et al. 2013).

Furthermore, according to the American Association for Clinical Chemistry (AACC) potentials of HE4 and CA125 are equalised. Both markers, either as independent ones or as the part of multiparametric calculations, have not been recommended for screening but used to distinguish masses in the pelvis, the monitoring of therapy efficiency, as well as the accurate detection of disease recurrence (Ovarian Cancer – AACC.org. 2017).

In this research, we wanted to verify the reliability of HE4 and ROMA in predicting ovarian cancer preoperatively in patients with an ovarian tumour or cyst. As shown in the results, the ROMA index outscored the individual values of HE and CA 125 in both the pre- and postmenopausal women. The diagnostic accuracy of HE4, CA125 and the ROMA index was evaluated using the likelihood ratio decisions (LR). An LR application is identifying which parameter is most discriminatory. High+LR for HE4 in both groups of patients, 14.9 in pre- and 11.4 in postmenopausal women, is evidence which confirmed that HE4 is the better parameter for describing an ovarian cancer probability. –LR ($1 - \text{sensitivity}/\text{specificity}$) values (Tables 5 and 6) were between 0.12 and 0.18. That is corresponding to the change in probability ($0.19 \times \log \text{LR}$) of ovarian cancer about –30 to –40% (Romagnolo et al. 2016).

Based on our results, it can be concluded that measuring HE4 (along with CA125) might provide a higher ovarian

cancer diagnosis accuracy in premenopausal women due to its high specificity (94%), high+LR (14.9), consequently the low number of FN (1) and the exceptionally high NPV (97.9%). The FN case was of a granulosa cell tumour, stage FIGOIIb.

This study confirmed that the level of HE4 is not significantly higher in the stages of benign gynaecological diseases, together with cervical and endometrial carcinoma when compared to healthy women (Park et al. 2011). HE4 is useful in the rationalisation of preoperative diagnostics because it can distinguish the patients with ovarian endometriosis (and other benign ovarian diseases) from those with epithelial ovarian cancer (Anastasi et al. 2013).

In 233 patients, of these 67 had an invasive EOC, HE4 indicated malignancy with 73% sensitivity at 95% specificity (Moore et al. 2008). With 98% diagnostic sensitivity and absolute specificity, HE4 can distinguish ovarian cancer from healthy women and benign gynaecological disease (Montagnana et al. 2009). In just 1.3% of women with the later proved benignancy of their disease, HE4 was higher than the cut-off value of 140 pmol/L. The same study also showed a strong compatibility between the FIGO classification and HE4 value (Escudero et al. 2011).

Macedo in a meta-analysis estimated the HE4 sensitivity of 78% in directing ovarian cancer and BOT together with the specificity of 86% (Macedo et al. 2014). Zhen in a meta-analysis stated that the simultaneous determination of HE4 and CA125 value could detect ovarian cancer with 90% sensitivity and 85% specificity (Zhen et al. 2014). ROMA has resembling sensitivity as CA125, but it has higher specificity, and PPV (Chan et al. 2013) and our study confirms these results.

To calculate PPV and NPV for HE4 and ROMA, we used our cut-off values (HE4/CA125/ROMA – $86.1 \text{ pmol}^{-1}/40.7 \text{ UL}^{-1}/21.9\%$ for premenopausal and $99.8 \text{ pmol}^{-1}/45.8 \text{ UL}^{-1}/38.3\%$ for postmenopausal) and compared them with cut-off values declared by the producer. Our cut off values had less FN and FP results with a consequently better NPV and PPV.

The data given in literature on the utility of ROMA regarding menopausal stages differ. Our results showed a slightly higher diagnostic sensitivity (88.9% vs. 85.7%) and a slightly lower specificity (90.9% vs. 94%) in the group of postmenopausal women regarding the group of premenopausal

women. Due to a similar relative share of the FN results (2.9% vs. 1.7%, respectively), NPV was similar in the elder and younger groups (95.2% vs. 98%). Due to the existing difference in the relative share of FP (5.9% vs. 15.8%), PPV was better in the postmenopausal than in the premenopausal group (91.2% vs. 67.0%). Using our cut-off for the ROMA index resulted in an extremely low share (sixfold) of FP compared to the results when using the producers' cut-off among the younger patients (5.2% vs. 33%). We also had the lower share of FP among older patients using our cut-off (5.8% vs. 12.7%). Using our higher cut-off a great number of FP became TN.

In the group of premenopausal women with diagnosed ovarian cancer, the value of ROMA was above cut-off (21.9%) for all six epithelial ovarian cancers. In the group of postmenopausal women with diagnosed ovarian cancer 31 out of 32 epithelial ovarian cancer cases had elevated values of ROMA, only one epithelial carcinoma classified as FIGO IA had a ROMA lower than a cut-off (38.4%). HE4 increases the CA125 diagnostic accuracy in ovarian cancer (Kim and Kim 2011). ROMA with a high accuracy can help in EOC diagnosis (Ruggeri et al. 2011).

The European Group on Tumor Markers updated the guidelines a year ago, in which they had highlighted the dominating role of CA125 as the most important and the most studied marker in EOC (Sölétormos et al. 2016). This group recommended that HE4, alone or in combination with CA125 (in the calculation as ROMA), should be taken into consideration at the differential diagnosis of the present mass in the pelvis (LOE III; SOR B). In the future, well-designed and especially prospective studies will be of a great help to elucidate the role of these two markers and what is necessary for their implementation in clinical practice. Our research adds data to confirm the role of HE4 and ROMA in the earlier diagnosis of ovarian cancer.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

References

- Anastasi E, Granato T, Falzarano R, Storelli P, Ticino A, Frati L, et al. 2013. The use of HE4, CA125 and CA72-4 biomarkers for differential diagnosis between ovarian endometrioma and epithelial ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research* 6:44.
- Cancer of the Ovary – Cancer Stat Facts. 2017. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>
- Chan KKL, Chen CA, Nam JH, Ochiai K, Wilailak S, Choon AT, et al. 2013. The use of HE4 in the prediction of ovarian cancer in Asian women with a pelvic mass. *Gynecologic Oncology* 128:239–244.
- Croatian Institute of Public Health. 2016. Croatian National Cancer Registry. Cancer Incidence in Croatia 2014. Zagreb Bilten 39:1–44.
- Drapkin R, Von Horsten HH, Lin Y, Mok SC, Crum CP, Welch WR, et al. 2005. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Research* 65:2162–2169.
- Escudero JM, Auge JM, Filella X, Torne A, Pahisa J, Molina R. 2011. Comparison of serum human epididymis protein 4 with cancer antigen 125 as a tumor marker in patients with malignant and nonmalignant diseases. *Clinical Chemistry* 57:1534–1544.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* 136:E359–E386.
- Hamed EO, Ahmed H, Sedeek OB, Mohammed AM, Abd-Alla AA, Abdel Ghaffar HM. 2013. Significance of HE4 estimation in comparison with CA125 in diagnosis of ovarian cancer and assessment of treatment response. *Diagnostic Pathology* 8:11.
- Kim YH, Kim SC. 2011. Recent advances in the biomarkers for epithelial ovarian cancer. *Journal of Gynecologic Oncology* 22:219–221.
- Macedo ACL, da Rosa MI, Lumertz S, Medeiros LR. 2014. Accuracy of serum human epididymis protein 4 in ovarian cancer diagnosis. *International Journal of Gynecological Cancer* 24:1222–1231.
- Michalak M, Gąsiorowska E, Markwitz EN. 2015. Diagnostic value of CA125, HE4, ROMA and logistic regression model in pelvic mass diagnostics – our experience. *Ginekologia Polska* 86:256–261.
- Montagnana M, Lippi G, Ruzzenente O, Bresciani V, Danese E, Scevarolli S, et al. 2009. The utility of serum human epididymis protein 4 (HE4) in patients with a pelvic mass. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 23:331–335.
- Moore RG, Brown AK, Miller MC, Skates S, Allard WJ, Verch T, et al. 2008. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecologic Oncology* 108:402–408.
- Moore RG, McMeekin DS, Brown AK, DiSilvestro P, Miller MC, Allard W, et al. 2009. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecologic Oncology* 112:40–46.
- Moore RG, Miller MC, DiSilvestro P, Landrum LM, Gajewski W, Ball JJ, et al. 2011. Evaluation of the diagnostic accuracy of the risk of ovarian malignancy algorithm in women with a pelvic mass. *Obstetrics and Gynecology* 118:280–288.
- Morgan RJ, Alvarez RD, Armstrong DK, Robert A, Chen L, Copeland L, et al. 2013. Ovarian cancer, version 2. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 11:1199–1209.
- National Comprehensive Cancer Network. 2017. Ovarian cancer including fallopian tube cancer and primary peritoneal cancer. *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology* 1:1–114.
- Nossov V, Amneus M, Su F, Lang J, Janco JMT, Reddy ST, et al. 2008. The early detection of ovarian cancer: from traditional methods to proteomics. Can we really do better than serum CA-125? *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 199:215–223.
- Ovarian Cancer – AACC.org. 2017. Available from: <https://www.aacc.org/publications/cln/articles/2013/march/ovarian-cancer>
- Park Y, Lee JH, Hong DJ, Lee EY, Kim HS. 2011. Diagnostic performances of HE4 and CA125 for the detection of ovarian cancer from patients with various gynecologic and non-gynecologic diseases. *Clinical Biochemistry* 44:884–888.
- Prat J, FIGO Committee on Gynecologic Oncology. 2014. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics* 124:1–5.
- Romagnolo C, Leon AE, Fabricio ASC, Taborelli M, Polesel J, Del Pup L, et al. 2016. HE4, CA125 and risk of ovarian malignancy algorithm (ROMA) as diagnostic tools for ovarian cancer in patients with a pelvic mass: an Italian multicenter study. *Gynecologic Oncology* 141:303–311.
- Ruggeri G, Bandiera E, Zanotti L, Belloli S, Ravaggi A, Romani C, et al. 2011. HE4 and epithelial ovarian cancer: comparison and clinical evaluation of two immunoassays and a combination algorithm. *Clinica Chimica Acta* 412:1447–1453.
- Scaletta G, Plotti F, Luvero D, Capriglione S, Montera R, Miranda A, et al. 2017. The role of novel biomarker HE4 in the diagnosis, prognosis and follow-up of ovarian cancer: a systematic review. *Expert Review of Anticancer Therapy* 17:827–839.
- Sölétormos G, Duffy MJ, Othman Abu Hassan S, Verheijen RHM, Tholander B, Bast RC, et al. 2016. Clinical use of cancer biomarkers in epithelial ovarian cancer. *International Journal of Gynecological Cancer* 26:43–51.

- Sturgeon CM, Duffy MJ, Stenman U-H, Lilja H, Brunner N, Chan DW, et al. 2008. National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers. *Clinical Chemistry* 54:e11–e79.
- Xu Y, Zhong R, He J, Ding R, Lin H, Deng Y, et al. 2016. Modification of cut-off values for HE4, CA125 and the ROMA algorithm for early-stage epithelial ovarian cancer detection: results from 1021 cases in South China. *Clinical Biochemistry* 49:32–40.
- Zhen S, Bian L-H, Chang L-L, Gao X. 2014. Comparison of serum human epididymis protein 4 and carbohydrate antigen 125 as markers in ovarian cancer: a meta-analysis. *Molecular and Clinical Oncology* 2:559–566.
- Zhu YF, Gao GL, Tang SB, Zhang ZD, Huang QS. 2013. Effect of WFDC 2 silencing on the proliferation, motility and invasion of human serous ovarian cancer cells in vitro. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 6:265–272.