

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Mirjana A. Milivojević

**ZNAČAJ ODREĐIVANJA  
OSTEOPONTINA U PLAZMI KAO  
POKAZATELJA PRISUSTVA MALIGNIH  
TUMORA JAJNIKA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF MEDICINE

Mirjana A. Milivojević

**THE SIGNIFICANCE OF  
DETERMINATION OF PLASMA  
OSTEOPONTIN LEVEL AS AN  
INDICATOR OF THE MALIGNANT  
OVARIAN TUMORS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

**MENTOR:**

**Prof. dr Nataša Petronijević**, redovni profesor na katedri za kliničku i medicinsku biohemiju, Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu

**KOMENTOR:**

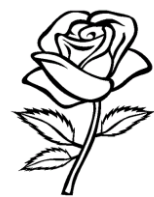
**Prof. dr Biljana Kastratović-Kotlica**, redovni profesor na katedri za ginekologiju i akušerstvo, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

**ČLANOVI KOMISIJE:**

1. **Prof. dr Lidija Tasić**, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. **Doc. dr Vesna Dragutinović**, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. **Prof. dr Vladimir Bošković**, prof. u penziji Medicinskog fakulteta u Beogradu

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_

*Mojoj majci Olgi, suprugu Goranu i sinovima Milošu i Ivanu  
posvećujem ovaj rad u znak zahvalnosti za bezrezervnu podršku i razumevanje*



Želim da se od srca zahvalim mojim mentorima, svim mojim kolegama, prijateljima i svojoj porodici bez čije podrške, ohrabrenja i ljubavi ja ne bih imala privilegiju da uradim ovu disertaciju.

Profesorki dr Nataši Petronijević, mentoru ovog rada, dugujem veliku zahvalnost za nesebičnu pomoć i stalnu podršku koju mi je pružala u planiranju i izradi disertacije. Neizmerno sam joj zahvalna na pruženim savetima i sugestijama, kao i na posvećenom vremenu i neprekidnom podsticanju u toku rada.

Profesorki dr Biljani Kastratović-Kotlica, komentoru ovog rada, iskreno zahvaljujem na stručnim smernicama i kontinuiranoj podršci koju mi je pružala sve vreme tokom trajanja ovog istraživanja. Njena pomoć u definisanju teme, planiranju istraživanja i izradi disertacije bila mi je od neprocenjive važnosti.

Moja iskrena zahvalnost je upućena Profesorki dr Lidiji Tasić, na stručnim sugestijama u toku izrade ove teze. Njeno poverenje i podrška predstavljali su veliki podsticaj za mene.

Profesoru dr Vladimiru Boškoviću, od koga sam dobijala savete i dragocenu stručnu pomoć i sa kojim sam mogla da razmenim mišljenje o dilemama na koje sam nailazila dugujem veliku zahvalnost. Rad sa profesorom bili su za mene privilegija i čast.

Docentu dr Vesni Dragutinović iskreno zahvaljujem na kolegijalnoj, stručnoj i organizacionoj podršci koju mi je pružala sve vreme tokom trajanja ovog istraživanja.

Prim. dr Jasmini Atanacković, načelniku ginekološke patohistologije, zahvaljujem na veoma korisnim sugestijama prilikom izrade i korekcija ovog rada. Pored toga, bez rada dr. Atanacković i njenih saradnika iz Odeljenja za patologiju Klinike za ginekologiju i akušerstvo KCS, ovo istraživanje ne bi bilo moguće sprovesti.

Zahvalnost dugujem i dr. Ljubinki Nikolić, načelniku službe za hematologiju i transfuziju na KGA KCS, uz čiju pomoć i saradnju su prikupljeni uzorci ispitivani u ovoj studiji.

Zahvaljujem se mojim dragim kolegicama Prof. dr Svetlani Ignjatović i dr. sci Snežani Marković, na nesebičnoj pomoći u izradi ove disertacije, kao i na dugogodišnjem poverenju, razumevanju i prijateljstvu.

Zahvalnost bez granica dugujem svojoj porodici koja me je svojom ljubavlju, razumevanjem i strpljenjem motivisala na uspehe tokom celog života.



## ZNAČAJ ODREĐIVANJA KONCENTRACIJE OSTEOPONTINA U PLAZMI KAO POKAZATELJA PRISUSTVA MALIGNIH TUMORA JAJNIKA

### Rezime

Danas ne postoji pouzdan dijagnostički test ili *imaging* tehnika koja sa sigurnošću može da diferencira maligne od benignih cisti jajnika. Ovarijalni tumori rastu kao kombinacija cističnih i solidnih formacija, što znatno otežava dijagnostiku. Donošenje odluka se bazira na kliničkim pregledima, transvaginalnom ultrazvuku, kompjuterizovanoj tomografiji ili magnetnoj rezonanciji, kao i na određivanju tumorskih markera u krvi. Pored činjenice da su u zadnje dve decenije ove tehnike značajno usavršene, i danas se operiše 7 od 10 benignih formacija da bi se otkrio jedan kancer ovarijuma. Pacijentkinje se izlažu invazivnim hirurškim intervencijama, bez sigurnog dokaza o postojanju maligniteta, a povećava se i morbiditet od ove bolesti. Zato bi postavljanje sigurne i tačne preoperativne dijagnoze donelo i medicinski i socio-ekonomski benefit.

Od laboratorijskih markera u predikciji prisustva maligniteta jajnika najčešće se koristi i najbolje je proučen kancerski antigen CA125. Ovaj marker je povišen u 80% slučajeva karcinoma jajnika koji su u odmaklom stadijumu, a samo kod 50% pacijentkinja koje su u ranoj fazi bolesti. Danas se često u kliničkoj praksi koristi još jedan marker *human epididymis protein* HE4, koji je 2008. god. prihvatila FDA i odobrila njegovo korišćenje. Ipak, zbog brojnih kontraverzi koje su o njemu objavljene još uvek je u fazi evaluacije. Smrtnost od ove bolesti ostala je nepromenjena u zadnje tri decenije i danas je ovarijalni kancer najsmrtonosniji ginekološki malignitet i peti uzrok smrti žena bolesnih od malignih bolesti. Rana dijagnostika bolesti ima veliki značaj na konačan ishod bolesti. Zna se da petogodišnje preživljavanje ima 85-90% bolesnica koje su u početnim stadijumima bolesti, a samo 25-30% bolesnica u kasnim fazama bolesti. Zato postoji urgentna potreba da se potencijalni biomarkeri, ustanovljeni savremenim molekularnim tehnikama, koji bi mogli da unaprede ranu dijagnostiku potvrde u praksi i da se evaluiraju njihov klinički značaj.

Cilj rada bio je da se ispita dijagnostička i prognostička uloga osteopontina (OPN), u dijagnostici tumora jajnika, kao i njegov prediktorski uticaj na ishod bolesti. Ispitan je dijagnostički potencijal (senzitivnost, specifičnost, pozitivna i negativna prediktivna vrednost) OPN-a u predikciji karcinoma jajnika, kao i značaj određivanja OPN kod različitih histopatoloških tipova tumora jajnika i FIGO stadijuma tumorske bolesti.

Karakteristike OPN-a su upoređene sa četiri markera koji se danas najčešće koriste u dijagnostici tumora jajnika. Prognostički značaj osteopontina je ispitan praćenjem bolesnica u periodu od 60 meseci i definisan u odnosu na preživljavanje i smrtni ishod. Cox-ovom regresionom analizom ispitan je prediktorski uticaj kliničko-patoloških varijabli i OPN-a na ishod bolesti. Takođe, u ovom istraživanju je veći broj parametara koji se koriste u dijagnostici tumora jajnika faktorskom analizom glavnih komponenti (PCA) grupisan u tri složena klastera: klaster anamnestičkih podataka, ultrazvučnih i laboratorijskih podataka, kojima se raspolaže u proceni prirode adneksalnih masa.

U ovu prospektivnu randomiziranu kliničku studiju uključeno je 157 ispitanica. One su podeljene u tri grupe: pacijentkinje sa malignim tumorima ovarijuma (N=57), pacijentkinja sa benignim tumorima jajnika (N=50), i kontrolna grupa zdravih ispitanica (N=50). Bolesnicama koje su se zbog tegoba ili ultrazvukom dijagnostikovane ciste na jajniku, javile na Kliniku za ginekologiju i akušerstvo KCS, uzeti su klinički i demografski podaci. Pored rutinskih biohemijskih i hematoloških parametara u plazmi ispitanica određen je nivo OPN-a metodom *solid-phase sandwich enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), a u serumu istih ispitanica određeni su ostali tumor markeri *Chemiluminescent microparticle immunoassay metodom* (CMIA).

Između grupe bolesnica sa malignim i benignim cistama jajnika nije bilo značajne razlike u broju ispitanica, prosečnoj starosti i menopauzalnom statusu. Bolesnice sa benignim cistama su bile mlađe, ali ne statistički značajno i bilo je u toj grupi više radno sposobnih žena, dok su u grupi sa malignim tumorima bile značajno češće bolesnice sa pozitivnom porodičnom istorijom i sa simptomima bolesti. Rezultati su pokazali da pozitivna porodična istorija uvećava rizik za nastanak malignih tumora jajnika i do šest puta u ispitivanoj populaciji. U radu je dokazana statistički značajna razlika u koncentraciji OPN-a između ispitivanih grupa: statistički najviše vrednosti su bile u grupi bolesnica sa malignim tumorima. U ispitivanim grupama između različitih histopatoloških tipova tumora ovarijuma nije dokazana statistički značajna razlika u vrednostima osteopontina: kako kod bolesnica sa benignim tumorima ( $p=0,621$ ) tako i kod malignih tumora ( $p=0,081$ ) jajnika. Dokazana je statistički značajna razlika u nivoima OPN-a u različitim FIGO stadijumima karcinoma ovarijuma: viši stadijumi su se karakterisali višim koncentracijama preoperativnog OPN-a u plazmi. Trend kretanja vrednosti medijane OPN od benignih bolesti preko stadijuma FIGO I imao je pozitivan tok, a sa pogoršanjem bolesti taj trend je imao značajan korelacioni koeficijent, kako za



pre ( $R^2=0,830$ ) tako i za postmenopauzalne bolesnice ( $R^2=0,993$ ). Koncentracije OPN-a značajno su više kod bolesnica sa malignim tumorom kada su u menopauzi u odnosu na premenopauzalne bolesnice, samo u odmaklim stadijumima bolesti. Koncentracije ostalih ispitivanih tumor markera CA125, HE4 i ROMA indeka statistički su se značajno razlikovale između grupa, osim kod CEA i CA19,9 gde među grupama nije dokazana značajna razlika. Osteopontin je u visoko signifikantnoj pozitivnoj korelaciji sa upoređivanim markerima CA125 i HE4 u grupi bolesnica sa malignim tumorima.

ROC analizom je ispitan značaj određivanja OPN u predikciji malignih neoplazmi jajnika. Rezultati su pokazali da se kod bolesnica čija je koncentracija OPN veća od  $340\mu\text{g/L}$ , sa verovatnoćom od preko 80% se može tvrditi da se radi o malignim cistama ovarijuma. Upoređivanjem površina ispod ROC krive, kao pokazatelja korisnosti dijagnostičkih markera, između OPN i ostalih tumor markera zaključeno je da nema statistički značajne razlike u ovim veličinama bilo da se radi o dijagnostici maligne bolesti jajnika ili o praćenju progresije bolesti. Primena bilo koga od upoređivanih markera, kao i ROMA indeksa može se smatrati jednako pouzdanom.

Najbolji rezultati se dobijaju kada se udruže OPN+CA125, ili OPN+HE4 u multipli marker koji ima veću senzitivnost i osetljivost od pojedinačnih markera i značajno popravlja kvalitet pri trijaži bolesnica. OPN iako sličnog dijagnostičkog potencijala kao CA125 i HE4, predstavlja dobru dopunu postojećim markerima.

Primenom analize rizika utvrđeno je da je verovatnoća da ispitanice sa malignim tumorima imaju OPN iznad  $240\mu\text{g/L}$  je 8 puta viša (OR=8,11) nego kod benignih tumora, odnosno 44 puta viša (OR=44,63) nego kod zdravih ispitanica.

Po Cox-ovom regresionom modelu najbolju prediktivnu vrednost na ishod bolesti imaju, osim povišene koncentracije OPN $>240\mu\text{g/L}$  i FIGO stadijum tumorske bolesti (HR=3,346), dok se značajnost potpuno izgubila za histološki i nuklearni gradus u predikciji smrtnog ishoda. Ova *cut-off* vrednost, dobijena analizom histograma distribucije OPN-a svih učesnica u ispitivanju imala je dijagnostičku tačnost od 72% i sa verovatnoćom od 8 puta mogla da potvrdi da bolesnice koje imaju vrednost iznad  $240\mu\text{g/L}$  pripadaju grupi sa malignim tumorima. Kaplan-Meier-ova kriva preživljavanja dokazuje značajnu statističku razliku u verovatnoći preživljavanja ispitanica sa OPN-om ispod  $240\mu\text{g/L}$  i iznad  $240\mu\text{g/L}$  (Logrank test=4,656,  $p<0,031$ ).

Kada se za *cut-off* vrednost OPN u analizi rizika uzme vrednost od  $750\mu\text{g/L}$ , efikasnost trijaže bolesnica (DT) je 77,6% a verovatnoća da bolesnice sa OPN  $>750\mu\text{g/L}$  imaju maligni tumor jajnika je 13 puta viša (OR=12,76). Cox-ova analiza je

pokazala da najbolju prediktivnu vrednost na ishod bolesti imaju pored OPN>750 $\mu$ g/L (HR=6,222) i FIGO stadijum tumorske bolesti (HR=9,616), dok se modelu pridružila značajnost drugih kliničko-patoloških parametara koji uvećavaju šansu za smrtni ishod: histološki gradus (HR=1,881) i viši nuklearni gradus (HR=1,636), veći rezidualni tumor (HR=1,680) i veća starost bolesnice (HR=1,238).

Da bi smo redukovali i grupisali veliki broj podataka kojima raspolažemo u dijagnostici malignih ovarijalnih neoplazmi u relativno mali broj faktora primenili smo faktorsku analizu glavnih komponenti (PCA). Od 22 ispitivana parametara izdvojeno je tri klastera identifikovanih kao „faktor anamneze“ (simptomi, starost, menopauzalni status, broj porođaja, porodična istorija, BMI, godina menarhe), „faktor ultrazvučnih parametara“ (prisustvo ascita, postojanje metastaza, lokularnost, dijametar tumora) i „laboratorijski faktor“ (CA125, HE4, OPN, CEA, ROMA indeks) sa kojima je objašnjeno 50,5% varijacija u sistemu. Prediktorska snaga od 71,5% vezana je za HE4, 72,6% varijabiliteta vezano je za Ca125, a 58% za OPN. Diskriminantnom kanoničkom analizom je pokazano koji od tri klastera može najpre da ukaže na prirodu adneksalnih tumora. Značaj OPN-a je izražen standardizovanim kanoničkim koeficijentom  $R=0,355$  i treći je u rang u analiziranih tumor markera. Kao najsnažniji prediktori za maligne tumore izdvojili su se starost ispitanica i simptomi, zatim metastaze i lokularnost tumora, kao i ROMA indeks.

Korišćenje biomarkera kao neinvazivnog i pristupačnog alata u postavljanju dijagnoze i praćenju terapije, dobija sve veći zamah u periodu personalizovane medicine.

**Ključne reči:** benigni tumori jajnika, kanceri jajnika, tumor markeri, osteopontin,

**Naučna oblast:** Medicinske nauke-biohemija

**Uža naučna oblast:** Medicinska biohemija

**UDK broj:**

## **THE SIGNIFICANCE OF DETERMINATION OF PLASMA OSTEOPONTIN LEVEL AS AN INDICATOR OF THE MALIGNANT OVARIAN TUMORS**

### **Abstract**

Presently, there is no reliable diagnostic test or imaging technique which may definitely differentiate the malignant from the benign ovarian cysts. Ovarian tumors grow as a combination of cystic and solid formations, what makes diagnostics more difficult. Decision-making is based on the clinical examinations, transvaginal ultrasonography, computerized tomography or magnetic resonance, as well as on determination of blood tumor markers. In spite of the fact that these techniques have been significantly improved and refined in the last two decades, still 7 to 10 benign formations are operated to detect one cancer of the ovary. Besides that the patients undergo extensive surgical interventions, without any evidence-based malignancy, the morbidity of this disease has been increasing. Therefore, safe and accurate preoperative diagnosis will produce both medical and socioeconomic benefit. Out of laboratory markers for prediction of ovarian malignancy, the most frequently used and best studied is a cancer gene (CA-125). This marker is increased in 80% of cases with the advanced stage ovarian cancer, and only 50% of patients with the disease in early stage. Today, one additional marker is used in the clinical practice known as human epididymis protein 4 (HE4), approved and authorized by FDA in 2008, but the mortality remained unchanged in the last 3 decades. Early diagnostics of this condition has a huge impact on the final outcome of disease. It is known that as much as 85-90% of patients with the initial stage of disease have five-year survival, while this proportion is only 25-30% in the late phases of disease. Therefore, there is an urgent need for potential biomarkers established by molecular techniques to be confirmed in practice and evaluated for their clinical significance.

The objective of the study was to examine the diagnostic and prognostic role of osteopontin (OPN) in diagnostics of ovarian tumors. The diagnostic potential (sensitivity, specificity, positive and negative predictive value) of OPN was examined in prediction of the ovarian cancers as well as the significance of OPN determination in various histological types of ovarian tumors and FIGO stages of tumor disease. OPN

characteristics were compared with four markers used currently for diagnostic of the ovarian tumors. The prognostic significance of osteopontin was examined by following the patients within 60-month period and defined in relation to survival rate and lethal outcome. In addition, a number of study parameters used for diagnostics of ovarian tumors was grouped by the factor analysis of principal components into three complex clusters: the clusters of anamnestic data, and ultrasound and laboratory data, which were available for evaluation of the nature of adnexal masses.

This prospective clinical study included 157 subjects. They were divided in three groups: patients with the malignant ovarian tumor (N=57), patients with the benign ovarian tumor (N=50), and the healthy controls (N=50). The patients who presented to the Clinic for Gynecology and Obstetrics (CGA), Clinical Center of Serbia (CCS) due to their difficulties or ovarian cysts diagnosed by ultrasound, were inspected for obtaining clinical and demographic data. Other than regular biochemical and hematological parameters, plasma OPN level was measured in subjects by solid-phase sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and other tumor markers were determined in the serum of the same subjects by chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) method.

There was no significant difference in a number of subjects, mean age and menopausal status between the patient groups with the malignant and benign ovarian cysts. The patients with benign cysts were younger, not showing any statistical significance, and this group included more working age women, the group with malignant tumors included significantly more patients with the positive family history and the symptoms of disease. The results showed that positive family history increased the risk of malignant ovarian tumors up to six times in study population. The study verified the significant difference in osteopontin level between study groups: the values were highest in the patient group with the malignant tumors. No significant difference of osteopontin level was found between various histological types of the ovarian tumors: either in patients with benign ( $p=0.621$ ) or malignant ovarian tumors ( $p=0.081$ ). However, significant difference of osteopontin levels was found in different FIGO stages: OPN values were significantly lower in the initial phases of disease (FIGO I and II) in comparison to advanced stages (FIGO III and IV), while there was no significant difference between FIGO I and II, as well as FIGO III and IV staging. OPN levels were significantly higher in menopausal patients with malignant tumors in relation to

premenopausal subjects. The trend of median OPN values from benign disease to FIGO stage I was positive, while as disease aggravated such trend had significant correlation coefficient both in pre- ( $R^2=0.830$ ) and postmenopausal women ( $R^2=0.993$ ). The values of other studied tumor markers CA125, HE4 and ROMA index were significantly different between the groups, except for CEA and CA 19.9 where no significant difference was found between the groups. There was a highly significant positive correlation between the level of osteopontin and markers CA125 and HE4 in patients with the malignant tumors.

ROC analysis was used to analyze the significance of OPN determination in prediction of malignant ovarian neoplasms. The results showed that the OPN level higher than  $340\mu\text{g/L}$  could indicate malignant ovarian cysts in these patients with over 80% probability. The comparison of the areas under the ROC curves, being the indicator of usefulness of diagnostic markers, revealed that there was no significant difference in the levels of OPN and other tumor markers, either regarding the diagnostics of the ovarian malignancy or follow-up of disease progression. The utilization of any of these compared markers and ROMA index could be considered equally reliable.

The best results were obtained when OPN+CA125 or OPN+HE4 were joined together in multiple markers which would have higher sensitivity and sensibility than individual markers, and significantly improve the quality of patient triage.

The risk analysis could confirm that the probability for patients with malignant tumors to have OPN level over  $240\mu\text{g/L}$  was 8 times higher ( $\text{OR}=8.11$ ) when compared to patients with benign tumors, and 44 times higher ( $\text{OR}=44.63$ ) than for the healthy controls.

Univariate Cox analysis estimated that the best predictive value in the outcome of disease, besides  $\text{OPN}>240\mu\text{g/L}$ , was associated with FIGO staging ( $\text{HR}=3.346$ ) while histological and nuclear grades completely lost their significance. Kaplan-Meier survival curve confirmed statistical difference in survival probability of patients with OPN levels either lower or higher than  $240\mu\text{g/L}$  (Log rank test= $4.656$ ,  $p<0.031$ ). When osteopontin cut-off value of  $760\mu\text{g/L}$  was taken for the risk analysis, the efficacy of patient triage (distribution of triage – DT) was 77.6%, and the probability for patients with OPN values over  $760\mu\text{g/L}$  to have malignant ovarian tumor was 13 times higher ( $\text{OR}=12.76$ ). Cox analysis showed that the best predictive value of disease outcome was

found, besides OPN>760 $\mu$ g/L (HR=6.222), with FIGO staging (HR=9.616), but the model was joined by the significance of other clinical-pathological parameters upgrading the probability of lethal outcome: histological grade (HR=1.881) and higher nuclear grade (HR=1.636), bigger residual tumor (HR=1,680) and higher patient's age (HR=1.238).

For reduction and grouping of a large number of data available in diagnostics of malignant ovarian neoplasms in relatively small number of factors, the Principal component analysis (PCA) was applied. Out of 22 studied parameters, three clusters were singled out, identified as "anamnestic factor" (symptoms, age, menopausal status, number of births, family history, BMI, year of menarche), "factor of ultrasound parameters" (ascites, metastases, locularity, tumor diameter), and "laboratory factor" (CA-125, HE4, OPN, CEA, ROMA index) which explained 50.5% of variations in the system. Prediction strength of 71.5% was associated with HE4, and variability of 72.6% and 58% were connected with CA125 and OPN, respectively. Canonical discriminant analysis showed which of these three groups of factors could suggest the nature of adnexal tumors. OPN significance was expressed by standardized canonic coefficient  $R=0,355$  and it was in the third place among analyzed tumor markers. The age of subjects and the symptoms were singled out as the most potent predictors of malignant tumors, followed by metastases, tumor locularity and ROMA index.

The use of biomarkers as non-invasive and available tool for making diagnosis and therapy monitoring has been in full swing in the time of personalized medicine.

**Key words:** benign ovarian tumor, ovarian cancer, tumor markers, osteopontin

**Scientific field:** Medical sciences - biochemistry

**Narrow scientific field:** Medical biochemistry

**UDC (universal decimal classification) number:**

Skraćenice korišćene u tekstu:

- **ACOG** Američko udruženje akušera i ginekologa
- **ASCO** Američko udruženje kliničkih onkologa
- **BLT** *Border line* tumor-granični tumor epitelnog porekla
- **BMI** Indeks telesne težine
- **BRCA** Humani tumor supresor gen
- **CT** Kompjuterizovana tomografija
- **EGTM** Evropska grupa za tumorske markere
- **EOC** Epitelni ovarijalni kancer
- **ESMO** Evropsko udruženje medicinskih onkologa
- **FIGO** Internacionalna Federacija za ginekologiju i akušerstvo
- **HNPCC** Nasledni nepolipni karcinom debelog creva
- **IOTA** Internacionalna grupa za analizu tumora jajnika
- **KGA** Klinika za ginekologiju i akušerstvo
- **LMT** Tumor niskog stepena maligniteta
- **MRT** Magnetna rezonanca
- **NACB** Nacionalna Akademija za kliničku biohemiju
- **NIH** Nacionalni Institut za zdravlje
- **OC** Kancer jajnika
- **OPN** Osteopontin
- **PCSO** Sindrom policističnih jajnika
- **PET** Pozitronska emisiona tomografija
- **PLCO** Randomizirana meta studija o skriningu karcinoma prostate, pluća, creva i jajnika sprovedena u SAD-u
  
- **RMI** Indeks malignog rizika
- **ROCA** Rizik za ovarijalni kancer algoritam
- **ROMA** Rizik za dobijanje ovarijalnog maligniteta algoritam
- **SCSOCS** Randomizirana meta studija o skriningu karcinoma jajnika u Japanu
- **UKCTOS** Randomizirana studija o skriningu karcinoma jajnika sprovedena u Velikoj Britaniji





# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	1
1.1. Tumori jajnika	1
1.1.1. Definicija i klasifikacija tumora jajnika	1
1.1.2. Epidemiološki podaci, incidence i mortalitet	2
1.1.3. Patogeneza i faktori rizika kancera jajnika	3
1.1.4. Tumorigeneza EOC	4
1.1.5. Činioci koji utiču na kasnu dijagnozu i tok bolesti	6
1.2. Dijagnostičke procedure za evaluaciju tumora jajnika	8
1.2.1. Testovi i prognostički modeli za detekciju raka jajnika	8
1.2.2. Transvaginalni ultrazvuk i <i>imaging</i> tehnike	9
1.2.3. Skrining modeli i njihovi rezultati	9
1.3. Tumor marker	12
1.3.1. Značaj određivanja tumor markera	12
1.3.2. Tumor markeri za karcinom jajnika	13
1.3.3. Tumor marker CA125	14
1.3.4. Tumor marker HE4 i algoritam ROMA	20
1.3.5. Osteopontin (OPN)	21
<b>2. CILJ RADA</b>	27
<b>3. MATERIJAL I METODE</b>	28
3.1. Komercijalni reagensi	28
3.2. Pribor i aparati	29
3.3. Materijal	29
3.4. Metode	31
3.4.1. Određivanje koncentracije OPN ELISA testom	31
3.4.2. Određivanje indeksa rizika za dobijanje ovarijalnog kancera ROMA indeksa	32
3.5. Analiza podataka	32
<b>4. REZULTATI RADA</b>	34
4.1. Karakteristike ispitivanih grupa	34

4.1.1. Socio-demografske karakteristike u ukupnom uzorku	34
4.1.2. Kliničke karakteristike i anamnestički podaci ispitanica	36
4.1.3. Patohistološke karakteristike ispitivanih bolesnica-histološki tipovi tumora	41
4.1.4. Karakteristike bolesnica prema stadijumima tumorske bolesti, histološkom gradusu bolesti i nuklearnom gradusu bolesti	46
4.1.5. Period praćenja ispitanica u ovom istraživanju	50
4.1.6. Ishod u grupi bolesnica sa malignim tumorima	52
4.1.7. Rezultati laboratorijskih ispitivanja	55
4.2. Karakteristike plazmatskog glikoproteina osteopontina	60
4.2.1. Koncentracija OPN-a u ispitivanim grupama	60
4.2.2. Koncentracije OPN-a u ispitivanim patohistološkim tipovima tumora jajnika	63
4.2.3. Koncentracije OPN-a u različitim FIGO stadijumima bolesti	66
4.2.4. Korelacija između OPN-a i ispitivanih grupa	67
4.2.5. Značaj određivanja OPN-a u dijagnostici tumora jajnika	69
4.2.5.1. Granična vrednost OPN-a u predikciji malignog tumora jajnika	70
4.2.5.2. Granična vrednost OPN-a u predikciji benignog tumora jajnika	71
4.2.5.3. Granična vrednost OPN-a u diferencijalnoj dijagnostici benignih i malignih tumora jajnika	73
4.2.5.4. Granična vrednost OPN-a u dijagnostici rane i kasne faze epitelnih tumora jajnika	75
4.2.6. ROC analiza tumor markera OPN, HE4, CA125, i ROMA indeksa u poređenju sa OPN	77
4.3. Poređenje i korelacija osteopontina i drugih tumorskih markera	82
4.3.1. Poređenje nivoa osteopontina sa tumorskim markerima i njihov odnos u različitim tipovima i stadijumima tumora jajnika	82
4.3.2. Korelacija osteopontina i ispitivanih tumor markera	89

4.4. Prognoštički značaj plazmatskog osteopontina kod malignih neoplazmi ovarijuma	92
4.4.1. Coxova logistička regresiona analiza za cut-off 240 µg/L	93
4.4.2. Cox-ova regresiona analiza za cut-off vrednost 760 µg/L	94
4.5. Faktorska analiza glavnih komponenata PCA	96
<b>5. DISKUSIJA</b>	100
5.1. OPN marker tumora ovarijuma	101
5.2. OPN u različitim histopatološkim tipovima tumora	103
5.3. OPN marker progresivnog napretka bolesti	104
5.4. Određivanje dijagnostičkog i kliničkog značaja OPN testa	105
5.5. Poređenje OPN-a sa drugim markerima u predikciji ovarijalnog kancera	107
5.6. Prognoštički značaj OPN-a	110
5.7. Faktorska analiza i diskriminanta analiza kliničkih parametara koji se koriste u predikciji ovarijalnih tumora	111
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	113
<b>7. LITERATURA</b>	117

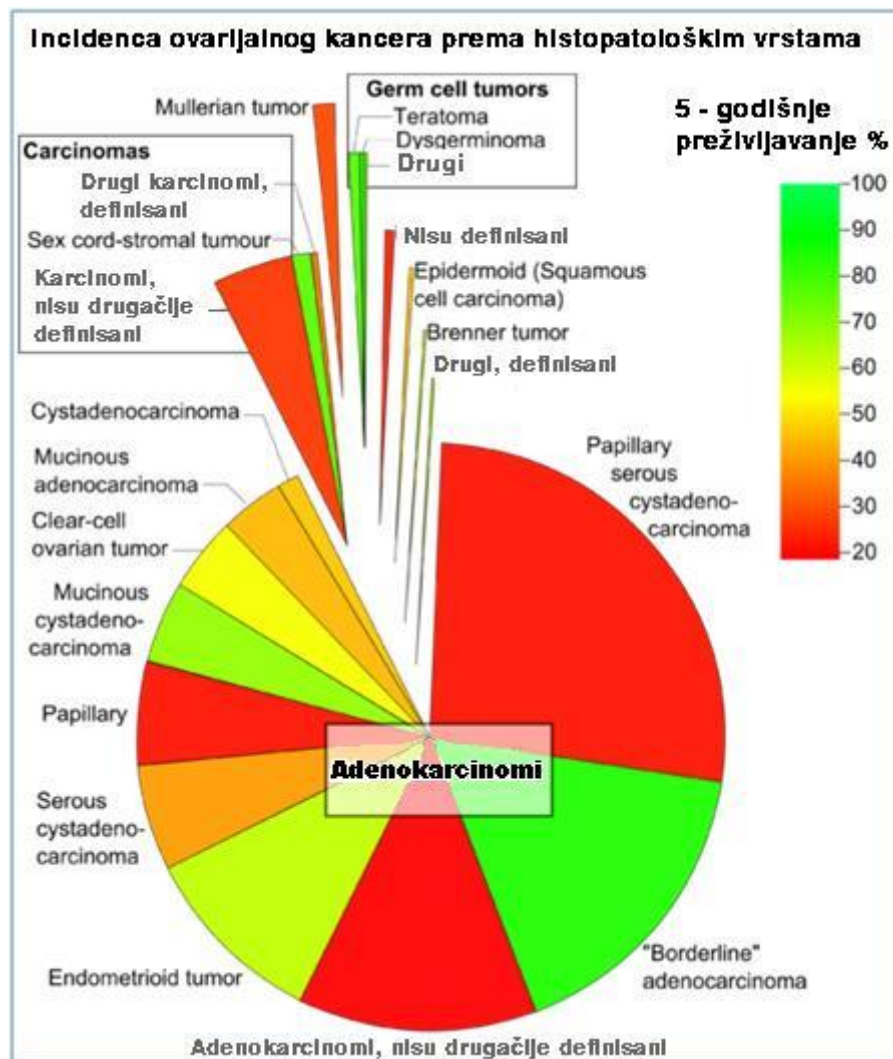
## 1. UVOD

### 1. 1. TUMORI JAJNIKA

#### 1.1.1. Definicija i klasifikacija tumora jajnika

Termin “tumor jajnika” obuhvata heterogenu grupu neoplazmi koja može nastati iz bilo kog tkiva jajnika: germinativnih ćelija, stromalnog ili epitelno tkiva. Benigni tumori, koji čine 94% svih ovarijalnih tumora, obično su cistični: funkcionalne ciste (24%), endometrioidne ciste, tekaluteinske ciste, tumori epitelnih ćelija (cistadenomi) (oko 40%), zreli teratomi (iz germinativnih ćelija), fibromi.

Maligni tumori jajnika čine oko 6% ovarijalnih neoplazmi ali su i deseti najčešći malignitet kod žena (3% svih kancera). U ovarijalne kancere spada više različitih tumorskih kategorija: epitelni tumori (karcinomi) (60-70%), granični tumori jajnika epitelnog porekla-*border line* tumori, germinativno ćelijski tumori (20-25%), tumori porekla specijalizovanih ćelija strome (5%) i metastatski tumori (10%) [1]. Unutar svake od ovih kategorija postoji nekoliko histoloških subtipova. Na prvom mestu po incidenciji i mortalitetu su epitelni karcinomi ovarijuma (EOC) (70%) koji su prema klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije (WHO) i Internacionalne Federacije za ginekologiju i akušerstvo (FIGO) podeljeni na pet histoloških tipova: serozni, mucinozni, endometrioidni, karcinomi svetlih ćelija i tranzicioni karcinomi [2]. Danas se sve više koristi nova klasifikacija EOC: serozni visokog stepena malignosti, endometrioidni, mucinozni, karcinom svetlih ćelija, mucinozni i serozni karcinom niskog stepena malignosti [3]. Ovih pet vrsta EOC mogu biti podeljeni i na subtipove (SI.1) i između sebe se ne razlikuju samo po histološkoj građi već i po tumor genezi, kliničkoj slici, genskoj ekspresiji itd. Detekcija epitelnih karcinoma, najčešće i najletalnije forme ovarijalnog kancera, jedanaes u centru mnogih istraživanja i *screening* programa [4]. Maligni germinativni i stromalni tumori kao što su granulosa ćelijski tumor su retki i računa se da na njih otpada 10% ili manje malignih ovarijalnih tumora.



Slika 1. Incidenca ovarijalnog kancera prema histopatološkim vrstama i petogodišnje preživljavanje kod svih tipova ovarijalnog kancera. Slika je preuzeta iz reference broj 5.

### 1.1.2. Epidemiološki podaci, incidenca i mortalitet

Ovarijalni kancer (OC) je kompleksna bolest sa visokim stepenom smrtnosti i peti je uzročnik smrti žena obolelih od malignih bolesti ali je i najsmrtonosniji od svih ginekoloških maligniteta u SAD [6]. Verovatnoću da od njega oboli ima 1 od 72 žene (ili 1,38%), a mediana starosne dobi u kojoj se dijagnostikuje je 63 godine [7].

Incidenca kancera ovarijuma je 1:2500 žena iznad 55. godina i 1:3800 žena starijih od 25 godina [5].

U svetu godišnje oboli 224.747 žena, a umre 140.163 bolesnice [7]. Postoje značajne geografske i etničke varijacije u godišnjoj incidenci i stopi smrtnosti od ovarijalnih kancera. One su najviše u ekonomski razvijenim delovima sveta, posebno u zemljama severne i zapadne Evrope i Sjedinjenim Američkim Državama, a najniže u Japanu [8]. U Skandinaviji [9] je godišnja incidence 16,23 slučaja na 100.000 žena, a smrtnost od ove bolesti kreće se od 3,6 do 9,3 (2-15) na 100.000 žena. I u Sjedinjenim Američkim Državama je ovarijalni kancer rasprostranjen tako da zauzima četvrto mesto među uzročnicima smrti žena obolelih od karcinoma [6], sa incidencom od 12,6 na 100.000 žena predstavlja najsmrtonosniji reproduktivni kancer. U 2013. godini u SAD-a je dijagnostikovano 22.240 obolelih, a u istoj godini je od ove bolesti umrlo 14.000 žena [7]. U Kanadi je u 2011. godini dijagnostikovano 2.600 novih slučajeva kancera jajnika i u istoj godini umrlo 1.750 žena, čime je ovo oboljenje postalo sedmi najčešći oblik kancera za žene Kanade [10]. U Srbiji je kancer jajnika takođe jedan od čestih maligniteta. Prema podacima Instituta za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović-Batut" za 2010.godinu u Srbiji je u toj godini obolela 651 žena od kancera jajnika, a borbu protiv ove bolesti izgubilo je 416 žena [11]. Iako se javlja retko od karcinoma ovarijuma umire više žena nego od karcinoma cerviksa i uterusa zajedno.

### **1.1.3. Patogeneza i faktori rizika za za dobijanje kancera jajnika**

Postoji nekoliko teorija koje pokušavaju da objasne epidemiologiju ove bolesti: teorija „neprekidne ovulacije“ [12], gonadotropna stimulacija [13], izloženost androgenoj stimulaciji [14], kod sindroma policističnih ovarijuma (PCSO) i u inflamaciji [15]. Radovi koji su objavljeni o faktorima rizika podržavaju jednu ili sve ove hipoteze.

Epidemiolozi se slažu da se u prevenciji bolesti moraju smanjiti faktori rizika ili se bolest mora otkriti rano, pre nego što se jave prvi klinički znaci. Glavni faktori rizika su povezani sa porastom prevalencije bolesti i uključuju: godine života (uglavnom perimenopauzalne i menopauzalne godine), pozitivnu porodičnu istoriju (5-10% ovarijalnih kancera su nasledni), genetske faktore rizika (tumor supresor gene

(BRCA1/2) i onkogene), dijetu (uglavnom mesna i sa zasićanim masnim kiselinama) [16], reproduktivne faktore (infertilitet) [17], hormon supstitucionu terapiju [18], kao i način života. Protektivni faktori su: korišćenje oralnih kontraceptivnih sredstava [19,20], kasna menarha, rađanje i dojenje, optimalna telesna težina (BMI), ginekološko-hirurške intervencije (histerektomija [21], profilaktička ooferektomija [22,23] i podvezivanje jajnika).

Rizik od razvoja raka jajnika se povećava kod žena koje nose mutacije BRCA1 i BRCA2 gena, ili Lynch-ov sindrom (HNPCC-nasledan nepolipni karcinom debelog creva) ili imaju pozitivnu porodičnu istoriju (dva i više rođaka u prvoj ili drugoj generaciji obolela od raka jajnika ili dojke) [24]. Poznato je da osobe sa mutacijom na BRCA1 genu imaju 45% rizik da obole od raka jajnika do svoje 85 godine [25]. Dosadašnje iskustvo sa naslednim vrstama raka jajnika povećava zabrinutost da se biologija nasledne bolesti razlikuje od sporadičnih oblika raka jajnika i da zahteva drugačiju strategiju skrininga. Dokazano je da su nasledni oblici raka jajnika često multifokalni a ne klonski [28]. Morfološki transformisane ćelije sa p<sup>53</sup> mutacijom koje imaju jak metastatski potencijal nađene su i u cistama dobijenim prilikom profilaktičke ooferektomije [29]. Shodno ovome, različiti procesi i strategije se moraju primeniti u otkrivanju sporadičnih i naslednih oblika raka jajnika.

Uprkos unapređenim metodama lečenja i savremenom hemioterapijskim protokolima, rak jajnika je ostao najsmrtonosniji ginekološki malignitet u zadnje tri decenije. Visoka smrtnost, kao i sve veća incidenca ove bolesti daju poseban značaj, ne samo medicinski već i društveni.

#### **1.1.4. Tumorgeneza i klasifikacija ovarijalnih karcinoma**

Dosadašnje znanje o nastanku i razvoju EOC jajnika je vrlo ograničeno. Poznato je da pet vrsta EOC vode poreklo od površinskih epitelnih ćelija jajnika ili od kripti i inkluzionih cisti koje se nalaze na jajnicima [26] i da se svi oni između sebe značajno razlikuju po epidemiološkim i genetskim faktorima rizika, po načinu onkogeneze i širenja, pa i po načinu odgovora na terapiju i prognozu. Aktuelna istraživanja su dokazala da su neke forme EOC za koje se tradicionalno smatralo da su primarni

ovarijalni tumori (pre svega neke forme seroznog EOC) potiču zapravo od jajovoda (*fallopian tube*) ili endometrijuma i kao sekundarni se javljaju u jajniku [27]. Iako je etiologija većine EOC nepoznata za 10% EOC se sa sigurnošću može pripisati mutaciji gena BRCA1 i BRCA2 ili greškama u procesima reparacije gena kao što su MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 koje dovode do Lynchovog sindroma [30]. Postoji više klasifikacija EOC. Prema *FIGO* klasifikaciji EOC su podeljeni na četiri hirurška stadijuma, u zavisnosti od veličine i rasprostranjenosti bolesti. Kod stadijuma I tumor je lokalizovan na jednom ili oba jajnika. U stadijumu II bolest je povezana sa lezijama tumora u karlici. Stadijum III se karakteriše proširenjem bolesti van karlice u abdomen gde zahvata krvne i limfne sudove. A bolest u stadijumu IV se karakteriše postojanjem metastaza na jetri ili plućima. EOC se takođe može klasifikovati prema stepenu diferencijacije: *borderline* (BLT) ili tumori niskog malignog potencijala (LMP) koji se minimalno razlikuju od svojih benignih formi, dok su dobro diferentovani tumori stadijuma I, *moderate* diferentovani su stadijuma II i slabo diferentovani su karcinomi stadijuma III. Kako ovaj sistem klasifikacijeni nije u praksi zaživeo i zamenjen je novom kategorizacijom: karcinomi niskog i visokog stepena malignosti. Kada se kombinuju ove klasifikacije sa histološkim tipovima onda imamo: serozne karcinome (niskog i visokog stepena maligniteta), mucinozne, endometrioidne, i druge retke tipove tumora kao što su Brennerov ili nediferentovan tumor [31].

Ovu kategorizaciju prati i odgovarajući model tumorigeneze opisan u kliničkopatološkim i molekularnim studijama [31]. Tip I su tumori niskog stepena malignosti koji postepeno nastaju iz graničnih *borderline* tumora. Tumori tipa II su visokog stepena malignosti, za koje nisu identifikovane morfološki prepoznatljive preteče lezija, *de novo* razvijene neoplazme. U tumore tipa I spadaju serozni karcinomi niskog stepena malignosti, mucinozni karcinomi, endometrioidni karcinomi. Tumori tipa I se karakterišu jasnim molekularnim promenama kojih nema kod tumora tipa II kao što su *BRAF* i *KRAS* mutacije za serozne tumore, *KRAS* mutacije za mucinozne tumore, i  $\beta$ -katenin i *PTEN* mutacija, kao i mikrosatelitska nestabilnost za endometrioidne tumore. U tumore tipa II spadaju serozni karcinomi visokog stepena malignosti, maligni kombinovani mesodermalni tumor (karcinosarkom) i nediferentovani karcinomi. Malo je podataka o molekularnim promenama kod ovog tipa tumora, osim čestih p<sup>53</sup> mutacija. Kada se kombinuju ove klasifikacije sa histološkim



tipovima onda imamo: serozne karcinome (niskog i visokog stepena maligniteta), mucinozne, endometrioidne, i druge retke tipove kao što su Brennerov ili nediferentovan tumor. Svi ovi podaci ukazuju na činjenicu da se EOC ne mogu smatrati monolitnim kancerima.

Proučavanjem modela kancerogeneze svih pojedinačnih subtipova, molekularnih i genskih promena [32] dobijamo bolju platformu za otkrivanje novih markera kancera jajnika. U tome nam danas pomažu savremene, precizne tehnike: proteomik, epigenomik i metabolomik, pomoću kojih svakodnevno dolazimo do sve kvalitetnijih podataka o nastanku, lečenju i prognozi EOC.

### **1.1.5. Činioci koji utiču na kasnu dijagnozu i tok bolesti**

Kada se bolest otkrije u ranoj kliničkoj fazi i adekvatno leči, petogodišnje preživljavanje doživi 93,5% pacijentkinja [6]. Nažalost, samo 15% ovarijalnih kancera se dijagnostikuje u rano fazi, dok je bolest još lokalizovana. Kod najvećeg broja bolesnica bolest se dijagnostikuje kada se već raširila van karlice i/ili kada postoje udaljene metastaze [33]. Petogodišnje preživljavanje među ovim bolesnicama sa udaljenim metastazama (peritonealnim i ekstrapitonealnim) ima svega 27,6% pacijentkinja [34]. Rezultat toga je velika godišnja stopa smrtnosti [35]. Jedan od razloga kasnog postavljanja dijagnoze je i činjenica da bolest u početku „teče tiho” sa vrlo malo, uglavnom nespecifičnih simptoma: nelagodnost (nadutost) u truhu, učestalo mokrenje, i osećaj napetosti u maloj karlici. Simptomi se značajnije manifestuju (bolovi u stomaku, gubitak apetita i malaksalost) tek sa pojavom metastaza u trbušnoj duplji, što dovodi do toga da se više od 70% bolesnica javlja kada je bolest već uznapredovala i kada je mogućnost izlečenja manja od 20%. U velikoj studiji koja je obuhvatila 1725 žena sa dijagnozom EOC 95% njih je samo tri meseca pre javljanja lekaru osetilo simptome [36]. Činjenica da se ovi simptomi nedovoljno ozbiljno shvataju i da prođe dosta vremena pre nego što se zatraži stručna pomoć pokazala su i najnovija istraživanja obavljena u Velikoj Britaniji [37]. Ali, neke od skoro publikovanih studija stavljaju ipak akcenat na simptome bolesti kada se radi o ranom otkrivanju EOC [38].

Pored toga, jedan od glavnih razloga kasne dijagnostike je i nedovoljna osetljivost tehnika koje se koriste u ranoj dijagnostici ovarijalnih tumora: mala senzitivnost i

specifičnost tumor markera, kao i nesavršenost *imaging* tehnika. Razvoj visoko specifičnih i senzitivnih testova za detekciju ranog stadijuma epitelnog ovarijalnog kancera smatra se ključem promene ove bolesti iz „tihog ubice” kakoga zovu u visoko izlečivu bolest. Testovi koji se koriste u dijagnostici tumora jajnika morali bi pre svega da imaju visoku senzitivnost za otkrivanje ranog stadijuma bolesti. Takođe je potrebno da imaju dobru specifičnost za ovarijalne kancere. Ako bi specifičnost bila niska veliki broj žena sa benignim adneksalnim tumorima bio bi svrstan u grupu malignih bolesnica, a to znači podvrgnut nepotrebnim hirurškim intervencijama (laparotomiji). Kada se ima na umu podatak da se kod 20% žena u nekom periodu života dijagnostikuje cista na jajniku od čega samo mali procenat predstavlja ovarijalne malignitete, pouzdano diferenciranje pelvičnih masa bi omogućilo brzo i adekvatno zbrinjavanje bolesnica kojima je pomoć potrebna u visoko specijalizovanim centrima. Hirurške intervencije su skupe, ali i činjenica da veliki procenat žena umire od posledica komplikacija hirurškog zahvata ukazuje na značaj dobre trijaže kojom bi hirurška intervencija bila primenjena samo kod bolesnica kod kojih konzervativni pristup lečenja nije moguć. Iako je epitelni kancer jajnika bolest sa visokom stopom smrtnosti on je istovremeno i relativno retka bolest, godišnja incidence je 40 žena na 100.000 žena čak i u postmenopauzalnoj populaciji [39]. Danas se smatra da se mogu primeniti one dijagnostičke metode koje imaju pozitivnu prediktivnu vrednost (PPV) > 10%, a to znači da od 10 laparotomija bude bar jedan ovarijalni kancer (tj. da nema više od devet lažnopoziitivnih rezultata na jedan dokazan epitelni ovarijalni kancer) [40]. Da bi ovo postigli *screening* testovi za ovarijalni kancer treba da imaju 99,6% specifičnost i senzitivnost veću od 75% za rani stadijum bolesti [41]. Svi dosadašnji i budući napori uloženi u otkrivanje i optimizaciju novih markera i metoda za dijagnostiku ovarijalnih kancera imali su za cilj ispunjenje ovih zahteva. Nedostatak simptoma u početku bolesti, nesavršenost do sada korišćenih biomarkera i nedovoljna specifičnost *imaging* tehnika, kao i činjenica da do danas zvanično nije usvojena nijedna skrining metoda otežavaju otkrivanje raka jajnika u ranoj prekliničkoj fazi i prevenciju ove bolesti.

## 1.2. Dijagnostičke procedure za evaluaciju tumora jajnika

### 1.2.1. Testovi i prognostički modeli za detekciju tumora jajnika

Postoji nekoliko pristupa za evaluaciju i detekciju epitelnih ovarijalnih karcinoma i oni uključuju: ginekološki pregled, transvaginalni ultrazvuk, laboratorijski nalaz tumor markera (ili panela multimarkera) i dvostepena strategija rane dijagnostike (serumski markeri i ultrazvuk) kao i primena algoritama proteomic obrazaca. Nažalost nijedna od ovih metoda kada se primeni sama nije dovoljno osetljiva u detekciji ranih stadijuma bolesti, ni specifična u diferencijalnoj dijagnostici adneksalnih masa [36]. Senzitivnost i specifičnost manuelnog ginekološkog pregleda nisu dovoljne da bi ovu metodu podržale kao *screening* metod, a najveći broj bolesnica se ovom metodom dijagnostikuje kada se bolest već raširila. Sa ciljem da se unapredi rana dijagnostika i napravi tačna trijaža bolesnica sa malignitetom kojima je potrebno što pre ukazati adekvatnu pomoć, a da se konzervativnim metodama leče sva benigna stanja i time izbegne rizik hirurških intervencija definisani su mnogi matematički predikcioni modeli [42]. Neki od njih su zasnovani na morfološkim podacima dobijenim ultrazvukom: Sassone *scoring* sistem [43], Lerner *scoring* system [44], DePriest *scoring* system [45], Ferrazzi *scoring* system [46] i mnogi drugi. Jedan od najčešće korišćenih *scoring* sistema za izračunavanje rizika dobijanja malignih karcinoma je indeks malignog rizika (RMI) i bazira se na ultrazvučnom pregledu (U), menopauzalnom statusu (M) i vrednosti tumor markera CA-125;  $RMI = U \times M \times CA125$  [47]. Iako je više puta modifikovan (RMI2, RMI3) u praksi se nije pokazao dovoljno dobrim. Danas je najčešće u upotrebi algoritam ROMA, kojim se određuje rizik od dobijanja kancera jajnika. *Artificial neural network* (ANN) je matematički model koji kombinuje menopauzalni status, serumski CA-125, prisustvo ili odsustvo papilarnih struktura i nalaz ultrazvuka [48]. Internacionalna grupa za analizu ovarijalnih tumora (IOTA) standardizovala je pristup ultrazvučnih opisa pelvičnih masa i konstruisala algoritam baziran na 6 demografskih i ultrazvučnih podataka (LR1 i 2), koji imaju za cilj da pomognu lekarima u predikciji malignih stanja [49,50]. Predikcioni modeli imaju veliku primenu u svetu personalizovane medicine i nude adekvatne odgovore u dijagnostici, prognozi i terapiji ovarijalnih kancera.

### **1.2.2. Imaging tehnike u detekciji tumora jajnika**

Od *imaging* tehnika transvaginalni ultrazvuk (TVU) je u kliničkoj praksi najčešće korišćen metod za ranu i diferencijalnu dijagnozu pelvičnih tumora. U jednom istraživanju 25.327 asimptomatskih žena koje su praćene 18 godina sa jednogodišnjim pregledom ultrazvukom u detekciji ovarijalnih tumora dobijena je senzitivnost od 85%, specifičnost 98,7% i PPV 14% [51]. Slična istraživanja podržavaju prednosti ultrazvučnih pregleda [52], dokazana je i prednost 3D ultrazvuka nad 2D ultrazvukom [53], ali dobra senzitivnost i nedovoljna selektivnost onemogućavaju korišćenje ove metode u prvoj liniji skrininga i dijagnostike. Evaluaciju metode TVU-a u dijagnostici pelvičnih tumora samostalno ili u kombinaciji sa tumor markerima, najbolje su dale tri opsežne studije sprovedene u Velikoj Britaniji, Sjedinjenim Američkim Državama i Japanu [54-56]. Velike nade su polagane u rezultate diferencijalne dijagnostike dobijene *color Doppler* tehnologijom (2D PD i 3D PD) kao i indeksima dobijenim ovakvim ispitivanjem (indeks rezistencije, pulsativni indeks, sistolni pik itd.). Naprotiv uporedne analize pokazuju da ova metoda nije ni senzitivna ni specifična kao ultrazvuk [57]. Magnetna rezonanca (MRI), kompjuterska tomografija (CT), i pozitronska emisiona tomografija (PET) najčešće se koriste kao treća linija testa u skriningu ali još uvek nema zvaničnih saopštenja o doprinosu ovih metoda u smanjivanju broja hirurških intervencija [58], a i činjenica da ni negativan nalaz MRI i PET ne isključuje postojanje invazivnog ili *borderline* ovarijalnog tumora smanjuje primenu ovih metoda.

### **1.2.3. Skrining modeli kancera ovarijuma i njihovi rezultati**

Do danas nije zvanično prihvaćena nijedana skrining metoda za detekciju karcinoma jajnika u generalnoj populaciji žena, (definisano je skrining samo u populaciji žena sa visokim rizikom), ali se intenzivno sprovode mnoge dobro opsežne, randomizirane, meta-studije sa ciljem da se uspostavi i definiše skrining i u populaciji žena sa srednjim rizikom. Preliminarni dokazi ukazuju da primenjena strategija pruža dobre rezultate i produžava vreme preživljavanja.

Jedna od takvih studija je i randomizirana studija “*The Shizuoka cohort study of ovarian cancer screening*” (SCSOCS) u kojoj su učestvovala ispitanice iz 212 bolnica u Japanu

u period od 1985. do 1999. godine [54]. Protokol je obuhvatao pregled TVU-om i godišnji nalaz testa CA125 za ispitivanu grupu (n=41.668). Kontrolna grupa je po veličini bila slična ispitivanoj (n=40.799). Nije bilo statistički značajne razlike u broju otkrivenih ovarijalnih kancera između ovih grupa, a PPV je u ovom skriningu bila 9%.

Američko udruženje kliničke onkologije (ASCO) sprovelo je takođe randomiziranu, multicentričnu studiju koja je imala za cilj detekciju ovarijalnog tumora u ranoj fazi u populaciji žena. Jedno od najznačajnijih takvih istraživanja, pod nazivom „*PLCO cancer screening trial*” obavljeno u periodu od 1993. godine do 2001. godine u deset zdravstvenih centara širom SAD-a. U ispitivanje je uključeno 78.000 žena starosti 55-74 godina koje su podeljene u kontrolnu i ispitivanu grupu i praćene 13. godina. Primljena je multimodalna strategija koja je uključivala određivanje testa Ca125 i TVS, i u zavisnosti od individualnog rizika ispitanice su svrstane u tri grupe: sa niskim rizikom, kojima je jednom godišnje određivan tumor marker CA125, srednjim rizikom njima je CA125 meren svaka tri meseca, i grupi visokog rizika osim tumor markera rađen je TVU i specijalistički pregled. Vrednosti CA125 su interpretirane kao ROCA skor (rizik za ovarijalni kancer) što je znatno povoljnije uticalo na tumačenje rezultata. Od 34.253 žene koje su bile u ispitivanoj grupi njih 212 je imalo dijagnozu OC, a 118 je umrlo. Dok je u kontrolnoj studiji od 34.304 žene ovarijalni kancer imalo 176 a umrlo 100 žena, što znači da se ovakvim praćenjem nije smanjio mortalitet bolesnica između ispitivane i kontrolne grupe, a i PPV je bila nedovoljna i iznosila je 1-1,3%. Posle ovako dobijenih rezultata a i zbog nekih dilema koje su postojale studija je prekinuta [55].

Pod pokroviteljstvom *United Kingdom Collaborative trial of ovarian cancer screening* (UKCTOS) dizajnirana je velika, randomizirana, kontrolisana studija čiji su ciljevi bili: da se procene karakteristike oba načina skrininga: a) pojedinačna primena TVU i laboratorijskih nalaza tumor markera, b) njihova kombinacija (kao *multimodalan skrining* MMS ili dvostepena skrining strategija), kao i da se odgovor na pitanje: da li efekat skrininga može da smanji mortalitet od ove bolesti? Između 2001. godine i 2005. godine u studiju je uključeno 202.638 postmenopauzalnih žena između 50-74 godine, koje su podeljene u kontrolnu grupu (n=101.359) bez tretmana, grupu kojoj je jednom godišnje određivan CA125 (rezultati su prikazani kao algoritam ROCA) sa TVU kao drugom linijom testa (n=50.640), i treću grupu u koja je imala samo preglede

TVU (n=50.639). Učesnice su bile iz 13 zdravstvenih centara Velike Britanije, sve su ostavile svoje uzorke krvi u banci krvi za neka dalja ispitivanja, a konačni zaključci ovog skrininga će biti saopšteni 2015. godine. Preliminarni zaključci su pokazali da je multimodalni skrining u ovom istraživanju dostigao SN 89,4%, SP 99,8% i PPV 35,1% i pokazao bolje rezultate od unimodalnog skrininga TVU gde je SN 84,9%, SP 98,2% i PPV 5,3% [56].

Na osnovu činjenica i dobijenih dokaza iz ovih i iz brojnih drugih manjih studija radna grupa preventivnih usluga u SAD-u (*US preventive services task force USPSTF*) je zaključila da ovakav skrining (godišnja analiza CA125 i TVU) pored benefita donosi i evidentne probleme (ne redukuje mortalitet od ovarijalnog kancera, a istovremeno može da ukaže na potrebu hirurške intervencije kod žena koje nemaju karcinom) i izdala je saopštenje (preporuka D) 2012. godine u kome se ne preporučuje ovakav skrining za žene u generalnoj populaciji sa srednjim rizikom za dobijanje ovarijalnog kancera [59]. Radna grupa preventivnih usluga USPSTF, oformljena 1984. godine je nezavisna grupa nacionalnih eksperata za prevenciju i medicinu zasnovanu na dokazima o skriningu i prevenciji bolesti.

Za žene koje pripadaju grupi sa visokim rizikom za dobijanje ovarijalnog tumora, koje imaju višestruku pozitivnu porodičnu istoriju ili potvrđenu gensku mutaciju, saveti ove radne grupe i predlozi Nacionalnog Instituta za zdravlje (*National Institutes of Health*) se odnose na redovno obavljanje godišnjih pregleda, praćenje tumor markera i preglede TVU, sve dok se ne završi period rađanja ili bar do 35. godine posle čega je preporučena profilaktička oofektomija. Iako je broj žena sa naslednim sindromom mali 0,05% od ukupne populacije žena, one imaju 40% faktora rizika za dobijanje ovarijalnog kancera [60].

Strategija predloženog skrininga u generalnoj populaciji žena nije usvojena do danas, a od velikog je značaja za ranu detekciju CO je izrada vodiča, uputstava za primenu raspoloživih testova, predikcionih modela koji su zasnovani na dobro definisanim i sprovedenim procenama primene postojećih metoda [61, 62].

### **1.3. Tumor markeri**

#### **1.3.1. Značaj određivanja tumor markera kod karcinoma ovarijuma**

Biomarkeri su „alat” za bolju identifikaciju bolesnika, za tačno i pravovremeno postavljanje dijagnoze, za efikasnu prognozu i lečenje bolesnika. Izrazom biomarker u medicini se označava najčešće protein izmeren u krvi čija koncentracija ukazuje na normalan ili patološki odgovor organizma, kao i na farmakološki odgovor na primenjenu terapiju. Šire gledano biomarker je bilo koji pokazatelj koji se koristi kao indikator intenziteta nekog oboljenja ili drugog patološkog stanja u organizmu. Biomarker može biti šema genske ekspresije, promene u strukturi DNK, ćelijski receptor, imunoglobulin i drugi.

Tumor marker je supstanca koju produkuje tumor ili „domaćin” kao odgovor na prisustvo tumora, a koristi se za diferencijaciju tumorskog tkiva od zdravog ili za potvrđivanje postojanja tumora. Tumorski markeri uključuju različite supstance: antigene na površini ćelija, citoplazmatske proteine, enzime, hormone, onkofetalne antigene, receptore, onkogene i njihove proizvode. U zavisnosti od svoje strukture mogu se meriti hemijski, imunološki ili metodama molekularne biologije. Neki tumor markeri su specifični samo za jednu vrstu tumora, dok su mnogo češći oni koji su karakteristični za više vrsta tumora, a ima i takvih koji se javljaju i u benignim i u malignim bolestima. Uloga tumorskih markera je sve veća u svim aspektima malignih bolesti od detekcije pa do praćenja tretmana i prognoze, a njihova mudra primena u kliničkoj praksi zahteva potpuno razumevanje patofiziologije, tehnike identifikacije i ispitivanja, razloge za postojanje nivoa van definisanih opsega tumor markera, kao i poznavanje njegove uloge u malignim procesima. Klinička primena tumor markera se može podeliti na: a) skrining kojim se utvrđuje subklinička forma bolesti i rano otkrivanje, b) dijagnostička potvrda postojeće bolesti, c) *staging* tumor markeri koji definišu stadijum i težinu bolesti, d) prognostički kojima se predviđa odgovor na terapiju, e) markeri kojima se prati tok bolesti i utvrđuje remisija bolesti.

Danas postoji široka primena serumskih tumor markera pre svega zbog njihovog jednostavnog načina dobijanja (neinvazivnim metodama), ali i brzog odgovora koji u relativno kratkom vremenu mogu da ponude [63, 64].

Tri najvažnije karakteristike koje bi trebao da ima idealan tumor marker su: a) trebalo bi da bude veoma specifičan za datu vrstu tumora, b) da u najkraćem mogućem vremenu ukaže na postojanje tumora, c) trebalo bi da bude veoma osetljiv da bi izbegao lažno pozitivan rezultat. Pored toga nivo markera treba pouzdano da korelira sa veličinom tumora, da bi odražavao tačno progresiju ili regresiju tumora, uz kratak polu život što omogućava serijska merenja. Test za određivanje tumor markera treba da bude jeftin za primenu skrininga na masovnom nivou, a takođe treba da bude prihvatljiv za ciljnu populaciju.

Za tumačenje dobijene vrednosti tumor markera potrebno je znati referentni interval koji nam daje jednostavnu biološku informaciju, ali tek sa definisanjem granica odlučivanja za rizik od ispitivane bolesti (cut-off) u potpunosti saznajemo o kliničkoj primeni dobijene vrednosti markera. Ovo je posebno važno za dijagnostičke markere kod kojih definisane granice odlučivanja predstavljaju optimalnu koncentraciju koja može da razdvoji zdrave od bolesnih. Dijagnostička vrednost biomarkera se obično prvo procenjuje određivanjem dijagnostičke osetljivosti i specifičnosti pomoću ROC (receiver operating characteristic) krive. Odgovarajuća evaluacija biomarkera zahteva korišćenje Bayes-ove teoreme, koja integriše pre-test verovatnoću (prevalence bolesti) sa tačnošću biomarkera (izraženu osetljivošću/specifičnošću) da bi izrazili prediktivnu vrednost biomarkera (post-test verovatnoću bolesti).

### **1.3.2. Tumor markeri za karcinom ovarijuma**

Potreba za razvojem pouzdanih biomarkera, visoke specifičnosti i dobre senzitivnosti za rano otkrivanje i predikciju kancera jajnika, već dugo je prioritet. Udruženje *Early Detection Research Network* (EDRN) osnovana od strane *National Cancer Institute* (NCI) predložila je smernice za razvoj i istraživanje biomarkera [65]. U zbrinjavanju obolelih od ovarijalnog kancera ovi biomarkeri se mogu koristiti za razlikovanje malignih od benignih pelvičnih masa, za praćenje odgovora na terapiju, za prognozu



bolesti, za predikciju odgovora na individualnu terapiju, i za detekciju ranih faza bolesti [66]. Nekoliko epitopa na epitelnom mucinu dobijenih od gena MUC1 identifikovani su kao ciljni biomarkeri velike familije tumor markera koja uključuje: CA549, CASA, CA19-9, CA15-3, MCA, MOV-1 i TAG72, Cyfra21-1i među njima najviše ispitivan CA125 [67]. Zadnjih godina usavršavanjem postojećih i razvijanjem novih tehnika predloženi su novi potencijalni tumor markeri za detekciju rane faze kancera jajnika. Najčešće analitičke metode za detekciju tumor markera su: enzimске metode, imunološke metode (RIA, ELISA), receptorske metode: imunohistohemija (IHC), fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH) i instrumentalne tehnike (hromatografija, elektroforeza, masena spektrometrija sa tečnom ili gasnom hromatografijom). Među ovim metodama u detekciji tumor markera za kancer ovarijuma najveći značaj su imale: MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) i SELDI (surface-enhanced laser desorption ionization) proteomik tehnike masene spektrometrije [68,69]. Takođe je značajan napredak donela *microarray* tehnika u otkrivanju novih kandidata za markere raka jajnika [70,71]. Među njima se nalaze kalikrein, mezotelin, HE4 protein, osteopontin, prostasin. Danas smo svedoci velikog broja novootkrivenih tumor markera od kojih većinu čeka ozbiljna analitička i klinička evaluacija i dug put do šire primene u kliničkoj praksi. Multimarkerska strategija koja bi obuhvatala patobiološki različit set biomarkera, mogla bi da bude pravac budućih istraživanja i pomogne u ranoj dijagnostici kancera jajnika.

### **1.3.3. Tumor marker CA125**

Do danas najčešće korišćen, najbolje proučen, nazvan „zlatnim standardom” je serumski tumor marker CA125 [72]. Identifikovan je 1981. godine. od istraživača Bast i saradnika [73] kao glikoproteinski molekul velike težine koji se pojavljuje u serumu oko 90% pacijentkinja sa epitelnim ovarijalnim kancerom [74]. Bast i saradnici su dobili MAb OC 125 koristeći ćelijsku liniju (OVCA 433) od pacijentkinja sa seroznim papilarnim cistadenokarcinomom jajnika. CA125 je mucin (MUC 16) veličine 1MDa sa intracelularnim, transmembranskim i ekstracelularnim aktivnostima. Ovaj glikoprotein se javlja u amnionskoj tečnosti i celomik epiteliumu, kao i u odraslim tkivima dobijenim iz celomik (mezotelnim ćelijama pleure, perikardiuma i peritoneuma) i

Mullerian (tube, endometrium i endocerviks) epitela. Analitički test za detekciju CA125, komercijalizovan 1983. godine imao je OC 125 antitelo za vezivanje i merenje antigena. Danas se koristi unapređen i dopunjen test druge generacije (CA125II) koji sadrži dva antigen mesta, za koja se vezuju monoklonalna antitela OC125 i M11 [75]. Drugo antigen mesto otkrio je O'Brien sa saradnicima 1991. godine i omogućio nastanak novog i kvalitetnijeg CA125II testa [76]. Druga generacija analitičkog testa (CA125II) adaptirana je za primenu na automatima, i prihvaćena od strane FDA (US Food and Drug Administration) za kvantitativno merenje CA125 u serumu žena sa primarnim epitelnim ovarijalnim kancerom.

Zadnjih decenija Ca125II se pokazao kao pouzdan serumski tumor marker za razlikovanje benignih od malignih pelvičnih tumora, praćenje postoperativnog toka bolesti, odgovora pacijentkinja na hemoterapiju, kao i u otkrivanju relapsa bolesti [77]. Kod pacijentkinja sa razvijenim kancerom ovarijuma CA125 je povišen u 90% slučajeva i postoji dobra korelacija između tumor markera i veličine tumora tj. stadijuma bolesti [78]. Ove karakteristike čine CA125 odličnim tumor markerom za praćenje odgovora na terapiju. Druge preporuke koje uključuju primenu CA125 odnose se na ranu detakciju ovarijalnog kancera kod žena sa BRCA 1/2 genskom mutacijom i prognozom. Ipak, korišćenje CA125 ima i ograničenja. Niko od onkologa-ginekologa ne preporučuje korišćenje CA125 za skrining ovarijalnog kancera zato što CA125 nema potrebnu osetljivost i specifičnost za skrining u generalnoj populaciji žena.

Kada se koristi individualno, CA125II nije dovoljno senzitivna da otkrije rane faze bolesti [79]. Najveći broj studija ukazuje da je sa CA125 moglo da se evaluira 50%-60% prvog stadijuma klinički dokazane bolesti. Specifičnost ovog markera u generalnoj populaciji nije zadovoljavajuća pre svega zbog signifikantnog rasta koncentracije u benignim stanjima: endometrioza, adenomioza, ovarijalne ciste, pelvična zapaljenja, ranalna disfunkcija i bolesti jetre. Povišene vrednosti se sreću kod 1-2% žena koje nemaju OC, 5% od njih su sa benignim bolestima, a 28% sa neovarijalnim kancerima: pankreasa, jetre, dojke, kolorektalni i drugi gastrointestinalni tumori [80, 81].

Cut-off vrednost od 35 U/mL je preporučena na osnovu distribucije vrednosti zdravih osoba. Primećeno je da se ova vrednost povećava sa menopauzom i godinama starosti.

Takođe je saopšteno da postoje varijacije u koncentraciji CA125 između rasa (kod žena iz Azije i Afrike vrednosti CA125 su niže nego kod žena sa Kavkaza [80], u toku menstrualnog ciklusa (u folikularnoj fazi koncentracija markera CA125 se povećava).

Kod žena sa dijagnozom epitelnog ovarijalnog karcinoma CA125 je povišen (>35 U/mL) u 80% slučajeva. Ovaj test dostigao je senzitivnost od 50% do 60% u detekciji stadijuma I EOC, do 90% za stadijum II, i preko 90% za stadijume III i IV [82]. Povišeni nivoi CA125 su više povezani sa seroznim histološkim tipom nego sa mucinoznim tipom epitelnog ovarijalnog karcinoma. Brojna ispitivanja urađena sa ovim markerom su pokazala da se njegova koncentracija eksponencijalno povećava 10-21 mesec pre nego što se postavi dijagnoza EOC [83]. Eksponencijalni rast CA125 je takođe dokumentovan u studijama iz Švedske i Velike Britanije [84, 85]. U ovim studijama je uočen progresivan raste nivo CA125 kod malignih bolesnica, dok u benignim stanjima nivo, iako povišen, ostaje konstantan.

Zbog nedovoljne specifičnosti i senzitivnosti ovaj tumor marker nije preporučen za skrining u generalnoj populaciji žena ni od strane *National Academy for Clinical Biochemistry*, ni od drugih merodavnih, referentnih institucija [86-90]. Preporučeno je godišnje određivanje CA125 u kombinaciji sa TVU u grupi žena sa visokim rizikom za ovarijalni karcinom. Pokušaji da se poveća specifičnost ovog biomarkera i da se dovede na nivo od 99,7% koliko je potrebno da bi se dostigla PPV od 10% su brojni: longitudinalno merenje CA125, kombinacija sa TVU u obliku dvostepene strategije, dopuna sa drugim biomarkerima ili otkrivanje novih biomarkera savremenim tehnikama [91-93].

U dve velike, randomizirane studije sprovedene u SAD-u (PLCO) i Velikoj Britaniji (UK CTOS) prati se između ostalog CA125 na velikom broju uzoraka i njegova kombinacija (konkurentna i sekvencionalna) sa TVU u dvostepenoj strategiji ranog otkrivanja ovarijalnog kancera. Ova strategija je zamišljena kao analogna procedura skriningu grlića materice (citologija i kolposkopija) i skriningu za dojku (mamografija i biopsija). Ova klinička istraživanja susveobuhvatna i dobro dizajnirana, i istraživači se nadaju da će pružiti odgovor na pitanje: da li skrining u prevenciji ovarijalnog kancera kod postmenopauzalnih žena sa CA125 i TVU može da smanji mortalit. Odgovor na

ovo pitanje je primarni cilj ovih i mnogih drugih studija. Konačni rezultati se očekuju 2015. godine, ali preliminarni rezultati pokazuju da je medijana preživljavanja u ispitivanoj grupi (72,9 meseci) signifikantno veća nego u kontrolnoj grupi (41,8 meseci) [94]. Algoritam koji je korišćen (ROCA) za izračunavanje rizika od dobijanja ovarijalnog kancera zasniva se na serijskom merenju CA125II i izračunavanju linearne regresije log (CA125II) i omogućava svrstavanje bolesnica u grupe: sa niskim, srednjim i povišenim rizikom [95]. Skates i kolege [96] su napravile algoritam ROCA koji može da odvoji pacijentkinje sa ovarijalnim kancerom od zdravih sa senzitivnošću od 83%, specifičnošću od 99,7% i PPV od 16,0% što su pokazali prvi rezultati ovih studija. Ovo je značajan korak napred u popravljajući osetljivosti metode za rano otkrivanje raka jajnika.

Za razliku od primene ovog markera u *skrining-u* generalne populacije žena koji se još uvek ispituje, CA125II se često primenjuje u razlikovanju benignih od malignih ovarijalnih tumora, posebno kod post-menopauzalnih žena sa ovarijalnom masom [90]. U postoperativnom praćenju antigen CA125II kao serumski marker je pokazao zadovoljavajuće rezultate [82, 91]. Iako je bilo kontradiktorno o tome da li porast markera treba bezuslovno da vodi „second-look” operaciji sigurno je da porast ili udvostručenje CA125II ukazuje na povratak bolesti. Ipak i negativna vrednost ne isključuje prisustvo bolesti [90]. Primena CA125II u praćenju efekta terapije je do sada dala najbolje rezultate. Porast nivoa CA125II korelira sa neadekvatnim odgovorom na terapiju, čak i kada se bolest ne vidi *imaging* tehnikama. U meta-studiji [97] koja je obuhvatila 531 ispitanicu, kod 89% žena porast CA125II ukazuje na ponovnu pojavu bolesti [97]. Većina autora radova o CA125II se slaže o tome da je ovaj marker dobar u praćenju terapijskog odgovora bolesti. Definiciju odgovora na terapiju dala je *Gynecologic Cancer Intergroup* (GCIC) koja u svom saopštenju kaže da je smanjenje nivoa CA125 za 50% ili više u odnosu na nivo pre tretmana pacijentkinja u periodu od 28 dana pozitivan odgovor [98-100]. I prognostička uloga CA125 je danas prihvaćana, kako pre tako i postoperativno [101-103]. Posle primarnog zbrinjavanja bolesnica hirurški i hemioterapijski, pad nivoa CA125 tokom hemoterapije prihvaćen je kao nezavistan prognostički faktor. Konstantno povišen nivo CA125 ima lošu prognozu. Tako je dokazano da kod pacijentkinja koje su pre operacije imale nivo CA125 > 65 U/mL

petogodišnje preživljavanje je znatno niže nego kod bolesnica čije su vrednosti markera bile manje od 65 U/mL [97]. Na osnovu svih ovih saopštenja CA125 se može smatrati validnim serumskim markerom koji se može koristiti u rutinskoj kliničkoj praksi zbrinjavanja kancera jajnika [67].

Prema preporukama za laboratorijsku medicinu Nacionalne akademije za kliničku biohemiju (*National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for the Use of Tumor Markers in Ovarian Cancer NACB LMPG*) za upotrebu laboratorijskih biomarkera u bolestima jajnika samo je CA125 prihvaćen, sa nivoom dokaza I i II, za kliničku primenu i to za praćenje terapije, pojavu recidiva i prognozu bolesti [92]. Ovaj vodič koji je formiran na osnovu istraživanja mnogih institucija (EGTM, *European Group on Tumor Markers*; ESMO, *European Society for Medical Oncology*; NACB, *National Academy for Clinical Biochemistry*; NCCN, *National Comprehensive Cancer Network*; NIH, *National Institutes of Health*) dao je veliki panel biomarkera za koje postoje dokazi da se mogu koristiti u dijagnostici i terapiji ovarijalnih kancera (Slika 2). Da bi se koristili ovi potencijalni markeri treba da ispune brojne kriterijume, da prođu ozbiljnu analitičku i kliničku evaluaciju, validaciju i kritička procena efikasnosti i da prođu dug putu do primene u kliničkoj praksi. Jedan od predloženih markera za kancer ovarijuma je i OPN.

<b>Tumor marker</b>	<b>Preporuke korišćenja</b>	<b>Preporuke razvoja</b>	<b>Nivo dokaza</b>
CA125	Praćenje bolesti	Prihvaćen u klin. praksi	I,II
OPN	Praćenje bolesti	Faza ispitivanja	III, IV
CEA	Praćenje bolesti	Faza ispitivanja	IV
TATI	Praćenje bolesti	Faza ispitivanja	IV, V
Kalikeini 5,6,7	Dijagnoza, praćenje	Faza ispitivanja	IV, V
LPA	Detekcije	Faza evaluacije	IV, V
TPA	Praćenje bolesti	Faza ispitivanja	IV
CASA	Praćenje bolesti	Faza ispitivanja	IV
PAI-1	Predikcija prognoze	Faza ispitivanja	V
IL-6	Predikcija prognoze	Faza ispitivanja	IV
Prostasin	Diferencijalna dijagnoza	Faza ispitivanja	IV
Urinarni $\beta$ hCG	Predikcija prognoze	Faza evaluacije	III, IV
IGFBP-2	Predikcija prognoze	Faza ispitivanja	IV
Tumorska DNK	Detekcija	Faza ispitivanja	IV
Her-2	Predikcija prognoze	Faza evaluacije	IV
Akt-2	Predikcija prognoze	Faza ispitivanja	V

Slika br.2. Tumor markeri za kancer ovarijuma. Slika preuzeta iz reference br. 92

### 1.3.4. Tumor marker HE4 i algoritam ROMA

HE4 (*Human Epididymis Protein 4*) je prekursor epididernalnog sekretornog proteina E4. Ovaj protein je član velike familije WFDC (*whey acidic four-disulfide core*) kiselih proteina sa disulfidnim jezgrom i potvrđena je njegova pojačana sinteza kod ovarijalnih tumora. Sve funkcije ovog proteina još uvek nisu poznate ali se sa sigurnošću može reći da ima veliku senzitivnost i specifičnost kao serumski marker u detekciji neoplazmi jajnika. Brojne studije (104,105) su istakle prednosti ovog markera nad dosad korišćenim markerima. Kada se koristi sam u dijagnostici ranih stadijuma bolesti dobijaju se dobri rezultati u detekciji ranih stadijuma OC: osetljivost 72,9% i specifičnost 95% (106). U kombinaciji sa CA125 takođe popravljaju dijagnostičku osetljivost 76,4% za specifičnost 95%. U retrospektivnoj studiji u kojoj je praćeno 80 pacijantkinja obolelih od OC, 93% bolesnica kod kojih je porast nivoa HE4 bio veći od 25% imale su progresiju bolesti. Neki autori su dokazali da ovaj marker ima dobru osetljivost u detekciji ovarijalnih karcinoma u prvim fazama bolesti kada CA125 nije povišen (osetljivost 45,9% specifičnost 95%) [107]. Postoje i suprotna mišljenja po kojima je CA125 bolji i precizniji [107, 108] marker u predikciji ovarijalnih kancera. Algoritam dobijen kombinacijom ova dva tumor markera u logistički model nazvan indeksom za procenu rizika od ovarijalnog kancer (ROMA indeks) se pokazao u praksi kao najbolji prediktor za neoplazme jajnika [109, 110].

ROMA indeks kojim se procenjuje verovatnoća da pacijentkinje sa adneksalnom cistom imaju kancer jajnika izračunava se na osnovu koncentracije HE4 i CA125 i menopauzalnog statusa. U zavisnosti od menopauzalnog statusa postoje i različiti algoritmi za ovaj indeks i različite cut-off vrednosti. Dobijene vrednosti u kombinaciji sa drugim kliničkim metodama omogućavaju trijažu bolesnica sa ovarijalnim tumorima.

### 1.3.3. OSTEOPONTIN (OPN)

Osteopontin (OPN) je intracelularni i ekstracelularni fosfoglikoprotein koji se vezuje za brojne ćelijske receptore kao što su integrini i CD44. Javlja se u mnogim tkivima i sekretuje u gotovo svim telesnim tečnostima krv, mleko, urin. Osteopontin učestvuje u zarastanju rana, u procesima koštanog *turnover*-a, tumorigenezi, zapaljenjima, alergijama i autoimunim bolestima. Osteopontin igra značajnu fiziološku ulogu u remodeliranju kostiju, imunim odgovorima i zapaljenskim procesima, ali je dokazana i njegova povezanost sa tumorigenezom, progresijom i metastaziranjem tumora.

Poznat je i kao koštani protein sialoprotein1 (BSP-1 ili BNSP), kao rani aktivator T-limfocita (ETA-1) i kao sekretorni fosfoprotein 1 (SPP1). Član je velike porodice SIBLING glikoproteina (*small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein*). Ova porodica glikoproteina ulazi u sastav skeleta i utiče na kompleksne funkcije koje skelet ima od lokomotornih do jonske homeostaze. Organska komponenta kostiju, osteoid, obuhvata ekstracelularni matrix (ECM) primarno sastavljen od kolagena tipa I i nekoliko nekolagenih proteina (NCPs) među kojima su najznačajniji proteini familije SIBLING. Poreklo ove grupe proteina je najverovatnije od kalcijum-vezujućeg fosfoproteina genskom duplikaturom koja se javila tokom evolutivnog razvoja [111-114] i ostala sačuvana kako kod ljudi tako i u drugim vrstama. Svi članovi SIBLING porodice imaju sličnu gensku i proteinsku strukturu [115-117], ulaze u sastav kostiju i dentina i prolaze kroz slične post-translacione modifikacije kao što su fosforilacija i glikozilacija koje su ključne za njihove dalje funkcije [118]. Poznato je da proteini ove grupe u svom sastavu imaju arginin-glicin-aspartat (RGD) sekvencu amino kiselina koja omogućava spajanje ćelija i prenos signala kroz ćeliju vezivanjem za ćelijske integrine [119]. Nedavno, identifikovan je novi deo molekule koga uglavnom čine amino kiseline serin i aspartat-ASARM (*acidic-serin and aspartat-rich motif*) za koji je dokazano da ima glavnu funkcionalnu aktivnost [115, 120] u procesima mineralizacije kostiju i dentina.

Jedan od najpoznatijih predstavnika ove familije SIBLING proteina osteopontin otkriven je 1986. godine u kostima odakle i potiče njegovo ime „osteopontin“. Sufiks „pons“ (latinska reč za most) ukazuje na njegovu ulogu u povezivanju proteina [121].



Gen za OPN se kod ljudi nalazi na hromozomu 4 u regionu 13 (4q13) i ima 7 exona [122, 123]. Ovaj ekstracelularni protein se sastoji od oko 300 amino kiselinskih ostataka, molekulske mase (Mr) od 33 kDa kao nascentni protein i karakteriše ga izrazito negativno naelektrisanje. Bogat je asparaginskom kiselinom, glutaminskom kiselinom i sadrži oko 30 monosaharida i desetak ostataka serina. Postoji veliki broj posttranslatorskih modifikacija u kojima težina molekula može da dostigne i 44kDa. Kao glikozilirani, sekretorni fosfoprotein-osteopontin ima značajne uloge u organizmu, najčešće u migraciji i promeni oblika ćelije, kretanju, fuziji ćelija, kao hemotaktički faktor, zatim u procesima mineralizacije koštanog matriksa i u imunom odgovoru nekih ćelija i tkiva.

Biosinteza ovog proteina se odigrava u različitim tkivima i ćelijama: fibroblastima [124], osteoblastima [125], osteocitima [126], ćelijama koštane srži, osteoklastima [127], hondrocitima, dendritskim ćelijama, makrofagama [128], ćelijama glatkih i skeletnih mišića [129, 130], vaskularnim endotelnim ćelijama [131], kardijačnim miocitima, u ćelijama mozga, bubrega i placentе. Sinteze OPN-a je stimulisana kalcitriolom (1,25-dihidroksi-vitamin D3). Hipokalcemija i hipofosfatemija takođe, stimulišući ćelije proksimalnih tubula bubrega da stvaraju kalcitriol povećavaju transkripciju, translaciju i sekreciju osteopontina [132,133]. Stimulaciju genske ekspresije OPN-a vrše i proinflamatorni citokini [134] kao i medijatori inflamacije (npr. faktor nekroze tumora  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), angiotenzin II i drugi). Hiperglikemija i hipoksija takođe povećavaju ekspresiju gena OPN-a [135].

Izoforme ovog proteina su brojne. Intracelularna varijanta osteopontina (iOPN) je uključena u brojne ćelijske procese: pokretljivost, migracija, fuzija. Ekstracelularne forme osteopontina (osteopontin-a, osteopontin-b i osteopontin-c) nastale cepanjem molekula, sreću se u tkivima različitih tipova kancera. Tako je poznato da osteopontin-c olakšava nastanak jednog tipa tumora dojke zahvaljujući asocijaciji sa ekstracelularnim matrixom [136].

Fosforilacija osteopontina se može odigrati na čak 28 lokacija širom molekula. OPN u svojoj strukturi ima osetljiva mesta na dejstvo proteaza i one mogu da cepaju molekulu OPN na deo koji se vezuje za integrine i za CD44 vezujuća mesta.

Trombin takođe cepa molekulu osteopontina tako da nastaje (OPN-R) epitop koji vezuje integrinske receptore  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 9\beta 1$  i  $\alpha 9\beta 4$ . Ovi integrinski receptori se nalaze na membranama leukocita i imaju značajnu funkciju u ćelijskoj adheziji, migraciji i preživljavanju ćelija. Osteopontin se javlja i kod velikog broja imunih ćelija: mastocita, neutrofila, T-limfocita, B-limfocita, monocita i makrofaga, gde ima ulogu imuno modulatora. Takođe vezivanjem OPN-a za integrinske receptore u ćeliji se aktiviraju signalni tranzicioni putevi imunog odgovora ćelije. Ova uloga osteopontina kao medijatora u imunim procesima je vrlo kompleksna i obuhvata hemotaktičku ulogu, ulogu adhezionog proteina u privlačenju ćelija do povređenog mesta i zarastanje rana, kao i aktivaciju ćelije [137].

Hemotaktička uloga OPN, privlačenje ćelija i oporavak zapaljenskog mesta potvrđena je u: privlačenju neutrofila kod alkoholne bolesti jetre [138], skupljanju inflamatornih ćelija u artritične zglobove kod reumatoidnog artritisa [139], kao hemotaktički faktor makrofaga [140] itd. Uloga osteopontina u ćelijskoj aktivaciji se ogleda u njegovoj mogućnosti da stimuliše diferencijaciju T-helper ćelija prema Th1 tipu tako što inhibira produkciju Th2 citokina (IL-10) i usmerava diferencijaciju ka Th1 subpopulaciji [137]. OPN ima i funkciju kao citokini Th1 ćelija. On pojačava produkciju i proliferaciju B limfocita. Takođe je ukazano da OPN može da indukuje degranulaciju mastocita [141]. Osteopontin je i važan antiapoptotički faktor. Poznato je da sprečava programiranu smrt ćelija makrofaga, T-limfocita, fibroblasta i endotelnih ćelija kad su izložene smrtonosnim oštećenjima [142].

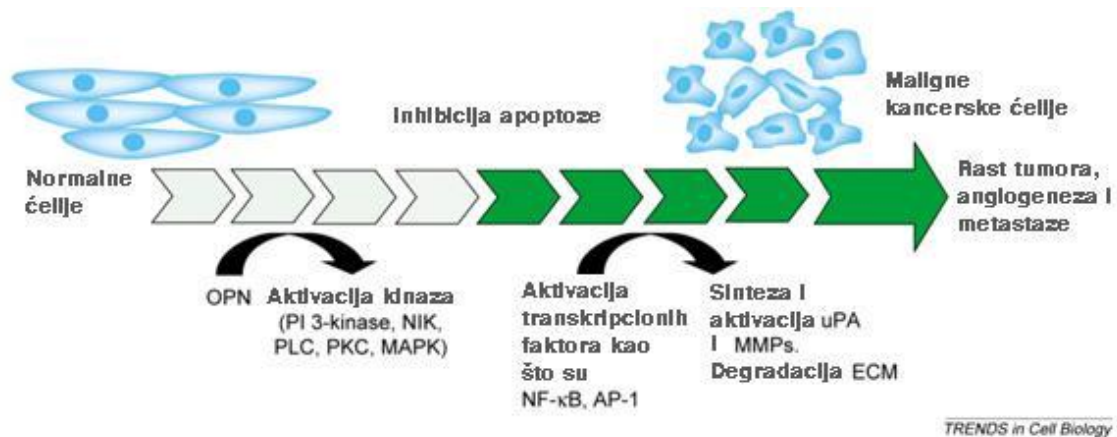
Prva biološka funkcija ovog proteina koja je dokazana je njegovo učešće u mineralizaciji kostiju i remodeliranju skeleta. Hondrociti i osteoblasti omogućavaju mineralizaciju ekstracelularnog matriksa (ECM-osteoid) kostiju tako što se u vezikulama matriksa ovih ćelija akumuliraju joni kalcijuma ( $\text{Ca}^{2+}$ ) i neorganskog fosfora (Pi) u prvoj fazi bifaznog procesa mineralizacije [143]. Kada su koncentracije ovih jona dovoljne započinje precipitacija u kristale hidroksiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) koji penetriraju kroz trilaminarnu membranu vezikula matriksa u ekstracelularni prostor (ECM) bogat kolagenom i brojnim proteoglikanima. Osteopontin je u ovom procesu „most” između ćelija osteoida i hidroksiapatita (HA) u ECM kostiju. Inhibitorna uloga osteopontina u ovom visoko sofisticiranom procesu u kome efektivna mineralizacija

matriksa kostiju zavisi od koncentracije jona  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Pi}$ , aktivnosti nekih enzima (alkalne fosfataze), ali i od inhibitora mineralizacije kao što su neorganski fosfat (PPi) i proteini matriksa, opisana je u studijama [144]. U skorašnjim istraživanjima ukazano je da ASRAM peptid osteopontina vezuje kristale HA i tako inhibira mineralizaciju ECM [145, 146]. Činjenica da sposobnost ASRAM-OPN da veže kalcijum iz HA zavisi od stepena fosforilacije serinskog ostatka, ukazuje na značaj post-translacione obrade osteopontina [147]. Bogat negativnim naelektrisanjem aminokiselinskih ostataka i sa fosforilisanim serinskim ostacima, molekul izmenjenog osteopontina se otvara i nastaju nova fleksibilna mesta koja mogu čvrsto da vežu kalcijum u različitim biomineralima: kalcijum-fosfat u kostima i zubima [148], kalcijum-karbonat u srednjem uhu [149], kalcijum-oksalat u kamenu bubrega [150].

Osteopontin je takođe supstrat za brojne enzime čijom aktivnošću se njegova uloga inhibitora mineralizacije menja. Jedan od takvih enzima je PHEX (fosfat-regulisana neutralna endopeptidaza, X-vezana) koji intenzivno razgrađuje osteopontin. Genske mutacije ovog enzima dovode do osteomalacije i X-vezane hipofosfatemije. Bolesnici sa X-vezanom hipofosfatemijom imaju mek i deformisan skelet i meke zube koji su podložni infekciji. Pored uloge u regulisanju normalne mineralizacije ekstracelularnog matriksa kostiju i zuba, osteopontin reguliše i mesta patološke, ektopične kalcifikacije kao što su urolitijaza i vaskularna kalcifikacija. Značajnu ulogu u remodeliranju ljudskog skeleta (godišnje se remodelira 10%) ima osteopontin iz osteoklasta, koji omogućava formiranje „krovne ivice“ između ćelije i površine kostiju pre početka resorpcije. Činjenica da OPN reaguje sa mnogim receptorima na različitim ćelijama, da podleže brojnim post-transkripcionim i post-translatornim promenama, fosforilaciji i glikozilaciji, kao i proteolizi molekula na više mesta, čime menja smer svojih aktivnosti, čini ga jednim od najznačajnijih učesnika u mnogim fiziološkim stanjima i patološkim procesima. Zato bi bilo značajno sa kliničkog aspekta uticati na nivo plazmatskog (ili lokalnog) osteopontina, a time i na razvoj bolesti (tj. na lečenje osteoporoze, mišićne distrofije, astme, kancerskih metastaza, nekih formi stresa i drugih bolesti).

Uloga OPN u tumorigenezi i metastaziranju kancera je danas predmet intenzivnog proučavanja. Ćelijska migracija i degradacija ekstracelularnog matriksa su ključni koraci u progresiji tumora. Aktivnost matriks-degradacionih proteaza, među kojima su

matriks-metaloproteaze, je regulisana faktorima rasta, citokinima i proteinima ekstracelularnog matriksa. OPN koji omogućava kalcifikaciju proteina ekstracelularnog matriksa ima značajnu ulogu u određivanju aktivnosti proteaza. OPN je takođe supstrat transglutaminazama, faktoru XIIIa i matriks-metaloproteazama MMP-3 i MMP-7 što je takođe povezano sa remodeliranjem ekstracelularnog matriksa. Smatra se da OPN svoj pro-metastatski efekat vrši interakcijom sa različitim integrinima i CD44 receptorima regulišući ćelijsku signalizaciju i događaje koji vode ka progresiji tumora. Do interakcije OPN sa ovim receptorima dolazi posle cepanja molekule trombinom i fosforilacije nastalih epitopa (deo molekule za koji se vezuje receptor). Oslobođeni epitopi su: sekvenca SVVYGLR koji prepoznaje  $\beta 1$  receptorska mesta ( $\alpha 9\beta 1, \alpha 4\beta 1$ ) i GRGDS sekvenca na N-terminalnom kraju koja se vezuje za  $\alpha V\beta 1, \alpha V\beta 3$  i  $\alpha V\beta 5$  integrine zavisno od posttranslacione fosforilacije i aktivacionog stanja integrin receptora [151]. Efekat interakcije OPN sa ovim integrinskim receptorima kojih ima u epitelnim ćelijama, glatkim mišićnim ćelijama i ćelijama skeletnih mišića, je adhezija ćelija i sekrecija IL-12 u fiziološkim uslovima, dok u tumorskim ćelijama ova veza omogućava aktivnost matriks degradacionih proteaza. Molekul OPN može biti podeljen na mnogo mesta, a jedno od njih je i C terminalni fragment koji se vezuje za receptore CD44 (polimorfni hijaluronski receptori) [152]. Ova interakcija je takođe uključena u regulaciji ćelijskih funkcija, hemotaksu, invazija imunih ćelija, sprečavanje apoptoza [153]. Raniji izveštaji su pokazali da veza OPN – CD44 omogućava formiranje žarišta tumorigeneze u H-RAS –V12 transformisanim ćelijama preko Rac signala. Povećan nivo ekspresije CD44 su povezani sa hroničnom inflamacijom i razvitkom arterijskih bolesti [155]. Vezivanje OPN sa CD44 indukuje preko fosfoinozitol 3-kinaze (PI3K)/Akt zavisnog puta NFkB aktivaciju i sintezu urokinaze plasminogen activator (uPA) koji se sekretuje u ćelijama kancera i dovodi do degradacije ekstracelularnog matriksa i širenja tumora (Sl.3.)



Slika 3. Uloga osteopontina u progresiji tumora. Ovaj model pokazuje potencijalnu ulogu OPN u transformaciji normalnih ćelija u maligne ćelije raka. OPN je visoko eksprimiran u širokom spektru maligniteta i njegovo vezivanje za integrinske i CD44 receptore indukuje brojne ćelijske signale. Fosforilacija i aktivacija različitih kinaza (fosfoinozitol 3-kinaza, NIK, PLC, PKC, MAPK) indukuje DNK vezivanje i aktivaciju transkripcijskih faktora kao što su NFκB i AP-1. Tako OPN doprinosi širenju maligniteta kroz inhibiciju apoptoze i aktivaciju različitih matriks proteaza (urokinaze plazminogen aktivatora uPA i matriks metaloproteaze (MMPs) i vodi ka pokretljivosti tumorskih ćelija, rstu tumora i metastazama. Slika je preuzeta iz ref br. 179.

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3.1. KOMERCIJALNI REAGENSI:**

U eksperimentalnom radu su korišćeni sledeći komercijalni test reagensi:

1. ALBUMIN, Cat No OSR 6202, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
2. ALP, Cat No OSR 6104, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
3. ALT, Cat No OSR 6107, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
4. AST, Cat No OSR 6009, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
5. BILIRUBIN, Cat No OSR6212, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
6. CREATININE, Cat No OSR 6187, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
7. GLUKOZA, Cat No OSR5687, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
8. UREA, Cat No OSR 4286, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
9. TOTAL PROTEIN, Cat No OSR6232, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
10. SYSTEM CALIBRATOR, Cat No 66300, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
11. Control Sera level 1, ODC0003, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
12. Control Sera level 2, ODC0004, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
13. CRP, OQIY, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany
14. CA125 II<sup>TM</sup>, 016-621 09/09, Architect system, Abbott
15. HE4, 305-486 10/09, Architect system, Abbott
16. CEA, 265-647 08/09, Architect system, Abbott
17. CA19.9, 011-263 05/09 Architect system, Abbott
18. Human Osteopontin Assay Kit-ELISA-IBL, Japan; Code No. 27158

### 3.2. PRIBOR I APARATI

U praktičnom radu je korišćen sledeći pribor:

1. *Vacutaine* sistem za uzorkovanje krvi (BD Vacutainer<sup>R</sup> System, Franklin Lakes, NJ, USA)
  - *Vacutainer* epruveta serumska CAT/gel-5 mL, Cat No 367955
  - *Vacutainer* epruveta za krvnu sliku - 2 mL, Cat No 368841
  - *Vacutainer* epruveta za sedimentaciju -5 mL, Cat No 366666
2. Seditainer stalak- za određivanje vrednosti brzine sedimentacije eritrocita
3. Plastične i staklene epruvete sa odgovarajućim stalkom
4. Plastične čašice za Olympus AU2700 analizator, Sample Cupe, OE66853, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
5. Plastične čašice za Architect ci8200 analizator, Sample Cups, 8A7601 (Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany)
6. Plastične Ependorf čašice i "pool" epruvete
7. Automatske pipete firme "Oxford" sa odgovarajućim nastavcima
8. Signalni sat

U praktičnom radu su korišćeni sledeći aparati:

1. Olympus AU 400 analizator, Beckman Coulter (ranije Olympus Diagnostica GmbH), Hamburg, Germany
2. ARCHITECT<sup>R</sup> ci8200 analizator, Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany
3. BN II nefelometar, Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH (ranije Dade Behring), Marburg, Germany
4. Cell-dyn 3700 Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany
5. Digifuga GL centrifuga, Heraeus, Germany Wiesbaden, Germany
6. Mikser „Vortex Genie 2 TM”, Lighting, Switzerland
7. Zamrzivač na -70 °C, SANYO Electric Co, Osaka, Japan

### 3.3. MATERIJAL

Ovom kliničkom, prospektivnom studijom istraživanje je obuhvatilo 157 ispitanica starosti od 16 do 84 godine. Uzorci su sakupljeni u periodu od septembra 2006. do novembra 2011. godine. Biohemijske analize su rađene u laboratorijama Klinike za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Srbije (KCS), Službe za polikliničku laboratorijsku dijagnostiku KCS i Centra za zbrinjavanje urgentnih stanja KCS.

Ispitivanje je odobreno odlukom Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije u Beogradu, dana 28.12.2007. godine pod brojem 600/7.

Osobe koje su uključene u ovu studiju podeljene su u tri grupe: grupa K- kontrolna grupa, sastavljena od 50 zdravih osoba, koje su dobrovoljno učestvovala u ovom istraživanju, grupa BT- 50 pacijentkinja sa benignim cistama jajnika i grupa MT-57 pacijentkinja kod kojih je dokazano prisustvo malignih tumora jajnika, koje su takođe dale pismenu saglasnost o učestvovanju u studiji.

Bolesnice su imale radnu dijagnozu pelvičnih (adneksalnih) masa ili ovarijalnih tumora i hospitalizovane su radi daljeg lečenja i hirurške intervencije. Kriterijumi za uključivanje bolesnica u studiju obuhvatali su: novootkriveni tumor jajnika (ne recidiv), odsustvo druge maligne bolesti u poslednjih pet godina i mogućnost uzimanja uzoraka krvi pre hirurške intervencije. Pacijentkinje koje su u svojoj istoriji imale podatke o ranije dijagnostikovanom ovarijalnim karcinomima, drugim primarnim peritonealnim kancerima ili su bile na hemioterapiji isključene su iz studije. Demografske i kliničke karakteristike pacijentkinja prikazane su u Tabelama 1,2,3 i 4. Pri hospitalizaciji pored ginekološkog pregleda uzeta je anamneza porodična i lična, izračunat je indeks telesne težine (*body mass index*, BMI) kao količnik težine (kg) i kvadrata visine (m<sup>2</sup>). Neke bolesnice su prijavile postojanje simptoma bolesti: bolovi u maloj karlici, gubitak apetita, malaksalost, učestalo mokrenje, nelagodnost i osećaj napetosti u maloj karlici. Histopatološki nalaz uzoraka obolelih tkiva uzetih u toku operacije je pokazao da je 50 pacijentkinja imalo benigne tumore jajnika, dok je 50 pacijentkinja imalo dijagnozu epitelnog ovarijalnog kancera i bilo je 7 bolesnica sa dijagnozom graničnih epitelnih tumora jajnika *border line* tumori.

Uzorci krvi su uzimani preoperativno, venepunkcijom, između 7 i 10 časova ujutru, prema uobičajnom protokolu (natašte), u tri epruvete: jednu sa K2EDTA rastvorom iz koje je dobijana plazma, drugu biohemijsku epruvetu bez aditiva i treću za sedimentaciju sa citratom. Nakon venepunkcije plazma je odvajana centrifugiranjem (2000g na 4° C 20 minuta) i bistar supernatant (plazma) razdeljen u



odgovarajuće porcije i zamrznut na  $-80^{\circ}$  C za dalja ispitivanja. U izdvojenim uzorcima plazme su određivane koncentracije OPN, enzim imunoesej tehnikom (ELISA). U serumu dobijenom posle koagulacije krvi, centrifugiranjem (3000 obrtaja u minuti 15 minuta) na sobnoj temperaturi određivani su CA-125, HE4, CEA i CA-19,9 metodom hemiluminescentnog imunoodređivanja sa magnetnim mikropartikulama (*chemiluminescent enzyme immunoassay* CMIA testom) na biohemijском analizatoru ARCHITECT<sup>®</sup>ci8200. Ostale biohemijske analize su urađene spektrofotometrijskim metodama na analizatoru Olympus AU2700.

### 3.4. METODE

#### 3.4.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE OPN ELISA test

Nivo osteopontina u plazmi je određen enzim imunoesej tehnikom (ELISA) korišćenjem komercijalnog testa Immuno-Biological Laboratorie (IBL), Japan, čiji je koeficijent varijacije unutar serije 0,7% do 2,0%. Mikro titraciona ploča ovog testa je obložena zečjim anti – osteopontin antitelima IgG (100  $\mu$ L od 20  $\mu$ g/mL u 0,1 M karbonatnom puferu, pH 9,5). Dodavanje 1% goveđeg serum albumina omogućava nespecifično blokiranje. U bunariće titracione ploče dodaje se po 100  $\mu$ L uzoraka i standarda (standardni rastvori se dobijaju razblaživanjem koncentrovanog standarda sa 1% goveđim serum albuminom i 0,05% Tween 20 fosfatnim puferom). Posle razlivanja standarda i uzoraka ploča se inkubira 1 sat na 37 C. Nakon sedam ispiranja sa 0,05% Tween 20 fosfatnim puferom dobijaju se sekundarna antitela (mišja monoklonalna IgG antitela) obeležena peroksidazom, koja se vezuju za kompleks anti-osteopontin antitela-osteopontin iz ispitivanog uzorka. Ovako pripremljeni uzorci se inkubiraju 30min na 4 C. Posle devet ispiranja, dodaje se 100  $\mu$ L TMB pufera –hromogena, pri čemu nastaje reakcija vidljiva po plavoj boji. Ovaj proces razvijanja boje traje 30 min na sobnoj temperaturi i na mestu koje je zaštićeno od izvor svetlosti. Reakcija se zaustavlja sa 100  $\mu$ L *stop-solution* (0,1M sumporne kiseline). Absorbancija se meri na 450nm na automatskom ELISA čitaču. Na osnovu dobijenih absorbanci standardnih rastvora dobijena je standardna kriva koja služi za određivanje koncentracije osteopontina u ispitivanim uzorcima.

### 3.4.2. ODREĐIVANJE INDEKSA RIZIKA ZA DOBIJANJE OVARIJALNOG KANCERA ROMA INDEKS

Algoritam koji se dobija kombinacijom pre operativnih vrednosti koncentracija CA125 i HE4 predstavlja logistički regresioni model tj. ROMA indeks. Na osnovu ovog indeksa određuje se verovatnoća da ispitanica dobije ovarijalni karcinom, i svrstavaju se u jednu od tri grupe: nizak, srednji i visok rizik. Predikcioni rizik se na različit način računa za žene u pre i post menopauzi

Premenopauzalne ispitanice

$$PI = -12.0 + 2.38 * \ln(HE4) + 0.0626 * \ln(CA\ 125)$$

Postmenopauzalne ispitanice

$$PI = -8.09 + 1.04 * \ln(HE4) + 0.732 * \ln(CA\ 125)$$

$$PP = \exp(PI) / [1 + \exp(PI)]$$

### 3.5. ANALIZA PODATAKA

Prikupljeni podaci su sistematizovani i obrađeni uz primenu statističkog programa SPSS for Windows 11.5 (Chicago, IL, USA). U analizi su razmatrani relevantni parametri i obeležja definisani ciljevima istraživanja i pretpostavljenim hipotezama.

Primenjene su sledeće metode statističke obrade:

- prikupljanje i statističko sređivanje podataka,
- tabelarno-grafičko predstavljanje rezultata,
- Kolmogorov-Smirnov test normalnosti raspodele,
- analiza signifikantnosti razlika primenom parametarskih i neparametarskih

testova:

$\chi^2$  (Che Square) test, Student t-test, Mann-Whitney U-test,  
Kruskal Wallis – test.

- Tukey *post hoc test*;
- ANOVA procedura u analizi varijanse;

- Pearsonova korelaciona analiza i Spearmanova analiza korelacije ranga;
- ROC (*Receiver Operating Characteristic*) analiza;
- Kaplan Maier-ova metoda/kriva preživljavanja
- Cox-ova univarijantna logistička regresiona analiza preživljavanja
- Logistička regresiona analiza
- Multivarijantna regresiona analiza - Faktor analiza

U radu su izračunavani sledeći parametri:

- srednja vrednost ( $\bar{x}$ ), standardna devijacija (Sd), koeficijent varijacije (Kv)
- medijana (Me)
- interval pouzdanosti (*Confidence Interval*, CI)
- sistematska (a) i procentualna (b) greška
- rezidualna standardna devijacija ( $S_{y/x}$ )
- koeficijent determinacije ( $R^2$ )
- regresioni koeficijent (B)
- odnos šansi (*odds ratio* OR)
- faktor rizika (*hazard ratio* HR)
- Pearsonov koeficijent korelacije (r)
- Spearmanov koeficijent korelacije (rho)
- determinanta korelacione matrice
- Bartlettov test sferičnosti
- Keiser-Meyer-Olkinova mera adekvatnosti uzorka (KMO)
- karakteristični koren (*eigenvalue*)
- koeficijent korelacije faktora i promenljive (*factor loading*)
- površina ispod ROC krive (AUC), standardna greška (SE), zscore performanse dijagnostičkog testa (senzitivnost, specifičnost, pozitivna i negativna prediktivna vrednost).

Testiranje značajnosti izvršeno je na nivou verovatnoće  $p < 0.05$ , što predstavlja statističku zavisnost.

## **2. CILJ RADA**

Ciljevi ovog istraživanja su:

- 1) Određivanje koncentracije glikoproteina OPN-a u plazmi tri grupe ispitanica: bolesnica sa dijagnozom malignih tumora jajnika, bolesnica sa dijagnozom benignih tumora jajnika i u plazmi zdravih žena.
- 2) Ispitati da li postoji statistički značajna razlika u koncentraciji plazmatskog glikoproteina OPN-a između tri ispitivane grupe.
- 3) Da se kod bolesnica sa malignim epitelnim tumorima ispita povezanost između koncentracije OPN-a i različitih histopatoloških tipova tumora jajnika, stadijuma razvoja tumorske bolesti (FIGO stadijum), histološkog gradusa (G) i nuklearnog gradusa bolesti (NG).
- 4) Odrediti specifičnost, osetljivost, pozitivnu i negativnu prediktivnu vrednost OPN-a u dijagnostici tumora jajnika i time ispitati njegov dijagnostički značaj.
- 5) Odrediti u uzorcima krvi istih ispitanica koncentracije još četiri tumor markera: Ca125, HE4, Ca19,9, CEA, i indeks ROMA i ispitati njihovu korelaciju sa osteopontinom.
- 6) Odrediti prognostički značaj plazmatskog glikoproteina OPN-a praćenjem ispitivanih bolesnica u periodu od 60 meseci i definisati ga u odnosu na preživljavanje i smrtni ishod bolesti.
- 7) Utvrditi faktorskom analizom koji od ispitivanih podataka: anamnestički, laboratorijski i ultrazvučni podaci, koji se koriste u rutinskoj praksi, mogu da ukažu na prirodu adneksalnih tumora i pomognu u predikciji karcinoma jajnika.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Karakteristike ispitivanih grupa

#### 4.1.1. Socio-demografske karakteristike u ukupnom uzorku

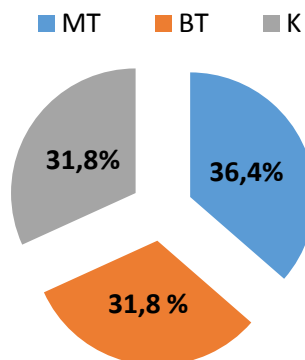
U ovom radu ispitano je 157 žena, koje su podeljene u tri grupe: prvu grupu (MT) su činile bolesnice sa dijagnozom malignih epitelnih tumora jajnika: epitelni karcinomi jajnika (EOC) i granični epitelni tumori (border line tumori-BLT) i u njoj je bilo 57 (36,4%) bolesnica, drugu grupu je činilo 50 (31,8%) bolesnica koje su imale dijagnozu benignih tumora jajnika, a treću kontrolnu grupu (K) činilo je 50 (31,8%) zdravih ispitanica od ukupnog uzorka (Grafikon 1).

U ispitivanom uzorku nije dokazana statistički značajna razlika u distribuciji bolesnica između ispitivanih grupa: kontrolne grupe (K), grupe sa benignim tumorima (BT) i grupe sa malignim tumorima (MT) (Tabela 1). Neznatno je više bolesnica sa malignim tumorima,  $\chi^2=0,624$ ,  $p=0,732$ , ali ne statistički značajno.

**Tabela 1. Karakteristike ukupnog uzorka (N=157)**

Grupe	Broj	%	$\chi^2$ , p
MT	57	36,4%	0,624
BT	50	31,8%	2
K	50	31,8%	0,732/ns

MT-grupa ispitanica sa malignim tumorima jajnika, BT-grupa ispitanica sa benignim tumorima jajnika, K-grupa zdravih ispitanica



**Grafikon 1. Raspodela ispitanica po grupama**

Ne postoji statistički značajna razlika između ispitivanih grupa i prosečne starosti bolesnica. Bolesnice sa malignim tumorima su starije od bolesnica sa benignim tumorima i zdravih ispitanica ( $F=2,167$ ,  $p=0,118$ ). Prosečna starost u ukupnom uzorku žena iznosila je  $52,9\pm 16,5$  godina, najmladja žena imala je 16,7 godina, a najstarija 86,3 godina.

**Tabela 2. Karakteristike ispitivanih grupa učesnica prema starosnoj dobi**

prosečna starost	MT	BT	K	ANOVA
	N=57	N=50	N=50	
	56,4±11,8	51,5±17,8	50,2±19,2	F=2,167 p=0,118
95% CI starosti	53.31-59.56	46.44-56.53	44,81-55,70	
<b>Prosečna starost (N=157)</b>				
52,9±16,5 (50,33-55,52)				

MT-grupa ispitanica sa malignim tumorima jajnika, BT-grupa ispitanica sa benignim tumorima jajnika, K-grupa zdravih ispitanica

Takodje nije dokazana statistički značajna razlika u distribuciji bolesnica u odnosu na menopauzu,  $p=0,190$  (Tabela 3).

**Tabela 3. Distribucija ispitivanih učesnica u odnosu na menopauzu**

Menopauza	MT		BT		K		$\chi^2$ , p
	N=57		N=50		N=50		
	38	66,7%	29	58,0%	24	48,0%	0,190/ns

MT-grupa ispitanica sa malignim tumorima jajnika, BT-grupa ispitanica sa benignim tumorima jajnika, K-grupa zdravih ispitanica

Dokazana je statistički značajna razlika u distribuciji bolesnica u odnosu na njihovu radnu aktivnost među ispitivanim grupama, statistički značajno najveća zastupljenost radno-aktivnih žena je u grupi zdravih žena, dok je u grupi žena sa karcinomima jajnika najveće učešće nezaposlenih i penzionera,  $\chi^2=26,725$ ,  $df=4$ ,  $p<0,0001$  (Tabela 4).

**Tabela 4. Distribucija ispitivanih učesnica u odnosu na radnu aktivnost**

	MT	BT	K	$\chi^2$ , p
	N=57	N=50	N=50	
<b>Zaposlenost</b>				
Nezaposlene	12 (21,05%)	6 (12,00%)	6(12,00%)	p<0,0001
Radno-aktivne	22 (38,60%)	26(52,00%)	42(84,00%)	
Penzioneri	23 (40,35%)	18(36,00%)	2(4,00%)	

MT-grupa ispitanica sa malignim tumorima jajnika, BT-grupa ispitanica sa benignim tumorima jajnika, K-grupa zdravih ispitanica

#### 4.1.2. Kliničke karakteristike i anamnestički podaci ispitanica

Bolesnice kojima je kliničkim i ultrazvučnim pregledom potvrđena dijagnoza tumora jajnika hospitalizovane su na Klinici za ginekologiju i akušerstvo KCS radi daljeg ispitivanja i lečenja. Podaci dobijeni prilikom uzimanja anamneze su bili sledeći: generalije (ime, prezime, starost ispitanica, mesto stanovanja, bračni status), glavne tegobe i simptomi bolesti, porodična i lična anamneza, anamneza menstruacija (godina menarhe, menopauza), anamneza pariteta (broj i vrsta porođaja, broj i vrsta pobačaja), takođe, pacijentkinjama je izračunat i indeks telesne mase (*body mass index*-BMI).

Porođalo se ukupno 111 (70,7%) žena, a nije se ukupno porođalo 46 (29,3%) žena, najčešće u grupi sa malignim tumorima, bez statistički značajnije razlike u odnosu na grupu ispitanica sa benignim tumorima i u odnosu na zdrave žene ( $\chi^2=55,8$ ,  $p=0,063$ ). U ispitivanom uzorku između grupa i broja porođaja postoji statistički značajna razlika, tako da je median od 2 porođaja veći u grupi sa malignim tumorima od broja porođaja u kontrolnoj i grupi sa benignim tumorom (Kruskal Wallis-test=6,243,  $p=0,044$ ). Statistički više pobačaja imale su ispitanice sa malignim tumorima jajnika (K-W=14,386,  $p=0,001$ ).

Ne postoji statistički značajna razlika između grupa u prosečnoj starosnoj dobi ulaska žena u menopauzu, na usvojenom nivou pouzdanosti ( $F=3,049$ ,  $p=0,053>0,05$ ).

Međutim, pojedinačnim upoređenjem grupa dokazuje se da postoji signifikantna razlika u starosti kada je nastupila menopauza između grupe ispitanica sa malignim tumorom i kontrolne grupe zdravih žena ( $t\text{-test}=2,980$ ,  $p=0.004$ ). U menopauzu su ušle značajno ranije žene sa malignim tumorom u odnosu na zdrave žene, ali u odnosu na žene sa benignim tumorom ne postoji značajna razlika u starosnoj dobi.

Dokazana je statistički značajna razlika između grupa ispitanica i godina u kojima su imale menarhu. Bolesnice sa dijagnozom malignih tumora su menarhu dobile u prosečno najvećoj starosti ( $13,7\pm 1,76$ ), statistički značajno u odnosu na ostale ispitanice ( $F=4,082$ ,  $p=0,019$ ) (Tabela 5).

Statistički značajna razlika je dokazana između grupa ispitanica i vrednosti BMI. Bolesnice sa benignim tumorima su imale niži BMI. Najviši BMI karakterističan je za gojazne žene (BMI iznad 25), koji imaju bolesnice sa malignim tumorima jajnika ( $F=5,700$ ,  $p=0,006$ ). Većina žena sa benignim adneksalnim tumorima kao i zdrave ispitanice imaju normalnu telesnu težinu (BMI:18-24,99) (Tabela 5). Sa druge strane bilo je na kraju bolesti prekomerne telesne težine zbog ascita i težine ispod normalne, kod sve tri ispitivane grupe, ali ipak nije bilo kahektičnih žena.

Tabela 5. Anamnestičke karakteristike ispitivanih grupa

<i>parametar</i>	MT	BT	K	ANOVA, K-W†† t-test † p
<b>Anamnestički podaci i BMI</b>				
	<b>Broj(%)</b>	<b>Broj(%)</b>	<b>Broj(%)</b>	<b><math>\chi^2</math>, p</b>
Porodjaji	46(80,7%)	35(70%)	30(60%)	p=0,063
	<b>Median (Min-Max)</b>	<b>Median (Min-Max)</b>	<b>Median (Min-Max)</b>	<b>p</b>
Broj porodjaja	2 (0 – 6)	1 (0 – 4)	1 (0 – 4)	†† p=0,044
Broj pobacaja	1 (0 – 1)	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	†† p=0,001**
	<b>Prosek±sd</b>	<b>Prosek±sd</b>	<b>Prosek±sd</b>	
BMI	28,1±6,05	23,3±3,00	23,8±3,16	p=0,006**
Menarha (god.)	13,7±1,76	12,9±1,66	13,0±1,19	p=0,019
Menopauza (god.)	47,2±4,47	49,1±6,71	50,6±3,42	p=0,053 p=0,004† (MT:K)

p<0,05\*, p<0,01- p<0,001

MT-grupa ispitanica sa malignim tumorima jajnika, BT-grupa ispitanica sa benignim tumorima jajnika,

K-grupa zdravih ispitanica



Kod bolesnica koje su hospitalizovane mogle su se iz uzetih anamneza analizirati i sledeće varijable: postojanje simptoma bolesti, porodična anamneza i menopauzalni status. Kod menopauzalnog statusa medju grupama nije dokazana statistički značajnija razlika ( $\chi^2=0,855, df=1, p=0,355$ ), ali su maligni tumori najfrekventniji u menopauzi (66,7%, Tabela 6).

Signifikantna je razlika izmedju grupa pacijentkinja kada se izjašnjavaju o postojanju simptoma bolesti ( $\chi^2=31,128, df=2, p<0,0001$ ). U grupi pacijentkinja sa malignim tumorima statistički značajno više su bile zastupljene one bolesnice koje su prijavile postojanje simptoma bolesti (bol u maloj karlici, krvarenje, često mokrenje).

Kada se analizira prisustvo ginekoloških bolesti u bližoj porodici (porodična anamneza) dokazana je značajna razlika u grupama ispitivanih bolesnica: pozitivna porodična anamneza statistički značajno učestalija kod bolesnica sa malignim tumorima u odnosu na bolesnice sa benignim tumorima ( $\chi^2=3,199, p<0,05$ ). Odnos šanse da ispitanice u grupi sa malignim tumorima imaju pozitivnu anamnezu je 5,7 puta veća nego u grupi sa benignim tumorima ( $OR=5,71\pm 2,95, 95\% CI(0,68-47,77)$ ).

**Tabela 6. Distribucija bolesnica u odnosu na menopauzu, simptome i porodičnu anamnezu**

parametar			MT	BT	$\chi^2, p$
			N=57	N=36	
Menopause	Pre	Broj	19	21	$\chi^2=0,855$ df=1, p=0,355
		%	33,33%	42,00%	
	Post	Broj	38	29	
		%	66,67%	58,00%	
Simptomi	Bez	Broj	3	20	$\chi^2=31,128,$ df=1, p<0,0001
		%	5,26%	57,10%	
	Sa	Broj	54	15	
		%	94,74%	42,90%	
Porodična anamneza	Negativna	Broj	49	35	$\chi^2=3,199,$ df=1, p<0,05
		%	85,96%	97,20%	
	Pozitivna	Broj	8	1	
		%	14,04%	2,80%	

p<0,05 \*, p<0,01- p<0,001 \*\*, p<0,0001\*\*\*

MT-grupa ispitanica sa malignim tumorima jajnika, BT-grupa ispitanica sa benignim tumorima jajnika

Ultrazvučnim pregledom trbuha i male karlice dobijeni su podaci o veličini tumora, položaju, obliku, tipu i o prisustvu ascita (Tabela 7). Analiza veličine tumorske mase pokazala je da su kod bolesnica sa malignim tumorima jajnika češći tumori veličine preko 10 cm, a u grupi bolesnica sa benignim tumorima jajnika najčešći su tumori do 5 cm veličine dijametra tumora, bez statistički značajne razlike u zastupljenosti ( $\chi^2=2,057$ ,  $df=2$ ,  $p=0,357$ ) (Tabla 7).

Kod malignih tumora češći su multilokularni tumori ( $\chi^2=40,065$ ,  $df=1$ ,  $p<0,0001$ ), dok su u grupi benignih tumora statistički značajno češći unilokularni tumori (Tabela 7).

U grupi malignih tumora češći su bilateralni tumori u odnosu na pojavu istih u grupi benignih i *border line* tumora ( $\chi^2=0,317$ ,  $df=1$ ,  $p=0,573$ ), dok su u grupi benignih češći unilateralni tumori, bez statistički značajnije razlike (Tabela 7). Kod malignih tumora češće je dokazano prisustvo ascita u odnosu na grupu benignih ( $\chi^2=15,69$ ,  $df=1$ ,  $p<0,0001$ ), statistički značajno. Kod malignih tumora češći su kombinovani tumori (i solidni i cistični) u odnosu na pojavu istih u grupi benignih ( $\chi^2=5,506$ ,  $df=2$ ,  $p=0,126$ ), dok su u grupi benignih češći cistični, bez statistički značajnije razlike (Tabela 7).

Tabela 7. Karakteristike dobijene ultrazvučnim pregledom u ispitivanim grupama

parametar		MT		BT		$\chi^2$ , sign p
		N=57		N=36		
Dijametar	<5 cm	Broj	11	10	$\chi^2=2,057$ , df=2 p=0,357	
		%	19.30%	27,80%		
	5-10 cm	Broj	24	17		
		%	42.11%	47,20%		
	>10cm	Broj	22	9		
		%	38.60%	25,00%		
Lokularnost	Multilokularni	Broj	51	9	$\chi^2=40,065$ , df=1, p<0,0001	
		%	89.47%	25,00%		
	Unilokularni	Broj	6	27		
		%	10.53%	75,00%		
		Broj	33.33%	27,80%		
		%				
Ascit	Prisutan ascit	Broj	35	7	$\chi^2=15,69$ df=1, p<0,0001	
		%	61.40%	19,40%		
	Nema ascita	Broj	22	29		
		%	38.60%	80,60%		
Solidni	Solidni	Broj	8	5	$\chi^2=5,506$ , df=2 p=0,064	
		%	14.04%	13,90%		
	Cistični	Broj	38	30		
		%	66.67%	83,30%		
	Kombinovano	Broj	11	1		
		%	19.30%	2,80%		
Lateralnost	Unilateralni	Broj	38	26	$\chi^2=0,317$ , df=1, p=0,573	
		%	66.67%	72,20%		
	Bilateralni	Broj	19	10		
		%	33.33%	27,80%		

p<0,05 \*, p<0,01- p<0,001 \*\*, p<0,0001\*

MT-grupa ispitanica sa malignim tumorima jajnika, BT-grupa ispitanica sa benignim tumorima jajnika

### 4.1.3 Patohistološke karakteristike ispitivanih bolesnica-histološki tipovi tumora

Histološke karakteristike tumora kod ispitivanih bolesnica prikazane su u Tabeli 8. (bolesnice sa benignim bolestima jajnika) i u Tabelama 9 i 10 (bolesnice sa malignim bolestima jajnika).

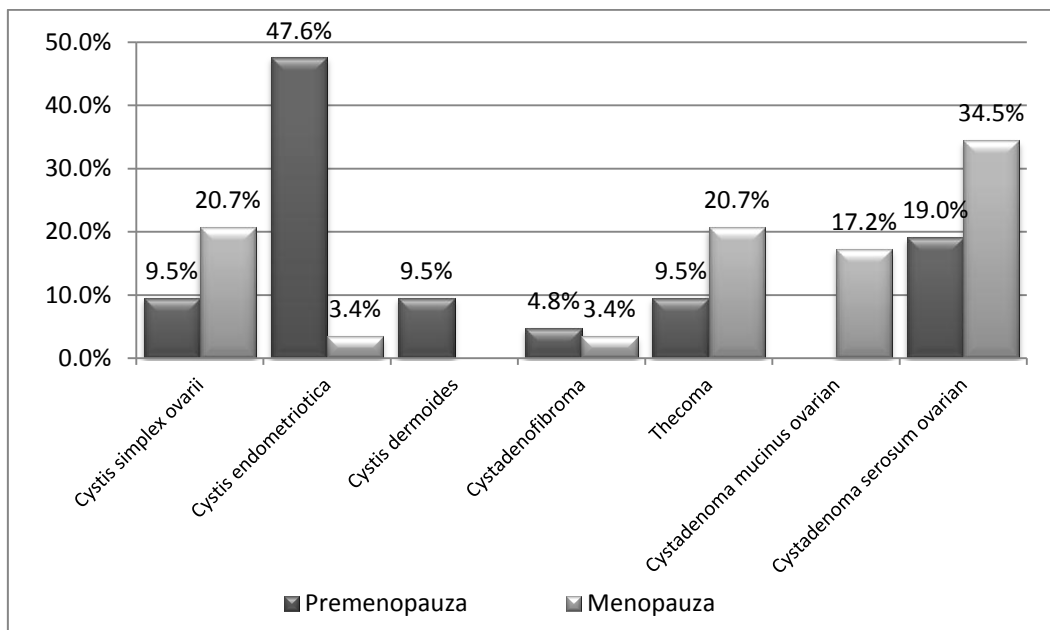
U grupi bolesnica sa benignim tumorima najzastupljenija histološka dijagnoza je serozni benigni tumor jajnika (*cystadenom serosum ovarii*) kod 14 (28%) bolesnica, zatim endometriotične ciste jajnika (*cystis endometriotica ovarii*) kod 11 (22%) žena, tekom (*thecoma ovarii*) i proste ciste (*cystis simplex*) su zastupljene u istom procentu 8 (16%). Benigne dermoidne ciste (*cystis dermoides*) i adenofibromi (*cystis adenofibroma ovarii*) zastupljene su takodje u istom procentu sa po 2 (4%) slučaja. Mucinozni adenom je prisutan u pet bolesnica 17,2%.

U Tabeli 8 i Grafikonu 2 prikazana je distribucija žena u grupi sa benignim bolestima u odnosu na histološki tip tumora i menopauzu. Prikazana je i prosečna starost u odnosu na menopauzu,  $p < 0,001$ .

U grupi bolesnica sa benignim tumorima koje nisu u menopauzi značajno više je zastupljena histopatološka dijagnoza endometrioze, u odnosu na druge tumore,  $p < 0,0001$ , dok je među ženama u menopauzi više seroznih tumora,  $p < 0,0001$ .

**Tabela 8. Distribucija bolesnica sa benignim tumorima prema histopatološkoj dijagnozi, prosečnoj starosti i menopauzi**

	Bolesnice sa benignim tumorima				Ukupno N=50
	Premenopauza		Menopauza		
	Broj	%	Broj	%	
<b>Broj</b>	<b>21 (42%)</b>		<b>29 (58%)</b>		<b>50 (100%)</b>
<b>Starost</b>	35,50±7,11		63,07±13,61		51,49±17,76
<b>Histologija</b>					
<i>Cystis simplex ovarii</i>	2	9,5%	6	20,7%	8
<i>Cystis endometriotica</i>	10	47,6%	1	3,4%	11
<i>Cystis dermoides ovarii</i>	2	9,5%			2
<i>Cystis adenofibroma ovarii</i>	1	4,8%	1	3,4%	2
<i>Thecoma ovarii</i>	2	9,5%	6	20,7%	8
<i>Cystadenoma mucinosum</i>			5	17,2%	5
<i>Cystadenoma serosum</i>	4	19,0%	10	34,5%	14



**Grafikon 2. Histološka dijagnoza u odnosu na menopauzu u grupi bolesnica sa benignim tumorima**

U grupi bolesnica sa malignim bolestima bilo je pacijentkinja sa graničnim tumorima epitelnog porekla *border line* tumorima i pacijentkinja sa epitelnim ovarijalnim karcinomima.

Sa dijagnozom *border line* tumorima bilo je 7 bolesnica, od toga *atypically proliferating mucinosus tumor-border line* imalo je 5 (71,4%) bolesnica, dok je *atypically proliferating serozum tumor-border line* dijagnostikovano kod 2 (28,6%) žene (Tabela 9).

U podgrupi bolesnica sa histopatološkom dijagnozom *border-line* tumora bilo je u premenopauzi 4 (57,1%) žena a u menopauzi 3 (42,9%) žena. (Tabela 9, Grafikon 3).

Prosečna starost u grupi bolesnica sa dijagnozom *border line* tumora koje nisu u menopauzi iznosila je  $36,88 \pm 13,21$  godina, dok je kod bolesnica sa istom histološkom dijagnozom u menopauzi iznosila je  $55,67 \pm 8,54$  godina, te su žene u menopauzi bile statistički značajno starije,  $p < 0,001$  (Tabela 9).

**Tabela 9. Distribucija bolesnica sa graničnim epitelnim tumorima-*border line* prema histopatološkoj dijagnozi, prosečnoj starosti i menopauzi**

	<i>border line</i>		N=7
	Pre menopauza	Menopauza	
<b>Ukupan broj</b>	<b>4 (57,1%)</b>	<b>3 (42,9%)</b>	<b>7 (12%)</b>
<b>Starost</b>	<b>36,88±13,21</b>	<b>55,67±8,54</b>	<b>44,93±14,57</b>
<b>Histologija</b>			
<i>Atypically proliferating-border line mucinosum tumor ovarii</i>	3 (75%)	2 (66,7%)	<b>5 (71,4%)</b>
<i>Atypically proliferating-border line serozum tumor ovarii</i>	1 (25%)	1 (33,3%)	<b>2 (28,6%)</b>

U grupi žena sa epitelnim ovarijalnim karcinomima bilo je 50 ispitanica, od toga najzastupljenija histološka dijagnoza je serozni tumor (*adenocarcinoma papilare serosum ovarii* i *adenocarcinoma serosum ovarii*) i to kod 23 (46%) bolesnice. Histološku dijagnozu *adenocarcinoma endometrioides ovarii* imalo je 11 (22%) pacijentkinja, dok je mucinozni tumor (*adenocarcinoma mucinosum ovarii*) dijagnostikovao kod 7 (14%) bolesnica. Adenocarcinom svetlih ćelija (*clear cell*) i kombinovani adenocarcinom (*adenocarcinoma mixtum ovarii*) su zastupljeni u istom procentu u grupi bolesnica sa malignim tumorima i to sa po 4 (8%) slučaja. Zabeležen je i jedan slučaj (2%) sa histopatološkom dijagnozom nediferentovanog tumora jajnika. Postoji statistički značajna razlika u distribuciji bolesnica u odnosu na histologiju tumora u ukupnom uzorku, značajno najviše je bolesnica sa seroznim tumorima u ukupnom uzorku,  $p < 0,0001$ .

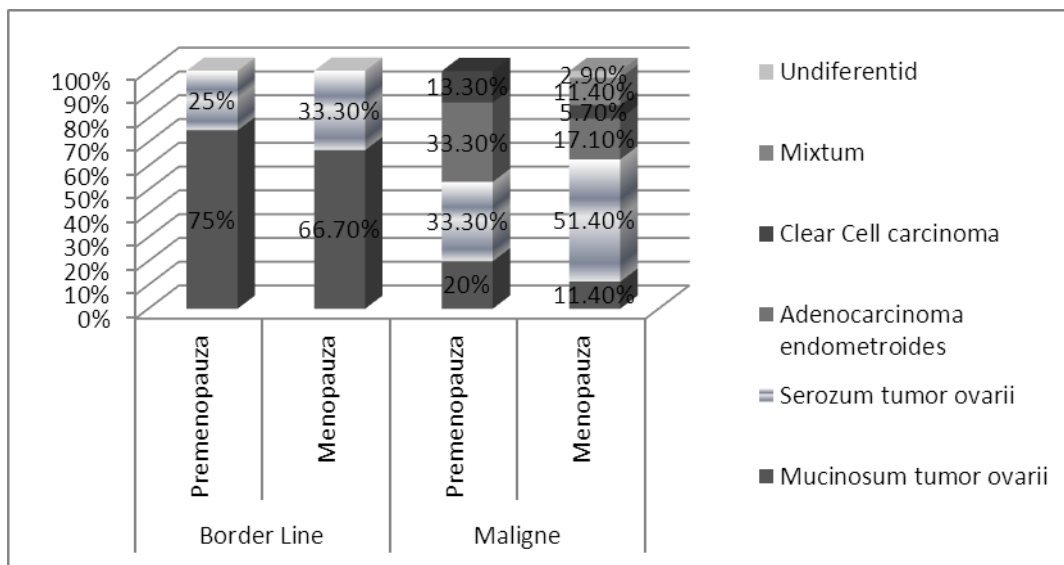
U Tabeli 10 i Grafikonu 3 prikazana je distribucija bolesnica sa dijagnozom malignih tumora u odnosu na histologiju tumora i menopauzu. U premenopauzi je bilo 15 (30%) žena, a u menopauzi 35 (70%) žena. U grupi žena kod kojih su dijagnostikovani karcinomi jajnika najzastupljenija histološka dijagnoza kod žena u premenopauzi su serozni i endometrioidni epitelni tumori jajnika i to u po 5 (33,3%) slučaja, mucinozni tumor je dijagnostikovao u 3 (20%) slučaja, dok je karcinom svetlih ćelija (*clear cell*) bio dijagnostikovao u 2 (13,3%) slučaja. U ovoj istoj grupi žena sa karcinomima jajnika koje su u menopauzi, najzastupljenija histološka dijagnoza je serozni epitelni tumor

jajnika i to kod 18 (51,4%) bolesnica, endometrioidni epitelni tumor kod 6 (17,1%) bolesnica, mucinozni tumor je dijagnostikovao kod 4 (11,4%) bolesnice, dok je „*clear cell*“ epitelni tumor zabeležen u 2 (5,7%) slučaja. Zabeležen je i jedan slučaj nediferentovanog epitelnog tumora jajnika (2,9%). Statistički značajno je različita distribucija bolesnica u odnosu na histologiju tumora, značajno najviše je bolesnica sa seroznim epitelnim karcinomima jajnika u grupi malignih pacijentkinja koje su u menopauzi,  $p < 0,001$  dok je značajno najmanje bolesnica sa „*clear cell*“ karcinomima u grupi malignih bolesnica u menopauzi,  $p < 0,01$ . U grupi bolesnica koje su u premenopauzi najzastupljeniji tip je serozni i endometrioidni karcinom jajnika,  $p < 0,01$ .

Prikazana je i prosečna starost u odnosu na menopauzu na Tabeli 10. Prosečna starost u grupi bolesnica sa EOC koje nisu u menopauzi iznosila je  $48,39 \pm 7,23$  godina, a kod bolesnica u post menopauzi prosečna starost iznosila je  $62,18 \pm 8,97$  godina, te su žene u menopauzi bile statistički značajno starije,  $p < 0,001$ .

**Tabela 10. Distribucija bolesnica sa malignim tumorima-EOC prema histopatološkom tipu bolesti, prosečnoj starosti i menopauzi**

	EOC		N=50
	Pre Menopauza	Meno Pauza	
<b>Ukupan broj</b>	<b>15 (30,0%)</b>	<b>35 (70%)</b>	<b>50 (100%)</b>
<b>Starost</b>	<b>48,39±7,23</b>	<b>62,18±8,97</b>	<b>58,044±10,56</b>
<i>Adenocarcinoma mucinosum ovarii</i>	3 (20%)	4 (11,4%)	<b>7 (14%)</b>
<i>Adenocarcinoma serosum ovarii</i>	5 (33,3%)	18 (51,4%)	<b>23 (46%)</b>
<i>Adenocarcinoma endometroides ovarii</i>	5 (33,3%)	6 (17,1%)	<b>11 (22%)</b>
„clear cell” carcinoma ovarii	2 (13,3%)	2 (5,7%)	<b>4 (8%)</b>
<i>Adenocarcinoma mixtus malignus ovarii</i>		4 (11,4%)	<b>4 (8%)</b>
„undifferentiated”		1 (2,9%)	<b>1 (2%)</b>



**Grafikon 3. Histološka dijagnoza i menopauza u grupi žena sa karcinomima jajnika (EOC i BLT)**



#### **4. 1. 4. Karakteristike bolesnica prema stadijumu tumorske bolesti (FIGO), histološkom gradusu bolesti (G) i nuklearnom gradusu bolesti (NG)**

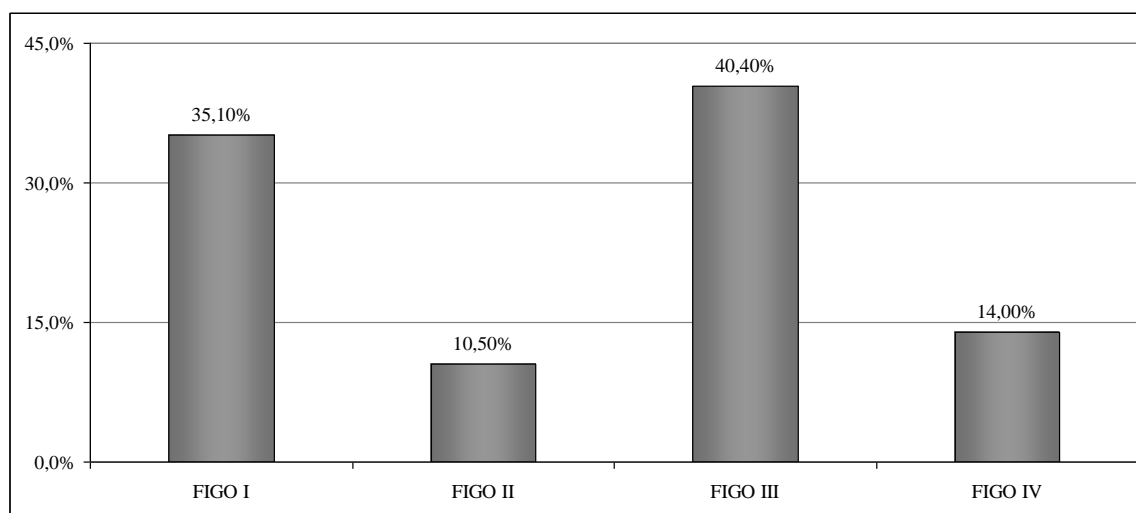
Distribucija bolesnica sa dijagnozom malignih tumora jajnika prema stadijumu tumorske bolesti (FIGO), histološkom gradusu (G) i nuklearnom gradusu (NG) prikazana je u Tabeli 11.

Bolesnice koje su imale dijagnozu granični karcinom jajnika epitelnog porekla (*border line*) u histopatološkoj dijagnozi se ne gradiraju prema nuklearnom i histološkom gradusu, a sve su pripadale FIGO I stadijumu tumorske bolesti. Pored njih i četiri bolesnica iz grupe bolesnica sa malignim tumorima nisu imala podatke o nuklearnom i histološkom gradusu karcinoma.

Statistički značajno je različita distribucija bolesnica u odnosu na stadijum bolesti. Značajno više je bolesnica sa FIGO III stadijumom bolesti,  $\chi^2=13,84$ ,  $p<0,003$ , u ispitivanom uzorku. (Tabela 11 i Grafikon 4).

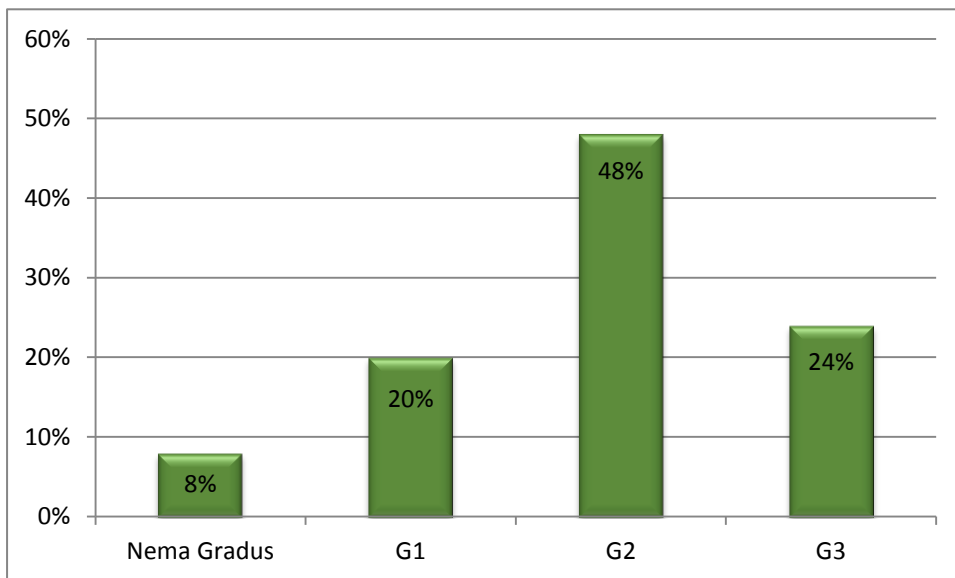
**Tabela 11. Distribucija bolesnica sa malignim tumorima jajnika prema FIGO stadijumu tumorske bolesti, histološkom gradusu i nuklearnom gradusu**

<i>parametar</i>		MT N=57	
		Broj	%
<b>FIGO stadijum bolesti</b>	<b>FIGO I</b>	20	35.10%
	<b>FIGO II</b>	6	10.50%
	<b>FIGO III</b>	23	<b>40.40%</b>
	<b>FIGO IV</b>	8	14.00%
<b>Ukupno</b>		57	<b>100,0%</b>
$\chi^2, p$		$\chi^2=13,84$	<b>p&lt;0,003</b>
<b>Ukupno N=50</b>		Broj	%
<b>Histoloski gradus (G)</b>	<b>Nema Gradus</b>	4	8.00%
	<b>G1</b>	10	20.00%
	<b>G2</b>	24	<b>48.00%</b>
	<b>G3</b>	12	24.00%
<b>Ukupno</b>		50	<b>100,0%</b>
$\chi^2, p$		$\chi^2=16,88$	<b>p&lt;0,001</b>
<b>Ukupno N=50</b>		Broj	%
<b>Nuklearni Gradus (NG)</b>	<b>Nema NG</b>	4	8.00%
	<b>NG I</b>	10	20.00%
	<b>NG II</b>	31	<b>62.00%</b>
	<b>NG III</b>	5	10.00%
<b>Ukupno</b>		50	<b>100,0%</b>
$\chi^2, p$		$\chi^2=38,16$	<b>p&lt;0,0001</b>



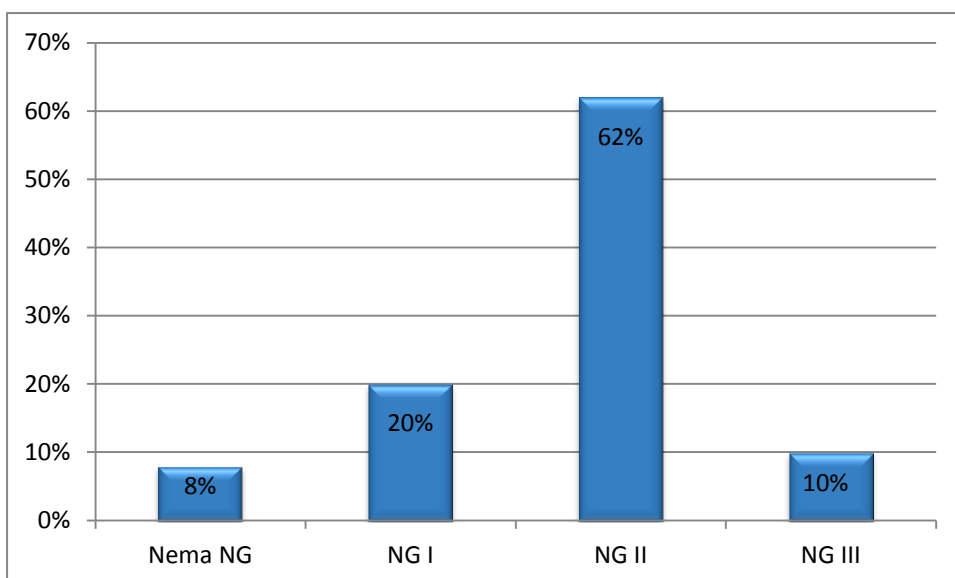
**Grafikon 4. Distribucija bolesnica prema FIGO stadijumu tumorske bolesti.**

Statistički značajno je različita distribucija bolesnica u odnosu na histološki gradus tumora. Značajno najviše je bolesnica sa histološkim gradusom II (G II),  $\chi^2=16,88$ ,  $p<0,001$ . Ovi rezultati su prikazani u Tabeli 11 i Grafikonu 5.



**Grafikon 5. Distribucija bolesnica prema histološkom gradusu**

Statistički značajno je različita distribucija bolesnica u odnosu na nuklearni gradus tumora. Značajno najviše je bolesnica sa NG II medju malignim tumorima,  $\chi^2=38,16$ ,  $p<0,0001$ . Rezultati su prikazani u Tabeli 11 i Grafikonu 6.



**Grafikon 6. Distribucija bolesnica prema nuklearnom gradusu**

U Tabeli 12, koja sledi, prikazana je distribucija bolesnica koje su imale maligne tumore jajnika u odnosu na histologiju tumora i stadijum tumorske bolesti. Prikazana je i distribucija u odnosu na menopauzu. U podgrupi žena koje nisu u menopauzi bilo je ukupno 19 slučajeva, od toga u FIGO I stadijumu bilo je najviše žena 11(57,9%), u FIGO II bilo je 3 (15,8%) bolesnice, a u FIGO III bilo 5 (26,3%) pacijentkinja. U FIGO IV stadijumu tumorske bolesti nije bilo ispitanica u premenopauzi.

U podgrupi žena koje nisu u menopauzi u FIGO I stadijumu tumorske bolesti najzastupljenija histološka dijagnoza je mucinozni adenokarcinom i to kod 6 (54,5%) bolesnica. U grupi sa FIGO II stadijumom tumorske bolesti podjednaka je zastupljenost seroznih adenokarcinoma, karcinoma svetlih ćelija i endometrioidnih adenokarcinoma (33,3%). U grupi žena sa FIGO III stadijumom tumorske bolesti najzastupljenija histološka dijagnoza je serozni adenokarcinom jajnika i to kod 3 (60%) bolesnice.

Nema dokazane statističke značajnosti u podgrupi žena koje nisu u menopauzi u odnosu na histološku dijagnozu,  $\chi^2=9,437$ ,  $p=0,149$ .

U podgrupi žena koje su u menopauzi bilo je ukupno 38 bolesnice (3 bolesnice sa dijagnozom graničnih tumora jajnika i 35 slučajeva EOC). Od toga sa FIGO I stadijumom bolesti bilo je 9 bolesnica (23,7%), sa FIGO II stadijumom bolesti bile su 3 (7,9%) bolesnice, sa FIGO III stadijumom bolesti bilo je 18 (47,4%), a sa FIGO IV stadijumom bolesti bilo je 8 (21,1%) bolesnica.

**Tabela 12. Distribucija bolesnica sa malignim tumorima prema histološkoj dijagnozi, FIGO stadijumu i menopauzi**

	FIGO I		FIGO II		FIGO III		FIGO IV		Total	%
	Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%		
<b>Pre menopauza</b>										
<i>Adenocarcinoma mucinosum</i>	6	54,5%	0	0,0%	0	0,0%			6	31,6%
<i>Adenocarcinoma serosum</i>	2	18,2%	1	33,3%	3	60,0%			6	31,6%
<i>Adenocarcinoma endometrioides</i>	3	27,3%	1	33,3%	1	20,0%			5	26,3%
<i>Clear cell</i>	0	0,0%	1	33,3%	1	20,0%			2	10,5%
<b>Pre menopauza</b>	<b>11</b>	<b>57,9%</b>	<b>3</b>	<b>15,8%</b>	<b>5</b>	<b>26,3%</b>			<b>19</b>	<b>33,3%</b>
<b>Menopauza</b>										
<i>Adenocarcinoma mucinosum</i>	5	55,6%	0	0,0%	1	5,6%	0	0,0%	6	75,0%
<i>Adenocarcinoma serosum</i>	3	33,3%	1	33,3%	11	61,1%	4	50,0%	19	237,5%
<i>Adenocarcinoma endometrioides</i>	0	0,0%	1	33,3%	2	11,1%	3	37,5%	6	75,0%
<i>Clear cell</i>	1	11,1%	0	0,0%	0	0,0%	1	12,5%	2	25,0%
<i>Adenocarcinoma mixtus</i>	0	0,0%	1	33,3%	3	16,7%	0	0,0%	4	50,0%
<i>Undifferentiated</i>	0	0,0%	0	0,0%	1	5,6%	0	0,0%	1	12,5%
<b>Menopauza</b>	<b>9</b>	<b>23,7%</b>	<b>3</b>	<b>7,9%</b>	<b>18</b>	<b>47,4%</b>	<b>8</b>	<b>21,1%</b>	<b>38</b>	<b>66,7%</b>

#### 4.1.5 Period praćenja ispitanica u ovom istraživanju

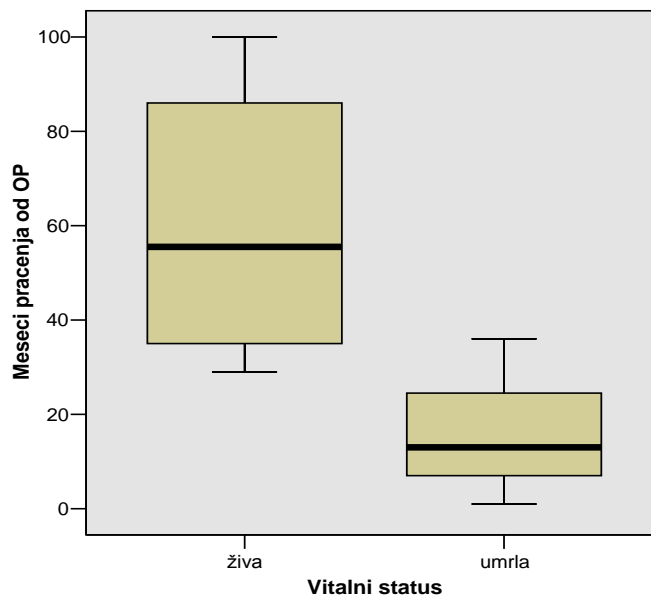
Praćenje bolesnica koje su obuhvaćene ovim istraživanjem u cilju dobijanja informacija o periodu preživljavanja i prognostičkom značaju osteopontina bilo je dostupno za 47 bolesnica sa dijagnozom benignih tumora jajnika i za 57 bolesnica iz grupe sa karcinomima jajnika.

Sve bolesnica sa benignim tumorom jajnika koje su uključene u ovo istraživanje bile su žive (47b olesnica) na kraju istraživanja, dok je u grupi pacijentkinja sa malignim tumorima na kraju istraživanja 30 (52,6%) živih, a 27 (47,4%) je umrlo, Tabela 13.

Prosečno vreme praćenja za grupu bolesnica sa benignih tumorima iznosilo je  $58,22 \pm 22,19$  meseci, sa medijanom od 50 meseci, a kretalo se od 33 meseca do 91 meseca, a sve žene obuhvaćene istraživanjem su na kraju istraživanja bile žive. Bolesnice sa malignim tumorima su praćene od jednog meseca do 100 meseci, u zavisnosti od datuma operacije, a prosečno vreme praćenja iznosilo je  $38,61 \pm 30,13$  meseci, sa medijanom od 30 meseci. Od toga prosečno vreme praćenja žena koje su na kraju istraživanja imale pozitivan vitalni status bilo je  $59,90 \pm 25,91$  meseci sa medijanom od 55 meseci, dok je prosečno vreme praćenja žena koje su imale smrtni ishod bilo je  $14,96 \pm 10,15$  meseci sa medijanom od 13 meseci. Smrtni ishod je statistički značajno smanjio praćenje u grupi malignih tumora, za  $p < 0,0001$ . Rezultati su prikazani u Tabeli 13 i Grafikonu 7.

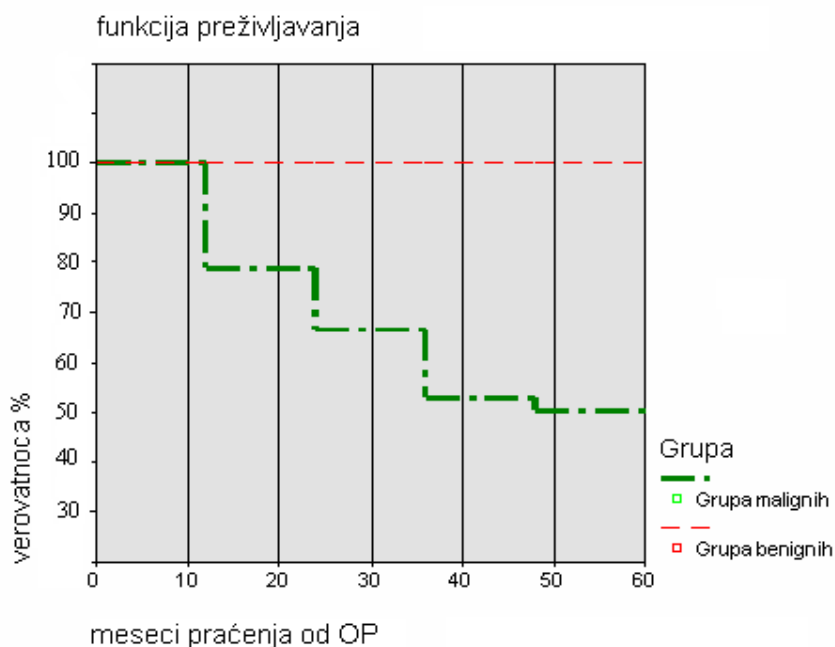
**Tabela 13. Prosečno vreme praćenja pacijentkinja**

	Grupa	N (%)	Prosek (meseci)	SD	Median
MT	Preživljavanje	30(52,6%)	$59,90 \pm 25,91$		55
	Smrtni ishod	27(47,4%)	$14,96 \pm 10,15$		13
	Ukupno	57	$38,61 \pm 30,13$		30
BT	Preživljavanje	47(100%)	$58,22 \pm 22,19$		50
	Smrtni ishod		Nema		



**Grafikon 7. Prosečno vreme praćenja bolesnica sa karcinomima jajnika**

U grupi bolesnica sa benignim bolestima jajnika nema smrtnog ishoda, tako da je verovatnoća praćenja do 60 meseci 100%. U grupi bolesnica sa karcinomima jajnika verovatnoća praćenja u prvih mesec dana je iznosi 98,2% ( $0,982 \pm 0,017$ ), do 6 meseci praćenja verovatnoća preživljavanja pada na 87,7% ( $0,877 \pm 0,043$ ), do 12 meseci verovatnoća preživljavanja pada na 77,2% ( $0,772 \pm 0,056$ ), nakon 2 godine praćenja verovatnoća preživljavanja pada na 64,9% ( $0,649 \pm 0,063$ ), nakon 3 i više godina praćenja verovatnoća preživljavanja iznosi svega 51,8% ( $0,518 \pm 0,068$ ). Kada se analizira preživljavanje u grupi malignih i grupi benignih bolesnica dokazana je statistički značajna razlika u verovatnoći preživljavanja, Log Rank test=31,778, df=1,  $p < 0,0001$ , ta verovatnoća je značajno niža u grupi bolesnica sa malignim tumorima (Grafikon 8).



**Grafikon 8. Verovatnoća preživljavanja bolesnica sa tumorima jajnika nakon operacije**

#### 4.1.6. Ishod u grupi bolesnica sa malignim tumorima

U grupi bolesnica sa malignim tumorima prosečno vreme praćenja bolesnica koje su bile u stadijumu FIGO I iznosilo je  $57,50 \pm 26,27$  meseci, sa medijanom od 47 meseci; u FIGO II bilo je  $45,00 \pm 27,10$  meseci sa medijanom od 36 meseci; dok je prosečno praćenje žena u FIGO III stadijumu bilo  $29,35 \pm 27,75$  meseci sa medijanom od 23 meseci; a prosečno

praćenje žena sa FIGO IV bilo je  $13,25 \pm 19,32$  meseci sa medijanom od 7 meseci. Ovi rezultati su prikazani u Tabeli 14 i Grafikonu 9.

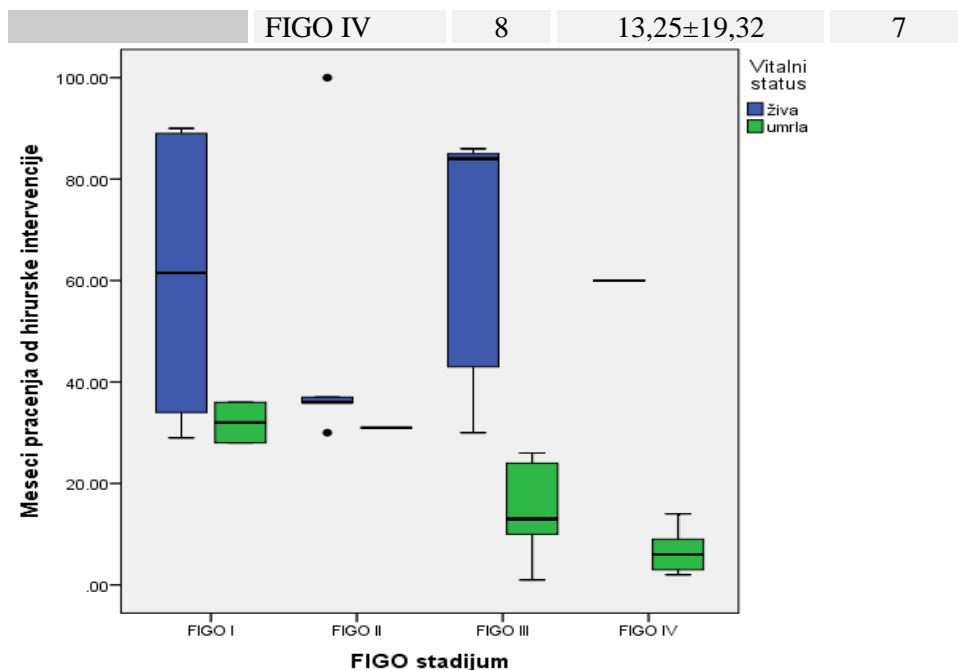
U grupi bolesnica koje su imale dijagnozu karcinoma jajnika i koje su na kraju studije bile žive (30 žena) prosečno vreme praćenja iznosilo je  $59,90 \pm 25,91$  meseci. U FIGO I stadijumu tumorske bolesti prosečno vreme praćenja iznosilo je  $60,33 \pm 26,16$  meseci, sa medijanom od 62 meseca; u FIGO II stadijumu tumorske bolesti bilo je  $47,80 \pm 29,31$  meseci sa medijanom od 36 meseci, dok je prosečno praćenje žena sa FIGO III stadijumom bolesti bilo  $68,67 \pm 25,26$  meseci sa medijanom 84 meseci, dok je praćenje jedne žene koja se bila u FIGO IV stadijumu tumorske bolesti bilo 60 meseci. Rezultati su prikazani u Tabeli 14 i Grafikonu 9.

U grupi bolesnica sa smrtnim ishodom koje su imale histopatološki potvrđenu dijagnozu malignog tumora jajnika (27 ispitanica) prosečno vreme praćenja iznosi  $14,96 \pm 10,15$  meseci. U FIGO I stadijumu tumorske bolesti iznosilo je  $32,00 \pm 5,66$  meseci, sa medijanom od 32 meseca, u FIGO II stadijumu tumorske bolesti prosečno vreme praćenja bolesnica iznosilo je 31 mesec, bolesnice koje su bile u FIGO III stadijumu tumorske bolesti praćene su u proseku  $15,47 \pm 8,65$  meseci sa medijanom od 13 meseci, dok je prosečno praćenje žena sa FIGO IV stadijumom bolesti bilo  $6,57 \pm 4,39$  meseci sa medijanom od 6 meseci. Rezultati su prikazani u Tabeli 14 i Grafikonu 9.

**Tabela 14. Prosečno vreme preživljavanja bolesnica sa malignim tumorima prema FIGO stadijumu bolesti**

Vitalni status MT		N	prosek	SD	Median
Preživljavanje	FIGO I	18	$60,33 \pm 26,16$		62
	FIGO II	5	$47,80 \pm 29,31$		36
	FIGO III	6	$68,67 \pm 25,26$		84
	FIGO IV	1	60,00		
	Ukupno	30	$59,90 \pm 25,91$		55,5
Smrtni ishod	FIGO I	2	$32,00 \pm 5,66$		32
	FIGO II	1	31,00		
	FIGO III	17	$15,47 \pm 8,65$		13
	FIGO IV	7	$6,57 \pm 4,39$		6
	Ukupno	27	$14,96 \pm 10,15$		13
Ukupno	FIGO I	20	$57,50 \pm 26,27$		47
	FIGO II	6	$45,00 \pm 27,10$		36
	FIGO III	23	$29,35 \pm 27,75$		23





**Grafikon 9. Ishod bolesti kod četiri FIGO stadijuma karcinoma jajnika**

U grupi bolesnica sa malignim bolestima jajnika kod FIGO I stadijuma verovatnoća praćenja u prvih 28 meseci iznosi 95% ( $0,95 \pm 0,049$ ), nakon 3 godine praćenja verovatnoća preživljavanja pada na 87,7% ( $0,877 \pm 0,083$ ). Bolesnice u FIGO I stadijumu praćene su do 90 meseci, (Grafikon 10).

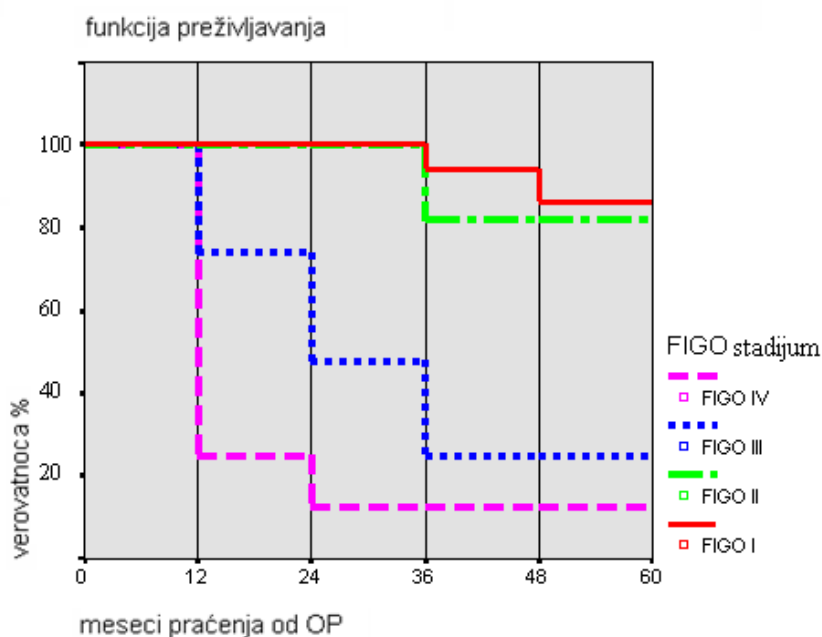
U grupi bolesnica sa karcinomima jajnika koje su bile u FIGO II stadijumu bolesti verovatnoća praćenja u prvih 24 meseca iznosi 100%, a nakon 31 meseca 80% ( $0,800 \pm 0,179$ ). Rezultati su prikazani u Grafikonu 10.

U grupi malignih bolesnica kod FIGO III stadijuma verovatnoća praćenja u prvih mesec dana iznosi 95,7% ( $0,957 \pm 0,043$ ), do 6 meseci praćenja verovatnoća preživljavanja pada na 87% ( $0,870 \pm 0,043$ ), do 12 meseci verovatnoća preživljavanja pada na 69,6% ( $0,696 \pm 0,096$ ). Nakon 2 godine praćenja verovatnoća preživljavanja pada na 43,5% ( $0,435 \pm 0,103$ ). Nakon 3 godine praćenja verovatnoća preživljavanja je bila 26,1% ( $0,261 \pm 0,092$ ). Pacijentkinje sa FIGO III stadijumom bolesti praćene su maksimum do 86 meseci i rezultati su prikazani u Grafikonu 10.

U grupi bolesnica sa malignim bolestima jajnika koje su bile u FIGO IV stadijumu tumorske bolesti verovatnoća praćenja u prvih 2 meseca iznosila je 87,5% ( $0,875 \pm 0,117$ ), nakon 6 meseci 50% ( $0,5 \pm 0,177$ ), a nakon 14 meseci praćenja verovatnoća preživljavanja

pada na 12,5% ( $0,125 \pm 0,117$ ). Pacijentkinje sa FIGO IV stadijumom bolesti praćene su maksimum do 60 meseci i rezultati su prikazani u Grafikonu 10.

Kada se analizira preživljavanje u grupi bolesnica sa malignim bolestima jajnika u odnosu na FIGO stadijum dokazana je statistički značajna razlika u verovatnoći preživljavanja, Log Rank test=36,614, df=1,  $p < 0,0001$ , ta verovatnoća je značajno najniža u grupi bolesnica sa FIGO IV stadijumom bolesti, a najviša u FIGO I stadijumu.



**Grafikon 10. Verovatnoća preživljavanja bolesnica sa malignim tumorima jajnika prema FIGO stadijumu tumorske bolesti**

#### 4.1.7. Rezultati laboratorijskih ispitivanja

U Tabeli 15. su prikazane laboratorijsko-hematološke i biohemijske karakteristike sve tri ispitivane grupe. Srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija, medijana biohemijskih parametara su testirane adekvatnim testom, u odnosu na homogenost (normalnost distribucije) posmatranih serija.

U uzorcima krvi ispitivanih žena određeni su hematološko-biohemijski parametri i nije dokazana statistički značajna razlika u prosečnim vrednostima eritrocita ( $p=ns$ ),

hemoglobina ( $p=ns$ ), leukocita ( $p=ns$ ), ali je postojala statistički značajna razlika u srednjoj vrednosti trombocita između ispitivanih grupa. Iako je u grupi bolesnica sa malignim cistama jajnika bila statistički značajno je najviša vrednost trombocita, (K-W test=12,627,  $df=2$ ,  $p<0,002$ ) ona se nije statistički razlikovala od referentnih vrednosti.

Takođe, nije dokazana statistički značajna razlika u vrednostima sledećih biohemijskih parametara između ispitivanih grupa: glukoze (K-W test=0,792,  $df=2$ ,  $p=0,673$ ), uree (K-W test=0,065,  $df=2$ ,  $p=0,968$ ), kreatinina ( $F=2,960$ ,  $p=0,055$ ), alanin aminotransferaze (ALT) (K-W test=0,501,  $df=2$ ,  $p=0,779$ ), aspartat aminotransferaze (AST) (K-W test=7,268,  $df=2$ ,  $p<0,026$ ), u vrednostima alkalne fosfataze (ALP) (K-W test=0,838,  $df=2$ ,  $p=0,658$ ). U prosečnim vrednostima ispitivanih grupa nije postojala statistički značajna razlika u koncentraciji ukupnih proteina ( $p=ns$ ), albumina ( $p=ns$ ), i za vrednost ukupnog bilirubina ( $p=ns$ ).

Analiza prosečnih vrednosti markera inflamacije: C-reaktivni protein (CRP) i sedimentacije eritrocita (Se) je pokazala statistički značajno više vrednosti u grupi bolesnica sa malignim bolestima jajnika CRP (K-W test=17,603,  $df=2$ ,  $p<0,0001$ ) i Se (K-W test=50,710,  $df=2$ ,  $p<0,0001$ ). Rezultati su prikazani u Tabeli 15.

**Tabela 15. Distribucija vrednosti laboratorijskih parametara kod pojedinih grupa ispitanica**

	MT	BT	K	ANOVA, K-W† p
	Prosek ± SD Median	Prosek ± SD Median	Prosek ± SD Median	
Eritrociti (br x10 <sup>12</sup> /L)	4,21±0,41 4,20	4,22±0,43 4,21	4,29±0,42 4,34	0,977/ns
Hgb (g/L)	120,33±12,51 123,00	126,94±25,71 124,0	128,10±11,17 127,50	0,054/ns
Leukociti ( br x 10 <sup>9</sup> /L)	8,03±2,55 7,65	7,37±2,25 7,21	7,21±1,90 7,19	0,174/ns
Trombociti (br x 10 <sup>9</sup> /L)	337,87±137,02 318,00	264,56±78,68 261,00	260,76±56,15 268,50	† 0,002**
Glukoza (mmoL/L)	5,63±2,34 5,00	5,13±0,81 5,10	5,36±0,93 5,15	† 0,673/ns
Urea (mmoL/L)	4,88±2,54 4,90	4,53±1,78 4,45	4,50±1,41 4,25	† 0,968/ns
Kreatinin (µmoL/L)	68,27±13,74 66,0	67,70±13,13 65,0	62,48±12,76 60,5	0,055/ns
ALT (U/L)	21,65±11,30 18	20,18±9,43 20,5	19,38±8,58 19	† 0,779/ns
AST (U/L)	24,06±12,25 24	19,50±9,78 18	19,86±6,20 20	† 0,126/ns
ALP (U/L)	78,07±99,63 58	63,50±16,19 59	66,12±21,01 59	† 0,658/ns
Ukupni protein (g/L)	64,68±6,98 64,5	66,50±8,08 67,5	68,02±7,47 69,5	0,80/ns
Albumin (g/L)	42,05±14,2 39,5	42,14±6,37 45	41,76±5,62 41,5	†0,889/ns
Bilirubin(µmoL/L)	11,44±3,74 10,25	11,15±4,34 10,21	9,91±4,04 9,4	0,128/ns
CRP (mg/L)	75,94±75,60 68,5	20,05±24,60 12,25	3,93±1,17 4,10	†0,000***
Sedimentacija (mm/h)	54,88±28,86 54,0	26,66±18,15 24,0	13,73±7,26 12	†0,000***

\*p<0,05, \*\* p<0,01- p<0,001, p<0,0001\*\*\* , † raspodela nije Gaussova

MT-grupa ispitanica sa malignim tumorima jajnika, BT-grupa ispitanica sa benignim tumorima jajnika,  
K-grupa zdravih ispitanica

Učesnicama u ispitivanju su određeni i tumor markeri koji se najčešće ispituju u dijagnostici ovarijalnih cisti: Ca125, HE4, Ca19,9, CEA, izračunat je prediktivni ROMA indeks i određen je glikoprotein OPN. Dobijene vrednosti su prikazane u Tabeli 16.

Prosečna vrednost tumor markera CA125 u grupi bolesnica sa benignim bolestima jajnika iznosila je  $42,81 \pm 49,13$  KU/L; dok je prosečna vrednost CA125 kod bolesnica sa karcinomima jajnika bila  $814,80 \pm 1094,19$  KU/L, kod kontrolne grupe zdravih vrednost je iznosila  $17,88 \pm 8,83$  KU/L. Prosečna vrednost tumor markera Ca19.9 u grupi pacijentkinja sa benignim tumorima iznosila je  $19,93 \pm 16,37$  KU/L, dok je prosečna vrednost Ca19.9 u grupi pacijentkinja sa malignim tumorima bila  $104,78 \pm 229,41$  KU/L; kod kontrolne grupe zdravih ispitanica vrednost je iznosila  $14,96 \pm 8,92$  KU/L. Prosečna vrednost CEA u grupi bolesnica sa benignim tumorima iznosila je  $2,68 \pm 2,58$   $\mu\text{g/L}$ , kod grupe sa malignim tumorima bila je  $7,38 \pm 15,54$   $\mu\text{g/L}$ , a kod kontrolne grupe zdravih žena prosečna vrednost je iznosila  $3,14 \pm 2,17$   $\mu\text{g/L}$  (Tabela 16).

Prosečna vrednost HE4 u grupi bolesnica sa benignim cistama iznosila je  $74,07 \pm 35,07$  pmol/L; kod pacijentkinja sa dijagnozom karcinoma ovarijuma bila  $995,01 \pm 1038,19$  pmol/L; kod kontrolne grupe zdravih ispitanica vrednost je iznosila  $53,03 \pm 26,28$  pmol/L.

Prosečne vrednosti ROMA indeksa su se statistički značajno razlikovale između ispitivanih grupa. Prosečne vrednosti u grupi pacijentkinja sa benignim tumorima jajnika su bile  $20,15 \pm 18,58\%$ ; kod bolesnica sa malignim tumorima jajnika su bile  $77,50 \pm 33,33\%$ ; a u grupi zdravih ispitanica srednja vrednost je bila  $10,68 \pm 8,90\%$ .

U medijanama koncentracija tumor markera CA 125, HE 4, OPN i ROMA indeksa dokazana je statistički značajna razlika među grupama, osim kod Ca19.9 i CEA gde među grupama u testiranju medijana nije dokazana značajnija razlika. Prikazani rezultati su u Tabeli 16.

**Tabela 16. Distribucija vrednosti odredivanih tumor markera i ROMA indeksa u pojedinim grupama ispitanica**

		Broj	Prosek±S.D.	Median	95% CI		Min.	Max.	Median test
					Donja	Gornja			p
OPN (µg/L)	K	50	145,84±163,06	70	99,5	192,18	10	760	55,388 2 0,0001
	BT	50	285,18±165,07	250	238,27	332,09	50	726	
	MT	57	1664,26±900,00	900	1145,7	2182,83	100	10050	
CA125 (KU/L)	K	50	17,88±8,83	14,65	15,37	20,39	0,9	40,2	52,920 2 0,0001
	BT	50	42,81±49,13	26,2	28,85	56,77	3,87	251	
	MT	57	814,80±1094,19	438,7	524,47	1105,13	1,03	4135	
Ca19.9 (KU/L)	K	28	14,96±8,92	14,85	11,5	18,42	0,6	35,2	0,355 2 0,837/ns
	BT	35	19,93±16,37	14,53	14,3	25,55	0,6	55,2	
	MT	49	104,78±229,41	24	38,88	170,67	0,6	1240	
CEA (µg/L)	K	27	3,14±2,17	2,89	2,28	4	0,18	7,13	3,989 2 0,136/ns
	BT	23	2,68±2,58	1,5	1,56	3,79	0,3	10,4	
	MT	39	7,38±15,54	1,87	2,35	12,42	0,68	94,9	
HE4 (pmol/L)	K	41	53,03±26,28	48,85	44,74	61,33	22,3	147,3	55,388 2 0,0001
	BT	19	74,07±35,07	62,5	57,17	90,98	26,1	147,3	
	MT	23	995,01±1038,19	908,6	546,06	1443,95	33,8	4084,9	
ROMA INDEX (%)	K	41	10,68±8,90	7,145	7,87	13,49	1,15	39	21,414 2 0,0001
	BT	19	20,15±18,58	12,38	11,2	29,1	1,62	74,54	
	MT	23	77,50±33,33	96,61	63,09	91,91	4,05	99,86	

\*p<0,05, \*\* p<0,01- p<0,001, p<0,0001\*\*\*

MT-grupa ispitanica sa malignim tumorima jajnika, BT-grupa ispitanica sa benignim tumorima jajnika, K-grupa zdravih ispitanica

U daljem radu, zbog ovakvog rezultata biće analizirani CA125, HE4 i ROMA Indeks i sa njima će biti upoređene karakteristike osteopontina, dok Ca19.9 i CEA neće biti predmet daljih analiza.

## 4.2. Karakteristike glikoproteina osteopontina

### 4.2.1. Koncentracije OPN-a u ispitivanim grupama

Svim učesnicama ovog ispitivanja određena je koncentracija glikoproteina osteopontina u uzorcima krvi koji su preoperativno uzeti bolesnicama i iz kojih je dobijena plazma. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 17 i Grafikonu 11.

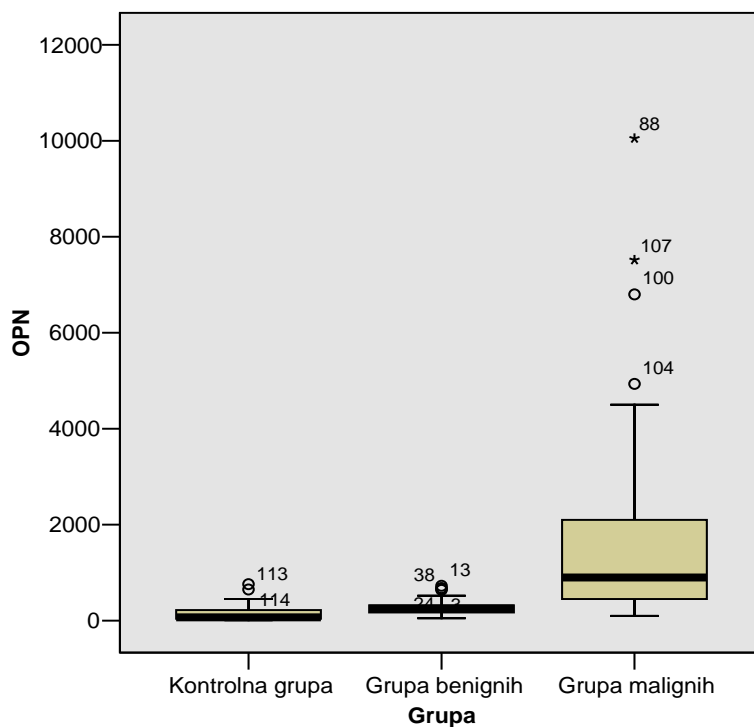
Primenom Kolmogorov-Smirnov testa je utvrđeno da vrednosti OPN ne pripadaju normalnoj raspodeli pa je primenjen Kruskal-Wallis-ov test koji je potvrdio da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji glikoproteina OPN u plazmi između sve tri ispitivane grupe. Statistički najviše vrednosti su u grupi sa malignim tumorima ( $p < 0,0001$ ).

**Tabela 17. Distribucija vrednosti osteopontina u ispitivanim grupama učesnika**

	<b>MT</b>	<b>BT</b>	<b>K</b>
<b>Prosek±SD</b>	1664,26±900,00	285,18±165,07	145,84±163,06
<b>Medijan</b>	900,00	250,00	70,00
<b>95% CI (donja-gornja)</b>	1145,70-2182,83	238,27-332,09	99,50-192,18
<b>Minimum-Maximum</b>	100,00-10050,00	50,00-726,00	10,00-760,00
<b>p</b>	<b>K-W=84,12, p&lt;0,0001</b>		
<b>Kruskal-Wallis Test</b>	<b>MT prema BT p&lt;0,0001</b>	<b>BT prema K p&lt;0,0001</b>	<b>MT prema K p&lt;0,0001</b>

\* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ -  $p < 0,001$ ,  $p < 0,0001$ \*\*\*

MT-grupa ispitanica sa malignim tumorima jajnika, BT-grupa ispitanica sa benignim tumorima jajnika,  
K-grupa zdravih ispitanica



**Grafikon 11. Koncentracija OPN-a u ispitivanim grupama**

Preoperativni nivo plazminskog proteina osteopontina kod pacijentkinja sa benignim i malignim ovarijalnim tumorima, kao i kod FIGO I stadijuma bolesti kod ispitanica u premenopauzi i u menopauzi prikazan je u Tabeli 18 i Grafikonu 12.

Medijana vrednosti osteopontina u grupi bolesnica sa FIGO I stadijumom je viši nego u grupi bolesnica sa benignim tumorima kod menopauzalnih žena (240  $\mu\text{g/L}$  prema 650  $\mu\text{g/L}$ ,  $p < 0,0001$ ), dok se u premenopauzi ne razlikuje značajno (300  $\mu\text{g/L}$  prema 320  $\mu\text{g/L}$ ,  $p = 0,284$ ). Najviše vrednosti OPN su kod žena u menopauzi koje imaju maligni tumor. Medijan OPN-a u ovoj grupi je signifikantno viši nego kod grupe žena sa benignim tumorom koje su u premenopauzi (965  $\mu\text{g/L}$  prema 567  $\mu\text{g/L}$ ,  $p = 0,027$ ).

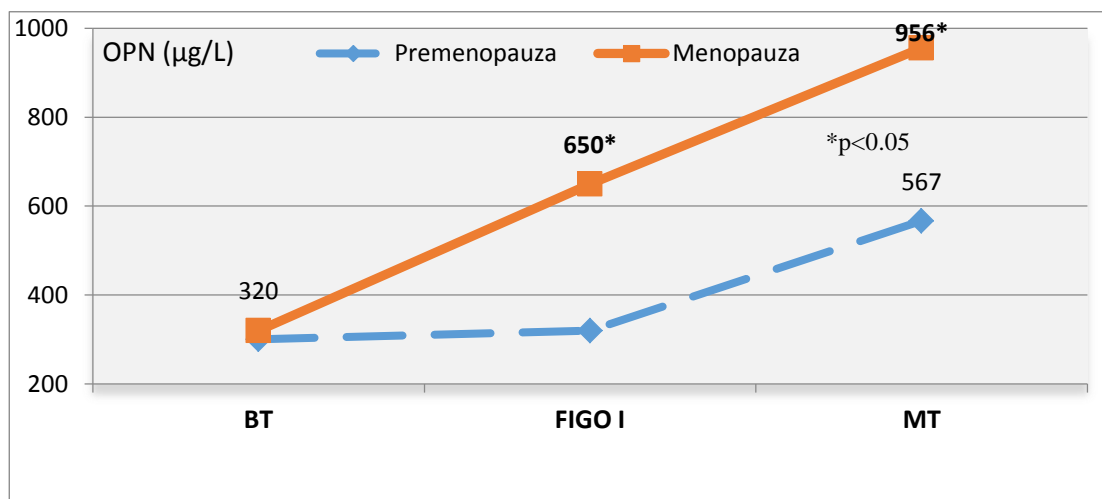
Može se zaključiti da je trend porasta proteina osteopontina kod bolesnica koje su u menopauzi značajno brži sa malignim pogoršanjem bolesti, nego kod žena u premenopauzi.



**Tabela 18. Median koncentracije osteopontina kod bolesnica sa benignim i malignim tumorima jajnika u odnosu na menopauzu**

OPN	BT	p (M-W)	FIGO I	p (M-W)	MT
	median N=21		median N=11		median N=19
Pre menopauza	<b>300</b> N=21	0,284 (88,5)	<b>320</b> N=11	0,132 (69,5)	<b>567</b> N=19
p (M-W)	0,355 (257,5)	p (M-W)	0,110 (28,5)	p (M-W)	<b>0,027*</b> (230,0)
Menopauza	<b>240</b> N=29	<b>&lt;0.0001**</b> (20,5)	<b>650</b> N=9	0,081 (106,5)	<b>956</b> N=38

MT-grupa ispitanica sa malignim tumorima jajnika, BT-grupa ispitanica sa benignim tumorima jajnika



**Grafikon 12. Median koncentracije osteopontina u odnosu na menopauzu i grupe**

#### 4.2.2. Koncentracije plazminskog OPN-a u ispitivanim patohistološkim tipovima tumora jajnika

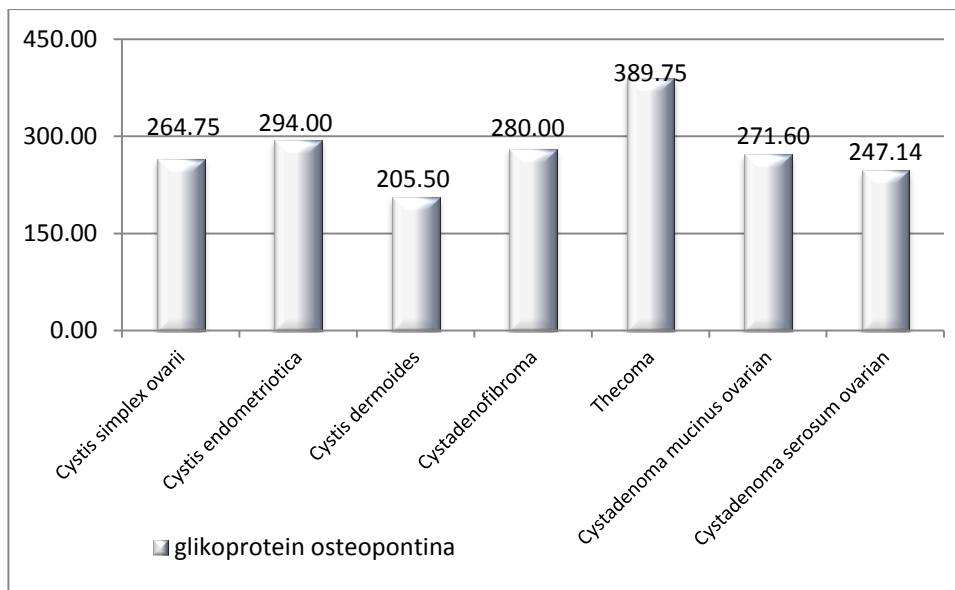
Preoperativni nivo proteina osteopontina u plazmi ispitan je i upoređen kod bolesnica sa benignim i malignim ovarijalnim tumorima, koje imaju različite histopatološke tipove bolesti (Tabela 19 i 20).

U grupi bolesnica sa benignim tumorima ovarijuma nema statistički značajne razlike u visini osteopontina prema histološkom tipu bolesti,  $p=0,621$ . (Tabela 19, Grafikon 13).

**Tabela 19. Distribucija vrednosti glikoproteina osteopontina u histopatološkim dijagnozama pacijentkinja sa benignim tumorima jajnika**

	Broj	Prosek±SD OPN	Median	95% CI (donja-gornja)	Min-Max
<b>BT</b>					
<i>Cystis simplex ovarii</i>	8	264,75±176,97	220,00	116,80-12,70	132,00-680,00
<i>Cystis endometriotica</i>	11	294,00±152,42	300,00	191,60-96,40	80,00-520,00
<i>Cystis dermoides ovarii</i>	2	205,50±149,20	205,50	135,00-54,00	100,00-311,00
<i>Cystis adenofibroma ovarii</i>	2	280,00±282,84	280,00	261,24-82,24	80,00-480,00
<i>Thecoma ovarii</i>	8	389,75±209,58	320,00	214,54-64,96	180,00-726,00
<i>Cystadenoma mucinosum</i>	5	271,60±93,84	250,00	155,08-88,12	150,00-402,00
<i>Cystadenoma serosum</i>	14	247,14±155,19	240,00	157,54-36,75	50,00-660,00
Kruskall-Wallis, p	$p=0,621/ ns$				

BT- grupa bolesnica sa benignim bolestima jajnika



**Grafikon 13. Koncentracije glikoproteina osteopontina u histopatološkim dijagnozama pacijentkinja sa benignim tumorima jajnika**

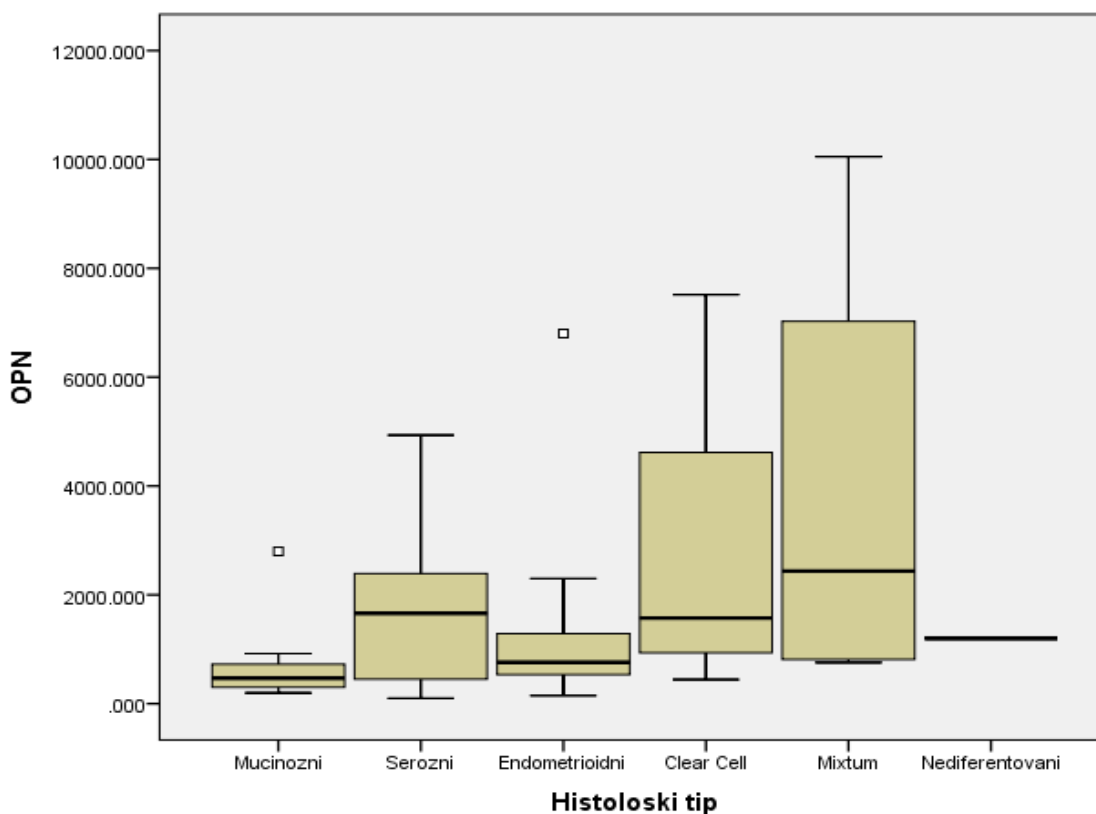
U grupi bolesnica sa malignim tumorima najviše vrednosti osteopontina su kod histološke dijagnoze kombinovanog karcinoma, dok je najniža vrednost osteopontina kod bolesnica sa mucinoznim tumorima, bez statistički značajne razlike u grupi,  $p=0,081$  (Tabela 20, Grafikon 14).

**Tabela 20. Koncentracija osteopontina u plazmi bolesnica sa različitim histopatološkim tipovima ovarijalnih malignih neoplazmi**

	Broj	Prosek±SD	Me	95% CI (donja-gornja)	Min- Max
<b>MT</b>					
<i>Adenocarcinoma mucinosum</i>	12	683,58±703,45	468,50	236,63-1130,54	200,0-2800,0
<i>Adenocarcinoma serosum</i>	25	1717,8±1411,73	1660,00	1135,06-2300,54	100,0 - 4935,0
<i>Adenocarcinoma endometrioides</i>	11	1430,18±1875,23	760,00	170,39-2689,98	150,0 - 6800,0
„Clear cell” carcinoma	4	2777,00±3206,29	1575,00	1324,92-7878,92	442,0 -7516,0
<i>Adenocarcinoma mixtum</i>	4	3918,75±4355,19	2435,00	3011-10848,8	755,0-10050,0
„Undifferentiated”	Jedan pacijent OPN=1200,00				
Kruskall-Wallis, p	p=0,081/ns				

MT-grupa bolesnica sa malignim bolestima jajnika

**Grafikon 14. Koncentracije glikoproteina osteopontina u histopatološkim tipovima ovarijalnih malignih neoplazmi**



### 4.2.3. Koncentracije plazminskog OPN u različitim stadijumima tumorske bolesti (FIGO)

Analizom izmerenih vrednosti glikoproteina osteopontina kod pacijentkinja sa dijagnozom malignih neoplazmi ovarijuma prema stadijumima tumorske bolesti dobijeni su rezultati koji su prikazani u Tabeli 21.

Kruskall-Wallis-ovim neparametarskim testom dokazana je statistički značajna razlika u nivoima OPN između FIGO stadijuma I i III, I i IV, kao i između FIGO II i III, i II i IV. Ali nije dokazana statistički značajna razlika testiranjem neparametrijskim Kruskall-Wallis-ovim testom između FIGO I i FIGO II,  $p=0,648$ , kao ni između FIGO III i FIGO IV,  $p=0,259$ .

**Tabela 21. Koncentracija plazminskog glikoproteina OPN u različitim FIGO stadijumima bolesti**

	Broj	Prosek±SD	Median	95% CI (donja-gornja)	Min- Max	
<b>Grupa bolesnica sa malignim tumorima</b>						
<b>FIGO I</b>	20	563,25±348,65	468,50	400,08-726,42	100,00-1432,00	
<b>FIGO II</b>	6	740,33±644,15	473,50	64,34-1416,33	320,00-2020,00	
<b>FIGO III</b>	23	2239,78±2069,02	1770,00	1345,07-3134,49	210,00-10050,00	
<b>FIGO IV</b>	8	3455,13±2743,64	3070,00	1161,38-5748,87	280,00-7516,00	
<b>Kruskal-Wallis Test</b>	Figio I : Figio II $p=0,648$	Figio III : Figio IV $p=0,259$	Figio I : Figio III 19,135 $p<0,0001$ ***	Figio I : Figio IV 21,701 $p<0,0001$ ***	Figio II : Figio III 6,135 $p<0,013$ *	Figio II : Figio IV 7,164 $p<0,028$ *
<b>Kruskal-Wallis Test</b>			Figio I/II : Figio III/IV <b>21,295</b> $p<0,0001$ ***			

\* $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ -  $p<0,001$ ,  $p<0,0001$ \*\*\*

#### 4.2.4. Korelacija između osteopontina i ispitivanih grupa

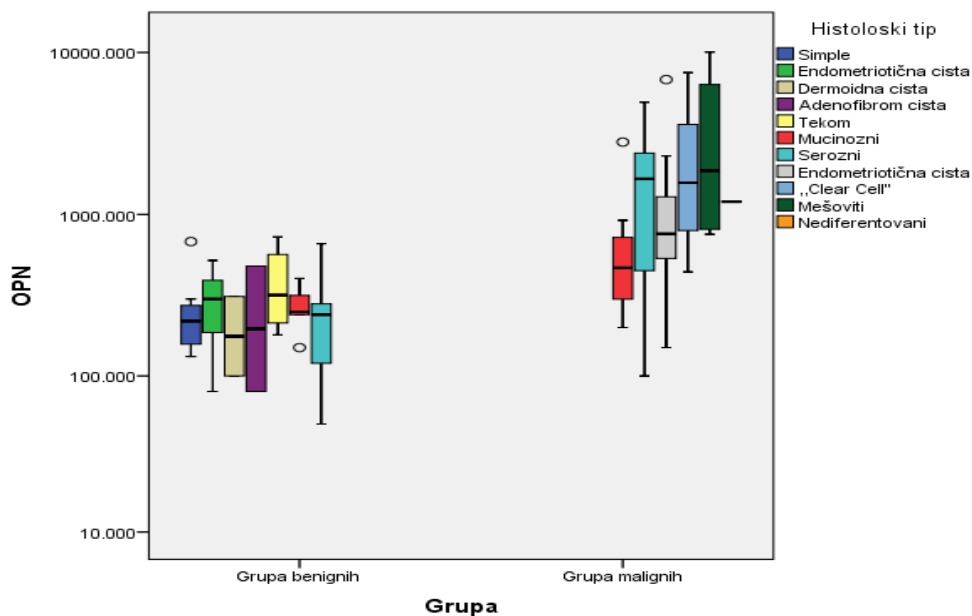
Analizom povezanosti vrednosti glikoproteina osteopontina među ispitivanim grupama učesnica dokazana je statistički značajna korelacija kod bolesnica sa malignim tumorima ( $R=0,735$ ), u odnosu na benigne tumore, i kontrolnu grupu. Više vrednosti osteopontina su značajno češće u korelaciji sa malignim tumorima, dok su niže vrednosti osteopontina značajno češće u korelaciji sa benignim tumorima i zdravim ispitanicama, ( $p<0,001$ , Tabela 22).

**Tabela 22. Spirmanova korelacija glikoproteina OPN-a sa ispitivanim grupama**

		OPN	Grupa
OPN	R	1,000	<b>0,735</b>
	Sig.p	.	<b>&lt;0,001**</b>
	Broj	157	157

\* $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ -  $p<0,001$ ,  $p<0,0001$ \*\*\*

Dokazana je statistički značajna korelacija između vrednosti osteopontina u odnosu na histološku dijagnozu, više vrednosti osteopontina su značajno češće u korelaciji sa seroznim, kombinovanim karcinomima i karcinomima svetlih ćelija kod grupe bolesnica sa malignim bolestima, a niže vrednosti osteopontina su značajno češće u korelaciji sa prostim i endometriotičnim cistama, u grupi bolesnica sa benignim bolestima,  $p<0,0001$  (Grafikon 15).



\*Vrednosti su prikazane kao aritmetička sredina (median) i 95% interval pouzdanosti (CI) za broj ispitanika prikazanih u Tabelama 19 i 20.

**Grafikon 15. Koncentracija OPN kod žena sa benignim i malignim tumorima jajnika prema histopatološkoj dijagnozi bolesti \***

Dokazana je statistički značajna korelacija između vrednosti osteopontina kod bolesnica sa malignim tumorima, više vrednosti osteopontina su značajno češće u korelaciji sa EOC, dok su niže vrednosti osteopontina značajno češće u korelaciji sa graničnim-*border line* tumorima, za  $p < 0,042$  (Tabela 23).

Dokazana je statistički značajna korelacija između vrednosti osteopontina kod bolesnica sa malignim tumorima, u odnosu na FIGO stadijum, više vrednosti osteopontina su značajno češće u korelaciji sa višim FIGO stadijumima, za  $p < 0,0001$ .

Dokazana je statistički značajna korelacija između vrednosti osteopontina kod bolesnica sa malignim tumorima, u odnosu na histološki gradus, više vrednosti osteopontina su značajno češće u korelaciji sa višim histološki gradusom, za  $p < 0,035$ .

Nije statistički značajna korelacija između vrednosti osteopontina kod bolesnica sa malignim tumorima, u odnosu na nuklearni gradus, za  $p = 0,178$  (Tabela 23).

**Tabela 23. Spirmanova korelacija glikoproteina osteopontina kod pacijentkinja sa malignim tumorima prema stadijumima tumorske bolesti (FIGO), prema histološkom (G) i nuklearnom gradusu (NG)**

		EOC / Border Line	FIGO stadijum	Histoloski gradus	Nuklearni Gradus
OPN	R	<b>-0,270</b>	<b>0,599</b>	<b>0,280</b>	0,181
	Sig.	<b>0,042*</b>	<b>0,001**</b>	<b>0,035*</b>	0,178
	Broj	57	57	50	50

\* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  -  $p < 0,001$ ,  $p < 0,0001$ \*\*\*

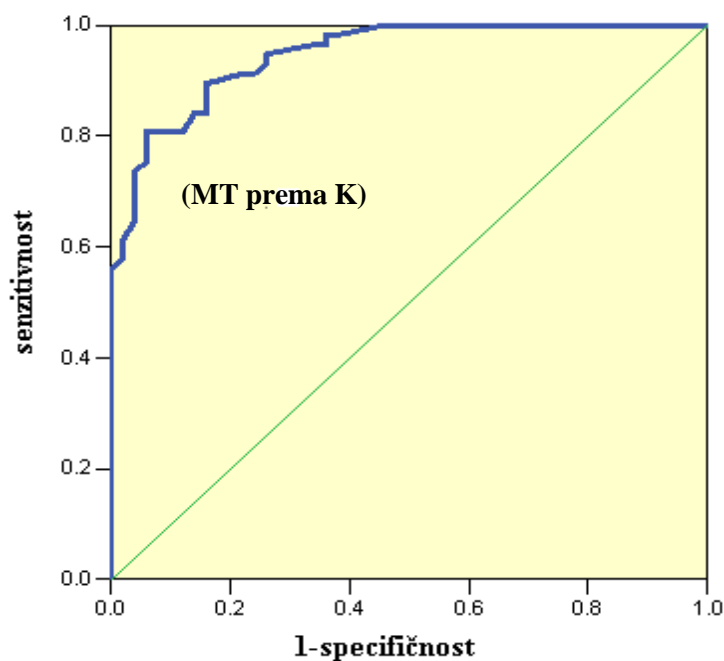
#### 4.2.5. Značaj određivanja osteopontina u dijagnostici malignih i benignih tumora jajnika

Na osnovu prethodnih rezultata dobijenih upoređenjem prosečnih koncentracija OPN-a kod žena u menopauzi u odnosu na premenopauzu, ustanovljeno je da kod benignih tumora, kao i u ranoj fazi razvoja maligniteta nema značajne razlike. U uznapredovaloj formi razvoja maligniteta ustanovljena je značajno veća koncentracija OPN-a kod žena u menopauzi. Shodno ovom zaključku, kao i na osnovu preliminarne analize upoređenja rezultata ROC – analize za dobijanje graničnih vrednosti OPN-a u odnosu na menopauzu, potvrđeno je da nema signifikantne razlike. Zbog toga su u nastavku analize granične vrednosti OPN-a određivane u ukupnom uzorku žena, bez obzira na menopauzu.



#### 4.2.5.1. Granična vrednost OPN-a u predikciji malignog tumora jajnika

Klinički značaj proteina OPN je ispitan određivanjem njegove senzitivnosti, specifičnosti i prediktivne vrednosti u dijagnostici tumora jajnika. ROC analizom za bolesnice sa malignim tumorima u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanica dobijena je površina ispod ROC krive od 94,6%,  $AUC=0,946\pm 0,019$ , za  $p<0,0001$ . Na osnovu veličine površine ( $AUC = 0.946$ ) saznajemo da će ispitanice sa malignim tumorima imati 95% veće šanse nego zdrave ispitanice da imaju povišene vrednosti OPN (Grafikon 16 sa pripadajućom tabelom).



**Grafikon 16.**  
OPN ROC kriva grupa bolesnica sa malignim tumorom (MT) prema zdravim ispitanicama (K)

ROC	Površina pod krivom	Std. greška	Asymptotic Sig p	95% CI	
				donja	gornja
MT prema K	0,946	0,019	0,0001***	0,909	0,983

Visoka senzitivnost u primeni dijagnostičkog testa sa određenom graničnom vrednošću OPN-a u predikciji malignog tumora jajnika obezbeđuje minimalan broj pojave lažno negativnih rezultata (5,4%). Izborom granične vrednosti OPN-a od  $240\mu\text{g/L}$  sa ovakvim svojstvima obezbeđena je mogućnost blagovremene primene adekvatne terapije, što je

poželjna mera u većini slučajeva postojanja neoplazmi. Za ovu veličinu senzitivnosti pokazatelj specifičnosti testa je adekvatna mera od 78% (Tabela 24).

Kako su senzitivnost i specifičnost karakteristike testa zasnovane na utvrđenoj graničnoj vrednosti markera, prediktivne vrednosti su uslovljene prevalencom bolesti u delu populacije koja se testira. Za kliničara, bitna je procena da u okviru uzorka ljudi koji imaju test-pozitivne rezultate stvarno postoji bolest. Obrnuto je u slučajevima negativnih rezultata testa. Pozitivna i negativna prediktivna vrednost za utvrđenu graničnu vrednost OPN-a od 240 $\mu$ g/L u pojavi malignih tumora jajnika, prikazane su u Tabeli 24.

**Tabela 24. Dijagnostičke karakteristike testa za određenu graničnu vrednost OPN-a u predikciji malignog tumora jajnika**

grupe	cut-off OPN $\mu$ g/L	Senzitivnost% (95% CI)	Specifičnost% (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)
MT prema K	<b>240,00</b>	91,2 (80,7-97,1)	78,0 (64,0-88,5)	82,5 (70,9-90,9)	88,6 (75,4-96,2)

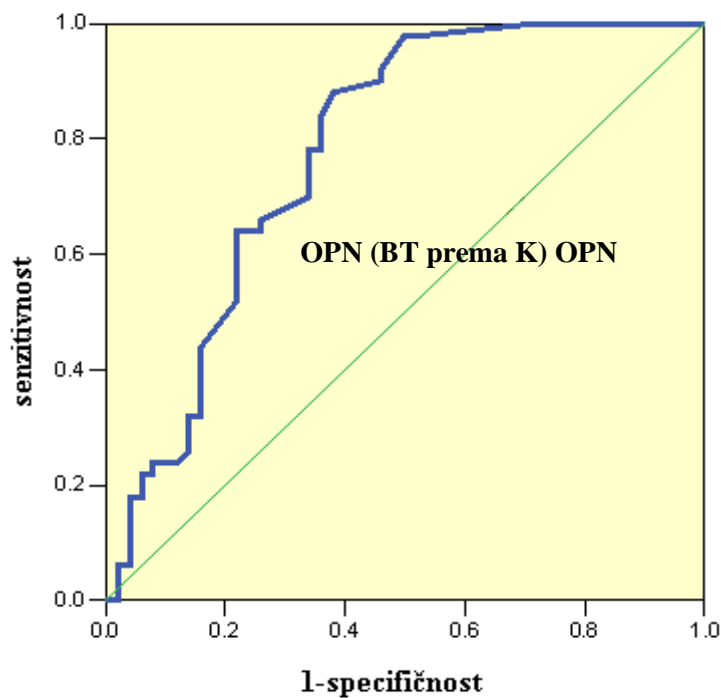
MT-grupa ispitanica sa malignim tumorima jajnika, K-kontrolna grupa zdravih ispitanica  
PPV- pozitivna prediktivna vrednost NPV- negativna prediktivna vrednost

#### 4.2.5.2. Granična vrednost OPN-a u predikciji benignog tumora jajnika

U interesu dobijanja što boljih performansi dijagnostičkog testa u detekciji prisustva epitelnih neoplazija ovarijuma, u nastavku je ROC analiza primenjena na određivanje značajne granične vrednosti u grupi sa benignom formom bolesti u odnosu na zdrave ispitanice.

I u ovom slučaju prioritetan selekcionni kriterijum za dijagnostičku korisnost primene testa sa određenom graničnom vrednošću bila je veličina površine ispod ROC krive. Upoređenjem bolesnica sa benignim tumorima u odnosu na kontrolnu grupu zdravih

ispitanica dobijena je površina ispod ROC krive od 77,8% ,  $AUC=0,778\pm 0,048$ , za  $p<0,0001$  (Grafikon 17 i pripadajuća tabela).



**Grafikon 17.**  
**OPN ROC kriva grupa**  
**bolesnica sa benignim**  
**tumorom (BT) prema**  
**zdravim ispitanicama (K)**

ROC	Površina pod krivom	Std. greška	Asymptotic Sig p	95% CI	
				donja	gornja
BT prema K	0.778	0.048	0,0001***	0.685	0.872

Ako se uporede dobijene površine ispod ROC krive kod malignih tumora i kod benignih tumora u odnosu na vrednosti kod zdravih ispitanica, može se zaključiti da je dobijena površina ispod ROC krive manja kod benignih za 16,8% u odnosu na istu vrednost kod malignih tumora.

Za optimalnu cut off vrednost od 110,00  $\mu\text{g/L}$  određena je senzitivnost od 88 % i specifičnost od 62%. Ako se uporede senzitivnost kod malignih tumora i benignih tumora u odnosu na vrednosti kod zdravih ispitanica, može se zaključiti da je senzitivnost za cut off vrednosti od 110,00  $\mu\text{g/L}$  neznatno manja kod benignih u odnosu na maligne tumore (91,2% prema 88.0%). Niža senzitivnost za odgovarajuće cut off

vrednosti je u grupi benignih u odnosu na maligne prema kontrolnoj grupi (78% prema 62.2%) (Tabela 25).

Kako je osnovna veličina uporedivosti dijagnostičke korisnosti testova veličina površine ispod ROC krive, to se na osnovu njihove signifikantnosti može zaključiti da primena oba testa obezbeđuju pouzdanu klasifikaciju, ili u ovom slučaju, diferencijaciju bolesnih od zdravih ispitanica.

Manja specifičnost, u primeni granične vrednosti OPN-a kao markera za prisustvo benigne neoplazije ovarijuma, znači mogućnost da čak 37.8% rezultata bude lažno pozitivno. U slučaju benigne neoplazije koja neposredno ne ugrožava život ili znatno ne umanjuje kvalitet života, prisustvo većeg broja lažno-pozitivnih rezultata, prihvatljiva je alternativa za veću senzitivnost, koja se značajno ne razlikuje u otkrivanju prisustva bolesti u odnosu na maligne slučajeve.

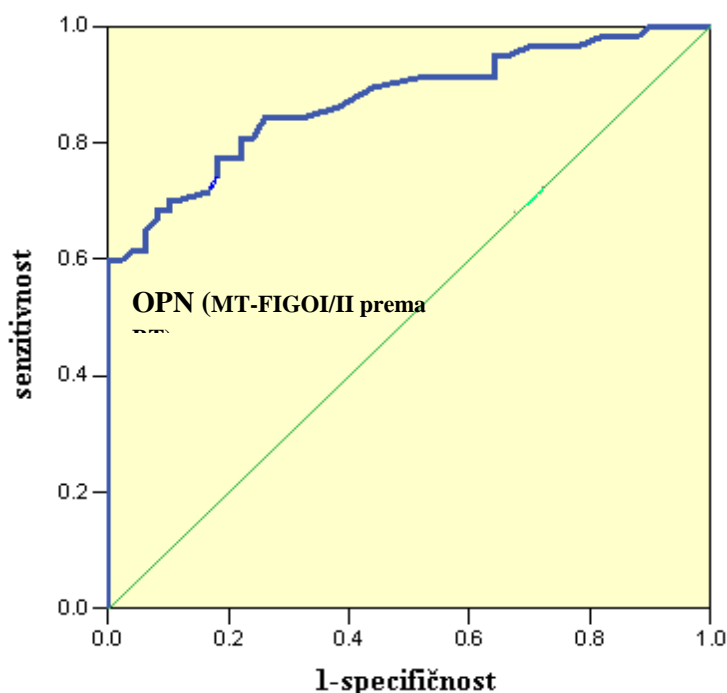
**Tabela 25. Dijagnostičke karakteristike testa za određenu graničnu vrednost OPN-a u predikciji benignog tumora jajnika**

grupe	cut-off OPN μg/L	Senzitivnost% (95% CI)	Specifičnost% (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)
BT prema K	<b>110,00</b>	88.0 (75,7-95,4)	62.2 (47,2-75,3)	69.8 (57,0-80,9)	83.8 (67,9-93,8)

MT-grupa ispitanica sa malignim tumorima jajnika, K-kontrolna grupa zdravih ispitanica  
PPV- pozitivna prediktivna vrednost NPV- negativna prediktivna vrednost

#### 4.2.5.3. Granična vrednost OPN-a u diferencijalnoj dijagnostici benignih i rane faze malignih tumora jajnika (FIGOI/II)

Dopunski kriterijum u razgraničenju benignih od malignih formi epitelnih ovarijalnih tumora, na osnovu graničnih koncentracija OPN, uslovlila je primenu ROC analize, upoređenjem ovih grupa ispitanica. Na Grafikonu 18. i pripadajućoj tabeli se vidi da je i u ovom slučaju veličina površine ispod ROC krive visoko statistički značajna (AUC=0,871,  $p < 0,0001$ ), što znači da je primena utvrđene granične vrednosti pouzdana (Grafikon 18 sa pripadajućom tabelom).



**Grafikon 18.**  
**OPN ROC kriva grupa bolesnica sa malignim tumorom u ranoj fazi (MT-FIGO I/II) prema ispitanicama sa benignim tumorom (BT)**

ROC	Površina pod krivom	Std. greška	Asymptotic Sig p	95% CI	
				donja	gornja
MT prema BT	0,871	0,034	0,0001***	0,805	0,938

Prethodno utvrđene granične vrednosti OPN-a za pojavu benigne epitelne neoplazije ovarijuma od 110  $\mu\text{g/L}$  i 240  $\mu\text{g/L}$  za pojavu maligniteta ovog oboljenja znače da će značajna većina bolesnica sa benignim ovarijalnim tumorom imati koncentracije OPN-a u ovim granicama. Kako je, na osnovu specifičnosti dijagnostičkog testa za malignitet ovarijuma, moguća pojava od 22% lažno pozitivnih rezultata, to je velika verovatnoća da bi se oni mogli naći u koncentracijama OPN-a od 240-340  $\mu\text{g/L}$ .

Kako pokazuje Tabela 26, iznad granične vrednosti OPN-a od 340 µg/L sa senzitivnošću od 80,7%, može se tvrditi da je u pitanju maligna forma tumora epitela ovarijuma u ranoj fazi. Naime, dopunskim testiranjem utvrđeno je da su u ovom slučaju maligniteta u signifikantnom broju zastupljeni FIGO stadijumi I i II.

Na ovaj način identifikovana je granična vrednost OPN-a od 340 µg/L koja može poslužiti kao dodatni kriterijum u diferencijalnoj dijagnostici benigne i maligne forme bolesti, odnosno kao dodatni kriterijum u ranoj dijagnostici i kao pomoćni kriterijum u eliminaciji lažno pozitivnih i negativnih rezultata.

**Tabela 26. Dijagnostičke karakteristike testa za određenu graničnu vrednost OPN-a i predikcija rane faze malignih tumora jajnika**

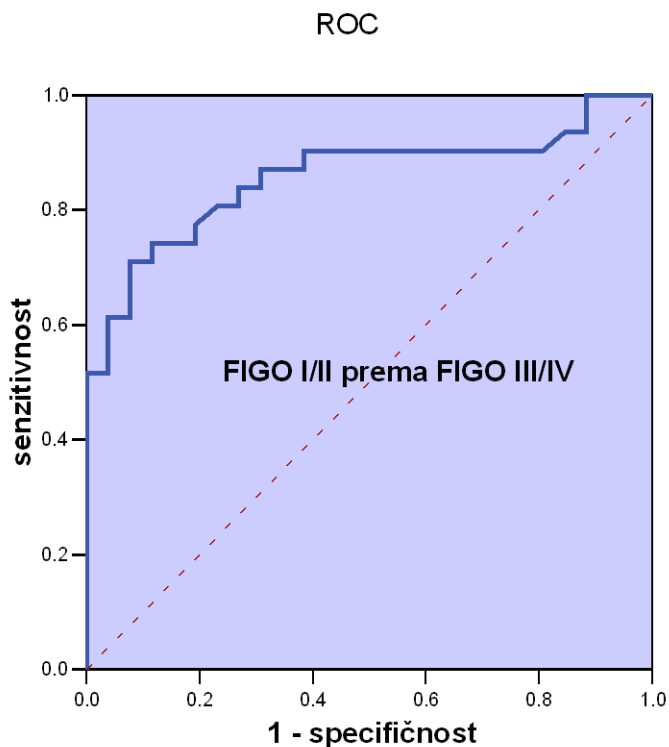
grupe	cut-off OPN µg/L	Senzitivnost% (95% CI)	Specifičnost% (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)
MT-FIGO I/II prema BT	<b>340,00</b>	80,7 (68,1-89,9)	76,0 (61,8-86,3)	79,3 (66,6-88,8)	77,6 (63,4-88,2)

MT-grupa ispitanica sa malignim tumorima jajnika- FIGO I/II, BT-grupa ispitanica sa benignim tumorima jajnika  
PPV- pozitivna prediktivna vrednost; NPV- negativna prediktivna vrednost

#### 4.2.5.4. Granična vrednost OPN-a u dijagnostici rane i kasne faze epitelnih tumora jajnika

Kao što je prethodna analiza pokazala, postoji značajna razlika u koncentracijama OPN-a u ranim i kasnim fazama tumorske bolesti, u FIGO stadijumu I i II u odnosu na III i IV. Ovaj zaključak, kao i činjenica da postoji značajno različita manifestacija bolesti u ovim fazama, uslovlila je potrebu da se granična vrednost OPN-a ispita u odnosu na dve faze bolesti u kojoj bi FIGO I i II predstavljali ranu a FIGO III i IV kasnu fazu maligne progresije epitelnog tumora ovarijuma.

Na Grafikonu 19 i pripadajućoj tabeli se vidi da je površina ispod ROC krive (AUC=0,857), kao pokazatelj sveukupne mere tačnosti dijagnostičkog testa upoređenja koncentracija OPN-a u definisanim fazama, visoko signifikantna veličina ( $p < 0.0001$ ).



**Grafikon 19.**  
**OPN ROC kriva**  
**grupa**  
**bolesnica sa malignim**  
**tumorom u FIGO I/II**  
**stadijumu u odnosu na**  
**FIGO III/IV stadijum**

ROC	Površina pod krivom	Std. greška	Asymptotic Sig p	95% CI	
				donja	gornja
FIGO I/II prema FIGO III/IV	0,857	0,052	0,0001***	0,756	0,959

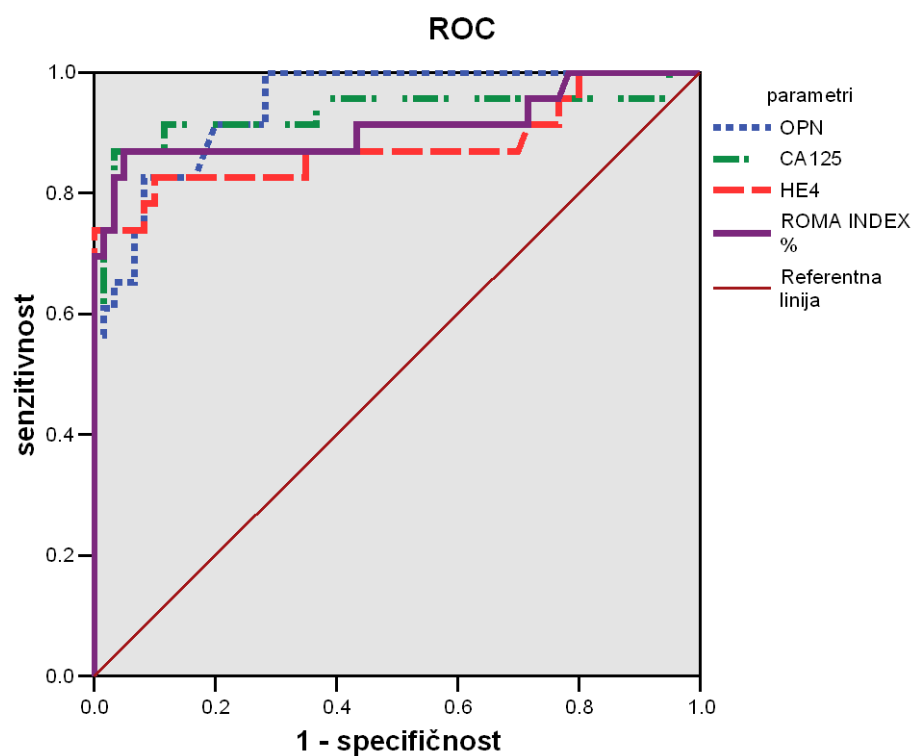
Razmatrano po osnovnim karakteristikama testa koji bi se odnosio na graničnu vrednost OPN-a od 760  $\mu\text{g/L}$ , optimalne veličine senzitivnosti i specifičnosti su 78,8% i 79,2%, respektivno (Tabela 27).

**Tabela 27. Dijagnostičke karakteristike testa za određenu graničnu vrednost (*cut off*) OPN-a i predikcija kasne (FIGO III/IV) u odnosu na ranu fazu (FIGO I/II) bolesti**

grupe	cut-off OPN µg/L	Senzitivnost% (95% CI)	Specifičnost% (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)
FIGO I/II prema FIGO III/IV	<b>760,00</b>	78,8 (61,1-90,9)	79,2 (57,8-92,8)	83,9 (66,3-94,5)	73,1 (52,2-88,4)

PPV- pozitivna prediktivna vrednost; NPV- negativna prediktivna vrednost

#### 4.2.6. ROC analiza tumorskih markera HE4, CA125, i ROMA indeksa u poređenju sa OPN



**Grafikon 20. ROC krive OPN, CA125, HE4 kod malignih tumora prema benignim tumorima**



Ispitivanjem povezanosti vrednosti osteopontina, CA125, HE4 i ROMA indeksa u grupi malignih tumora u odnosu na benigne, dobijena ROC krive ima površinu za osteopontin od 87,1% za  $p < 0,0001$ , za CA125 zahvata najmanju površinu i iznosi 82,0%, za  $p < 0,0001$ , kod HE4 dobijena površina ispod ROC krive iznosi 84,9% , za  $p < 0,0001$ , a kod ROMA index-a dobijena površina iznosi 88,3%, za  $p < 0,0001$ . Dobijena ROC analiza je prikazana na Grafikonu 20.

Poredjenjem površina pod ROC krivom između OPN-a i ostalih markera: Ca125, HE4, kao i ROMA indexa zaključeno je da nema statistički značajne razlike u površinama pod krivama (u poređenju malignih tumora u odnosu na benigne tumore, primenom nabrojanih parametara -  $p > 0,05$ , Tabela 28).

Upoređenjem veličina površina ispod ROC krive, vidi se da ROMA indeks ima najveću površinu (AUC=0,883) u odnosu na ostale parametre. Ovaj podatak svedoči o najvećoj dijagnostičkoj korisnosti upotrebe ovog indeksa kada se utvrđuje malignost postojećeg tumora epitela ovarijuma. Po veličini AUC površine sleduje, sa vrlo bliskom vrednošću koncentracija OPN(AUC=0,871) sa *cut off* vrednošću od 340  $\mu\text{g/L}$ , kao dijagnostički test za razgraničenje malignih od benignih formi bolesti. Iza toga su po veličini i ostala dva upoređivana markera: HE(AUC=0,849) i CA125(AUC=0,820).

Međutim, treba naglasiti da bez obzira na utvrđene minimalne razlike u veličinama površina ispod ROC krive, dokazano je da te razlike, na usvojenom nivou pouzdanosti, nisu značajne. Znači da se primena bilo koga od nabrojanih markera, kao i ROMA indeksa, u dijagnostičkoj proceduri može smatrati jednako pouzdanom.

**Tabela 28. Poređenje površina ispod ROC krivih, senzitivnost i specifičnost OPN sa CA125, HE4 i ROMA medju ispitanicama obolelim od tumora jajnika**

Maligni tumori prema benignim tumorima					
parametar	ROC-AUC (95% CI)	Cut off	Senzi- tivnost (%)	Specifi- čnost (%)	signifikantnost razlike p
OPN( $\mu$ g/L)	<b>0,871</b> (0,805-0,938)	<b>340,0</b>	80,7	76,0	
CA125(KU/L)	<b>0.820</b> (0.737-0,903)	<b>54,0</b>	73,7	72,0	0,332
HE4(pmoL/L)	<b>0.849</b> (0.722-0.976)	<b>88,0</b>	82,6	79,9	0,442
ROMA(%)	<b>0,883</b> (0.771-0.995)	<b>38,0</b>	87,0	89,5	0,360

U Tabeli 29 su prikazane površine ispod ROC krive dobijene primenom tumor-markera OPN, CA125, HE4 i ROMA indeksa u dijagnostikovanju rane faze (FIGO I/II) malignih neoplazmi ovarijuma u odnosu na kasnu fazu (FIGO III/IV).

Slično prethodnoj analizi medjusobnog poređenja dijagnostičkog kvaliteta parametara, dokazuje se da nema signifikantne razlike u površinama ispod ROC krive ( $p > 0,05$ ).

Može se konstatovati da i u ovom slučaju ROMA indeks pokazuje najbolje dijagnostičke performanse. Osim veličine AUC to je izraženo i najvećom senzitivnošću i 91,7% i specifičnošću 90,9%, u odnosu na ostale parametre. Slede zatim, HE4 (AUC=0.955), OPN (AUC=0,857) i CA125 (AUC=0,818).

Međutim, stepen maligniteta, odnosno prelazak iz rane u uznapredovalu fazu maligne bolesti, na osnovu primene graničnog praga upoređivanih parametara, može se pouzdano primeniti bez signifikantne razlike između upotrebljenih parametara.

**Tabela 29. Poređenje površina ispod ROC krivih, sensitivnost i specifičnost OPN ( $\mu\text{g/L}$ ) sa CA125 (KU/L), HE4 (pmoL/L) i ROMA Indeksom (%) medju ispitanicama sa malignim tumorima u odnosu na FIGO stadijum tumora jajnika**

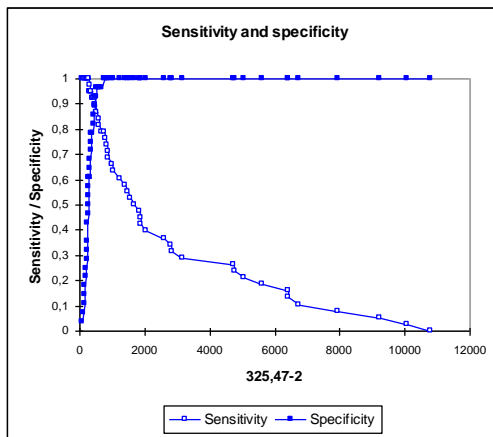
FIGO I/II prema III/IV					
parametar	ROC-AUC (95% CI)	Cut off	Senzi tivnost (%)	Specifi čnost (%)	signifikantnost razlike p
OPN	<b>0,857</b> (0,756-0,959)	<b>760,00</b>	78,8	79,2	
CA125	<b>0,818</b> (0,640-0,996)	<b>173,0</b>	81,7	63,6	0,625
HE4	<b>0,955</b> (0,872-1,000)	<b>769,0</b>	91,7	81,8	0,988
ROMA	<b>0,992</b> (0,968-1,000)	<b>96,0</b>	91,7	90,9	1,,004

U nastavku analize izvršena su upoređenja u kombinovanoj primeni prethodno analiziranih parametara. Dokazano je da nema razlike u površinama pod ROC krivom medju kombinacija 3 tumorska markera, u ukupnom broju ispitanica sa malignim tumorima u odnosu na ispitanice sa benignim tumorima.

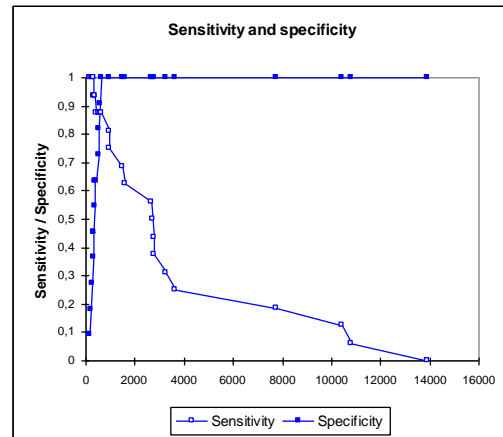
Da bi smo ocenili može li se OPN koristiti kao dopunski marker uz CA125, ispitali smo prediktivnu sposobnost ovog kombinovanog markera OPN+CA125 u predikciji ovarijalnog kancera. Dijagnostička snaga testa OPN+CA125 je izračunata ROC analizom, AUC<sub>(OPN+CA125)</sub> je iznosila 94,1%, dok je senzitivnost porasla na 92,8%, (Grafikon 21) što su znatno bolje vrednosti od pojedinačnih karakteristika CA125. Ispitivanjem razlika izmedju područja pod ovim ROC krivama, zaključeno je da je površina pod ROC krivom za Ca125 u odnosu na površinu pod ROC krivom za udružene markere OPN i Ca125 statistički značajno manja (Z test=-1.906, p <0,028). Zaključujemo da je OPN+Ca125 ima najveću površinu pod ROC krivom.

Sličan efekat se dobija kombinacijom OPN-a sa HE4. Kod osteopontina u kombinaciji sa HE4 dobijena površina ispod ROC krive zahvata površinu od 94,5% u grupi malignih tumora u odnosu na benigne. A kada se udruže sva tri tumor markera OPN, CA125 i HE4 dobijena površina ispod ROC krive iznosi 94,5%, i značajno je povećana

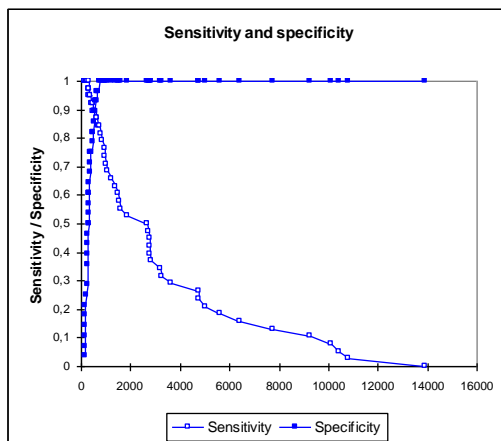
senzitivnost metode, ali istovremeno dolazi i do pada specifičnosti testa ovako udruženih markera.



OPN +Ca125 vs OPN+HE4



OPN +HE4 vs OPN +Ca125+HE4



OPN +HE4 vs OPN +Ca125+HE4

**Grafikon 21. Prikaz senzitivnosti i specifičnosti kombinovanih tumor markera**

### **4.3. Poređenje i korelacija osteopontina i drugih tumorskih markera**

#### **4.3.1. Poređenje nivoa osteopontina sa tumorskim markerima i njihov odnos u različitim tipovima i stadijumima tumora jajnika**

Sledeći korak u ispitivanju značaja osteopontina za dijagnostiku EOC je poređenje sa danas aktuelnim tumor markerima koji se u redovnoj kliničkoj praksi najčešće koriste u detekciji EOC.

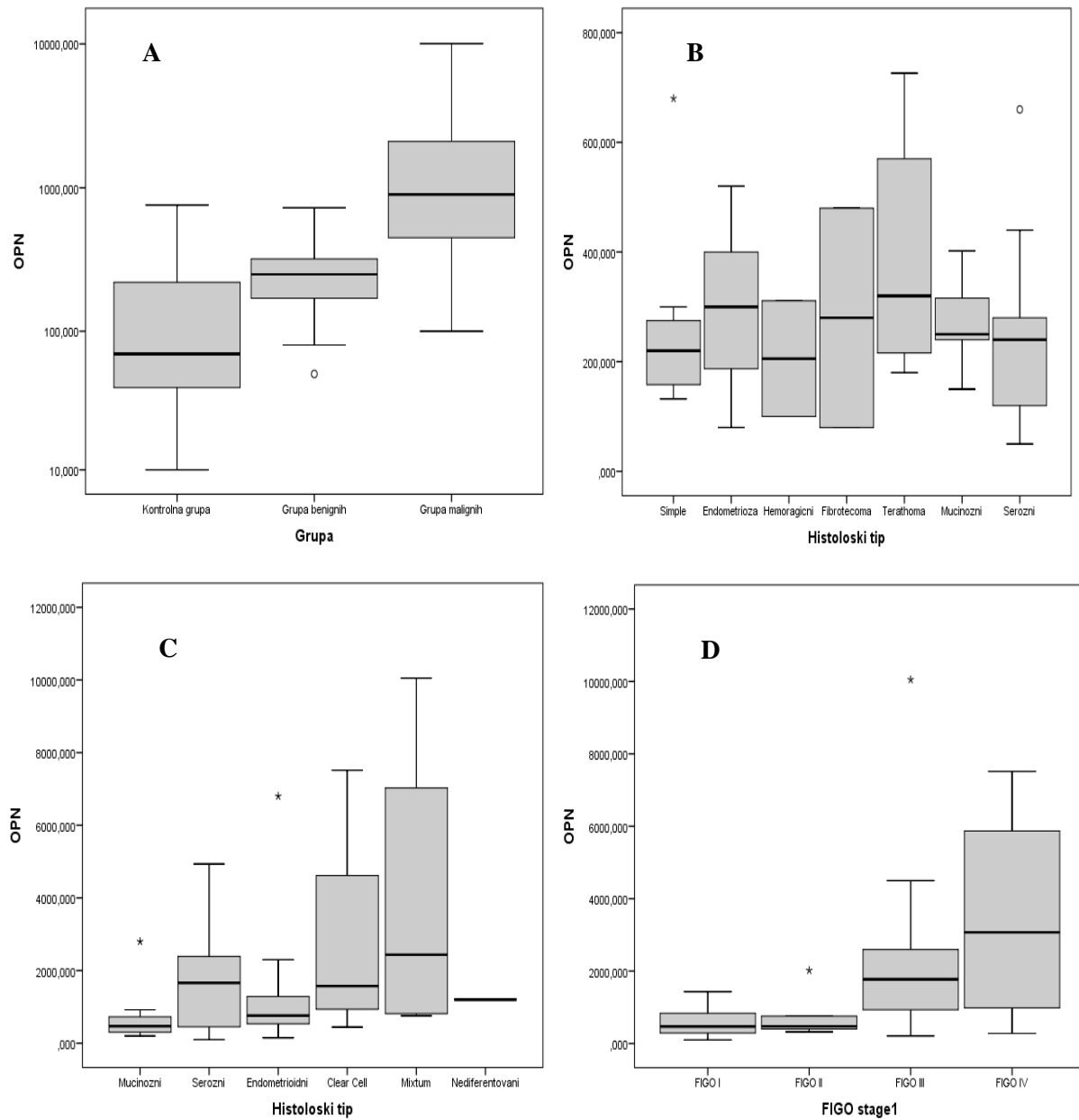
U Tabeli 30 su prikazane medijane i intervali pouzdanosti za tumor markere CA 125, zatim za HE4, kao i za ROMA index (Tabela 31), u odnosu na histologiju tumora. OPN je prikazan samo radi uporedjenja, zbog detaljne analize ovog parametra u prethodnim poglavljima.

U grupi benignih tumora nije dokazana statistički značajna razlika u visinu CA 125 u odnosu na histološki tip tumora (K-W test=7,651, df=6, p=0,265), dok je u grupi malignih tumora dokazana statistički značajna razlika u visini CA 125 u odnosu na histološki tip tumora (K-W test=24,10,df=5, p<0,0001).

Nije dokazana statistički značajna razlika u vrednostima HE4 u odnosu na histološki tip tumora (K-W test=6,818, df=5, p=0,234) u grupi benignih bolesnica, ali u grupi malignih tumora dokazana je statistički značajna razlika u visinu HE4 u odnosu na histološki tip tumora (K-W test=12,716,df=5, p<0,013).

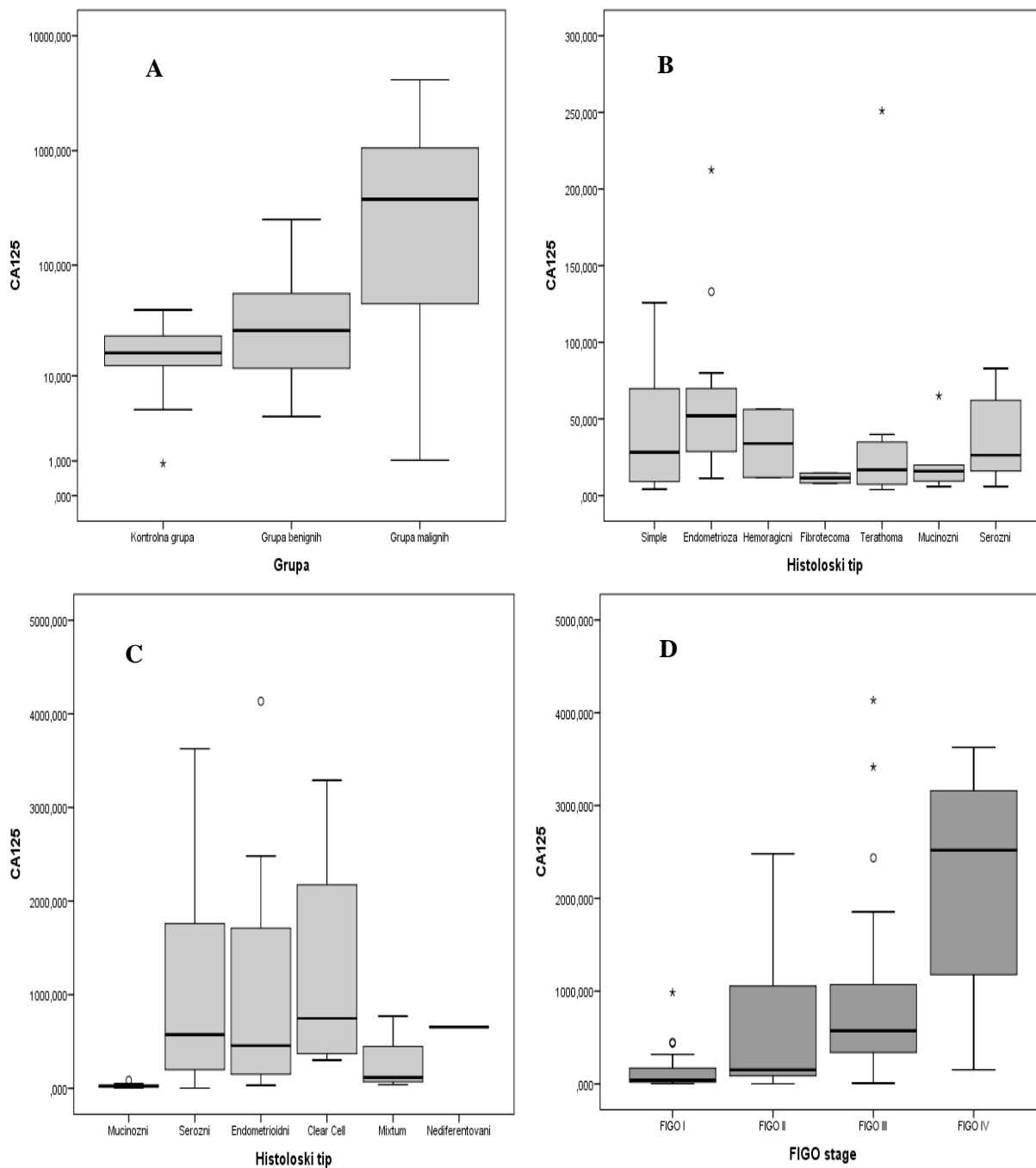
**Tabela 30. Distribucija vrednosti OPN, CA125, HE4, prema histologiji i FIGO stadijumu tumora**

	CA125 (KU/L)		HE4 (pmoL/L)		OPN (µg/L)	
	Median	95% CI	Median	95% CI	Median	95% CI
<b>BT</b>						
<i>cystis simplex</i>	28,2	7,03-79,09	52	19,50-298,50	220,00	116,8-412,26
<i>c. endometriotica</i>	42,57	27,04-141,85	55,3	22,32-86,28	300,0	191,6-396,39
<i>c. dermoides</i>	34	11,8-56,20	70,20		205,50	135,0-1546,0
<i>cystadenofibroma</i>	11,46	9,71-12,63	26,10		280,00	226,1-821,4
<i>thecoma</i>	18,96	23,18-159,29	64,25	43,6-326,63	320,00	214,5-564,96
<i>cystadenoma mucinosum</i>	13,8	6,60-53,00			250,00	155,1-388,12
<i>cystadenoma serosum</i>	26,2	42,03-128,84	54,8	43,04-152,80	240,00	157,5-336,75
<b>MT</b>						
<i>adenocarcinoma mucinosum ovarii</i>	18,45	13,58-41,09	34,50	25,61-43,39	<b>468,50</b>	236,6-1130,5
<i>adenocarcinoma serosum ovarii</i>	768,00	635,71-1565,56	1307,0	676,79-2830,44	1660,00	135,1-2300,5
<i>adenocarcinoma endometrioides</i>	568,50	169,71-1980,22	741,40	140,23-1325,64	760,00	170,4-2689,9
„clear cell“	746,85	933,75-3476,45	880,0	667,41-3285,36	1575,00	232,9-7878,9
<i>adenocarcinoma mixtus malignusi</i>	113,37	285,44-804,24	88,3		2435,0	301,1-10848
„undifferentiated“	654,00					
<b>FIGO stadijum</b>						
I	89,80	133,64-676,64	84,40	90,89-573,76	468,50	400,1-726,4
II	578,50	862,59-2725,09	257,00	308,66-1158,81	473,50	64,34-1416,3
III	572,00	153,20-2447,22	1032,00	888,18-1392,05	1770,00	1345,1-3134,5
IV	3159,50	155,00-5071,33	2792,25	883,18-4604,42	3070,00	1161,4-5748,9



**Grafikon 22 . Karakteristike osteopontina**

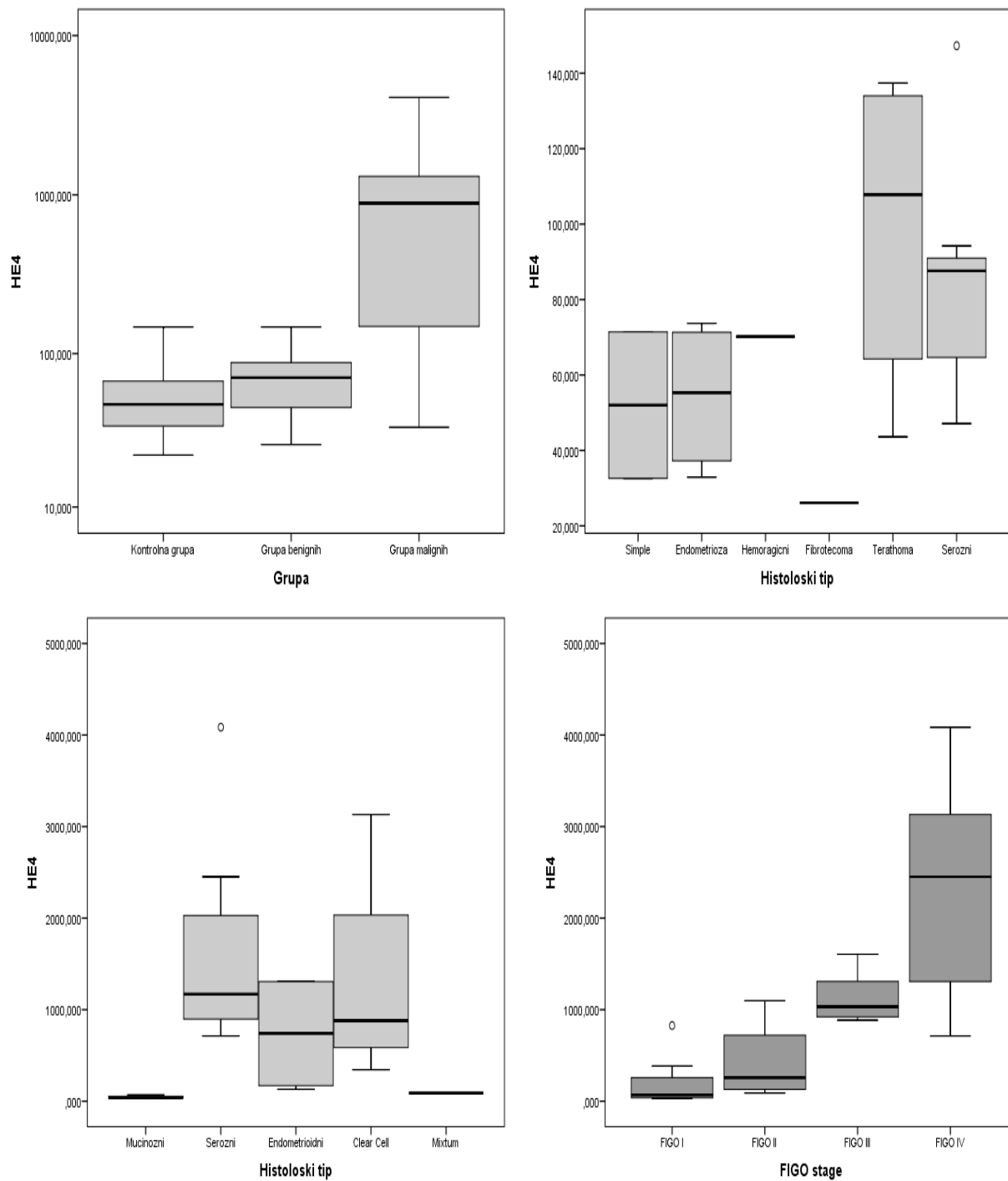
- A.** Koncentracije OPN kod ispitivanih grupa.
  - B.** Koncentracije OPN kod benignih histoloških tipova tumora jajnika.
  - C.** Koncentracije OPN kod malignih histoloških tipova karcinoma jajnika.
  - D.** Koncentracije OPN u četiri FIGO stadijuma karcinoma jajnika.
- (Vrednosti su prikazane kao median za ispitanice koje su prikazane u Tabeli 30)



**Grafikon 23. Karakteristike Ca125**

- A. Koncentracije ca125 kod Ispitivanih grupa.
- B. Koncentracije Ca125 kod benignih histoloških tipova tumora jajnika.
- C. Koncentracije Ca125 kod malignih histoloških tipova karcinoma jajnika.
- D. Koncentracije Ca125 u četiri FIGO stadijuma karcinoma jajnika. (Prikazano u Tabeli 30).





### Grafikon 24. Karakteristike HE4

- A. Koncentracije HE4 kod ispitivanih grupa.
- B. Koncentracije HE4 kod benignih histoloških tipova tumora jajnika.
- C. Koncentracije HE4 kod malignih histoloških tipova karcinoma jajnika.
- D. Koncentracije HE4 u četiri FIGO stadijuma karcinoma jajnika. (Prikazano u Tabeli 30)

Ni kod visine ROMA Indeksa u grupi bolesnica sa benignim tumorima jajnika nije dokazana statistički značajna razlika u odnosu na histološki tip tumora (K-W test=6,358,df=5, p=0,273), ali je kod malignih bolesnica postojala statistički značajna razlika u odnosu na histološki tip tumora (K-W test=14,783, df=5, p<0,005) (Tabela 31).

U grupi malignih bolesnica dokazana je statistički značajna razlika u koncentraciji CA125 u odnosu na FIGO stadijum tumora (K-W test=23,536, df=3, p<0,0001). U grupi malignih tumora dokazana je statistički značajna razlika u visinu HE4 u odnosu na FIGO stadijum tumora (K-W test=14,937, df=3, p<0,002), kao i kod ROMA Index-a (K-W test=16,368, df=3, p<0,001) (Tabela 30).

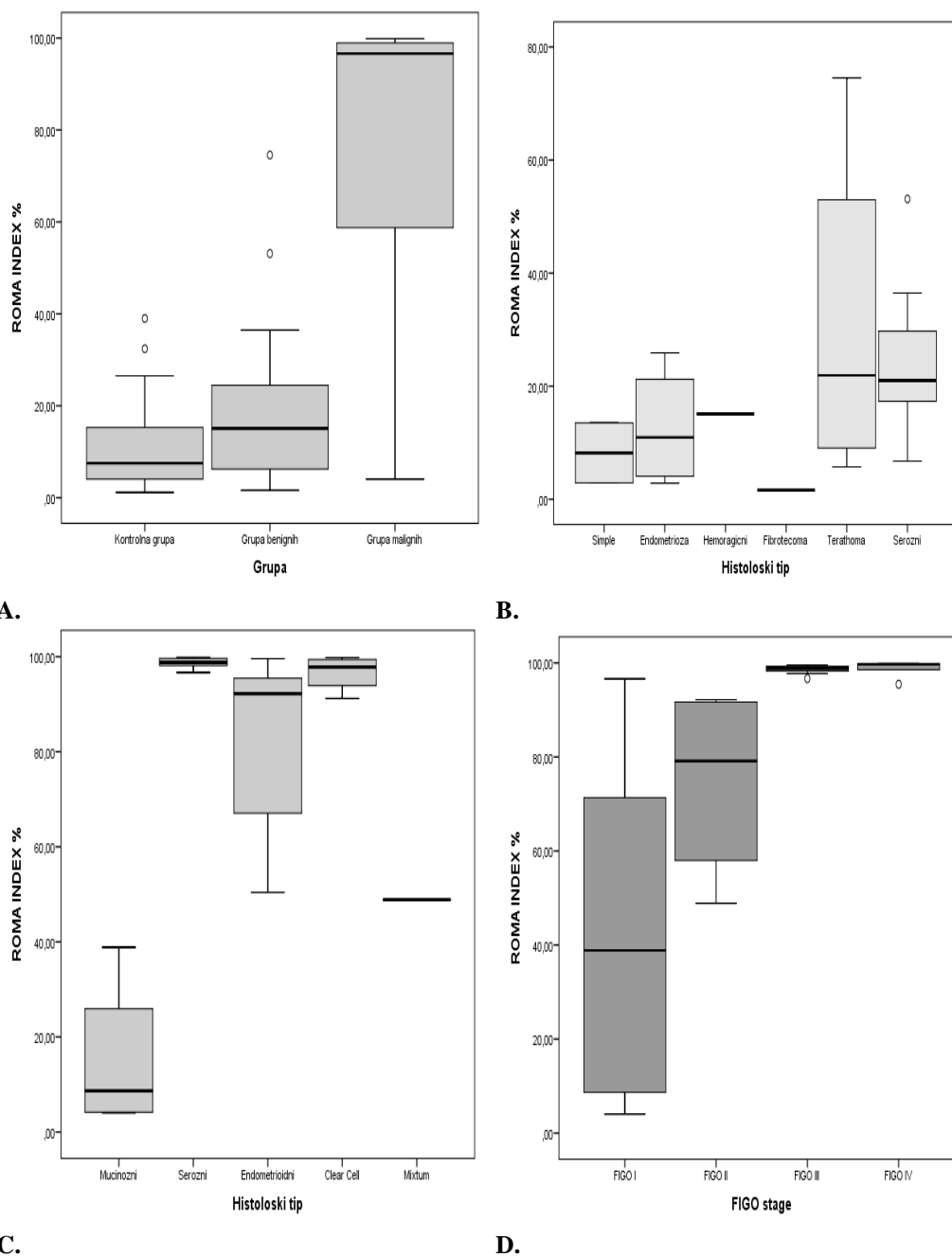
U grupi malignih tumora dokazana je statistički značajna razlika u visinu Ca 125 u odnosu na gradus tumora (K-W test=14,611, df=2, p<0,001), dok kod HE4 nije dokazana statistički značajna razlika u odnosu na gradus tumora (K-Wtest=4,555, df=2, p=0,103), kao ni kod ROMA Index-a (K-W test=2,976, df=2, p=0,226) (Tabela 30 i 31).

**Tabela 31. Distribucija vrednosti ROMA indeksa prema histologiji, FIGO stadijumu bolesti i histološkom gradusu tumora**

	ROMA (%)		ROMA (%)		
	Median	95% CI		Median	95% CI
<b>BT</b>			<b>FIGO stadijum-MT</b>		
<i>c. simplex</i>	13,37%	4,3-29,62		31,71%	11,75-88,63
<i>c. endometriotica</i>	10,945%	4,3-29,61	II	79,14%	41,69-107,99
<i>c. dermoides</i>	15,09%		III	98,84%	97,64-99,57
<i>cistisadeno fibroma</i>	1,62%		IV	99,77%	95,27-102,16
<i>thecome</i>	9,05%	33,26-51,36	<b>Histološki gradus-MT</b>		
<i>mucinus cystadenoma</i>	Nema		Nema gradus	95,12%	542,7-1867,0
<i>cystadenoma serosum</i>	21,605%	16,7-210,48	Grade 1	13,00%	10,19-135,5
<b>MT</b>			Grade 2	97,76%	76,49-99,65
<i>adenocarcinoma mucinosum</i>	8,53%	48,34-65,39	Grade 3	92,19%	jedan slucaj
<i>adenocarcinoma serosum</i>	98,84%	97,67-99,82	<b>FIGOI/II</b>		
<i>adenocarcinoma endometroides</i>	97,83%	62,29-103,38	<b>FIGOI/II</b>	50,41%	30,02-78,85
„clear cell”	93,9%	90,47-102,85	<b>FIGOIII/IV</b>	98,94%	97,77-99,51

*mixtum*

48,89%



**Grafikon 25. Karakteristike ROMA indeksa-a**

- A. Koncentracije ROMA kod ispitivanih grupa.
- B. Koncentracije ROMA kod benignih histoloških tipova tumora jajnika.
- C. Koncentracije ROMA kod malignih histoloških tipova karcinoma jajnika.
- D. Koncentracije ROMA u četiri FIGO stadijuma karcinoma jajnika. (Prikazano u Tabeli 31).

### 4.3.2. Korelacija osteopontina i ispitivanih tumor markera

Osteopontin je u kontrolnoj grupi zdravih ispitanica u direktnoj visoko signifikantnoj korelaciji sa Ca125 ( $R=0,449$ ,  $p<0,001$ ), više vrednosti OPN koreliraju sa višim vrednostima Ca125, dok sa ostalim tumor markerima nema značajniju korelaciju. HE4 je u direktnoj visoko signifikantnoj korelaciji sa Ca125 ( $R=0,453$ ,  $p<0,003$ ), više vrednosti HE4 su u vezi sa višim vrednostima Ca125. (Tabela 32.).

**Tabela 32. Pirsonova korelacija nivoa osteopontina sa nivoima drugih tumor markera u kontrolnoj grupi**

		OPN	CA125	Ca19.9	CEA	HE4	ROMA INDEX %
OPN	Pearson R	1					
	Sig.						
	Broj	50					
CA125	Pearson R	<b>0,449**</b>	1				
	Sig.	0,001					
	Broj	50	50				
Ca19.9	Pearson R	0,147	0,261	1			
	Sig.	0,456	0,180				
	Broj	28	28	28			
CEA	Pearson R	-0,007	-0,070	0,080	1		
	Sig.	0,971	0,730	0,698			
	Broj	27	27	26	27		
HE4	Pearson R	0,066	<b>0,453**</b>	0,157	0,035	1	
	Sig.	0,680	0,003	0,520	0,891		
	Broj	41	41	19	18	41	
ROMA INDEX %	Pearson R	0,229	<b>0,671**</b>	0,317	0,018	<b>0,924**</b>	1
	Sig.	0,151	0,000	0,186	0,945	0,000	
	Broj	41	41	19	18	41	41

\*. Korelacija je signifikantna na nivou  $p=0.05$  (2-tailed).

\*\* . Korelacija je signifikantna na nivou  $p=0.01$  (2-tailed).

Osteopontin nije u korelaciji sa CA125 u grupi ispitanica sa benignim tumorima ( $R=0,039$ ,  $p=ns$ ). Kao što nema značajniju korelaciju sa Ca 125, tako i sa ostalim tumor markerima nema značajniju korelaciju. HE4 je u direktnoj visoko signifikantnoj korelaciji sa ROMA ( $R=0,839$ ,  $p<0,0001$ ), više vrednosti HE4 koreliraju sa višim vrednostima ROMA, a isti je zaključak i kod Ca125 (ROMA index je izveden iz ovih vrednosti). Ca 125 je u direktnoj signifikantnoj korelaciji sa Ca19.9 ( $R=0,351$ ,  $p<0,039$ , Tabela 33).

**Tabela 33. Pirsonova korelacija nivoa osteopontina sa nivoima drugih tumor markera u grupi benignih tumora**

		OPN	CA125	Ca19.9	CEA	HE4	ROMA INDEX %
OPN	Pearson R	1					
	Sig.						
	Broj	50					
CA125	Pearson R	0,039	1				
	Sig.	0,786					
	Broj	50	50				
Ca19.9	Pearson R	-0,035	<b>0,351*</b>	1			
	Sig.	0,842	0,039				
	Broj	35	35	35			
CEA	Pearson R	-0,155	-0,100	0,145	1		
	Sig.	0,480	0,651	0,521			
	Broj	23	23	22	23		
HE4	Pearson R	-0,016	0,414	-0,374	0,021	1	
	Sig.	0,949	0,078	0,232	0,945		
	Broj	19	19	12	13	19	
ROMA INDEX %	Pearson R	-0,126	<b>0,737**</b>	-0,154	0,137	<b>0,839**</b>	1
	Sig.	0,606	0,000	0,634	0,655	0,000	
	Broj	19	19	12	13	19	19

\*. Korelacija je signifikantna na nivou  $p=0.05$  (2-tailed).

\*\*. Korelacija je signifikantna na nivou  $p=0.01$  (2-tailed).

Osteopontin je u grupi ispitanica sa malignim tumorima u direktnoj, visoko signifikantnoj korelaciji sa CA125 ( $R=0,442$ ,  $p<0,001$ ), više vrednosti OPN koreliraju sa višim vrednostima CA125. U grupi ispitanica sa malignim tumorima HE4 i osteopontin su u direktnoj visoko signifikantnoj korelaciji ( $R=0,766$ ,  $p<0,0001$ ), dok OPN sa ostalim tumor markerima nema značajniju korelaciju. HE4 je u direktnoj visokosignifikantnoj korelaciji sa Ca125 ( $R=0,453$ ,  $p<0,003$ ), više vrednosti HE4 su u vezi sa višim vrednostima Ca125.

HE4 je u direktnoj visokosignifikantnoj korelaciji sa ROMA indeksom ( $R=0,588$ ,  $p<0,003$ ), više vrednosti HE4 su u vezi sa višim vrednostima ROMA, a isti je zaključak i kod Ca125 ( $R=0,414$ ,  $p<0,05$  Tabela 34), (ROMA index je izveden iz ovih vrednosti).

**Tabela 34. Pirsonova korelacija nivoa osteopontina sa nivoima drugih tumor markera u grupi malignih tumora**

		OPN	CA125	Ca19.9	CEA	HE4	ROMA INDEX %
OPN	Pearson R	1					
	Sig.						
	Broj	57					
CA125	Pearson R	<b>0,442**</b>	1				
	Sig.	0,001					
	Broj	57	57				
Ca19.9	Pearson R	-0,023	0,037	1			
	Sig.	0,874	0,801				
	Broj	49	49	49			
CEA	Pearson R	0,094	-0,013	0,125	1		
	Sig.	0,570	0,938	0,448			
	Broj	39	39	39	39		
HE4	Pearson R	<b>0,766**</b>	<b>0,662**</b>	-0,227	0,031	1	
	Sig.	0,000	0,001	0,298	0,888		
	Broj	23	23	23	23	23	
ROMA INDEX %	Pearson R	0,356	<b>0,414*</b>	-0,034	0,120	<b>0,588**</b>	1
	Sig.	0,096	0,050	0,876	0,585	0,003	
	Broj	23	23	23	23	23	23

\*\* . Korelacija je signifikantna na nivou  $p=0.01$  (2-tailed).

\*. Correlacija je signifikantna na nivou  $p=0.05$

#### 4.4. Prognostički značaj plazmatskog osteopontina kod malignih neoplazmi ovarijuma

Cox-ovom logističkom regresionom analizom ispitan je prognostički uticaj određenih kliničkopatoloških parametara: histološki tip tumora, histološki stadijum tumorske bolesti (FIGO stadijum), histološki gradus (G), optimalna hirurška intervencija (tj. postojanje rezidualnog tumora i njegova veličina), i nivo cirkulišućeg osteopontina u predikciji smrti pacijentkinja. Nivo cirkulišućeg osteopontina je razvrstan u dve kategorije, na osnovu ROC analize u prethodnim poglavljima. Sve bolesnice su klasifikovane u dve grupe: bolesnice sa osteopontin niskim vrednostima (ispod utvrđenih *cut off* vrednosti) i bolesnice sa osteopontin visokim vrednostima (iznad utvrđenih *cut off* vrednosti).

Prva veličina koja je bila od interesa je granična vrednost osteopontina značajna za pojavu maligniteta ( $240\mu\text{g/L}$ ). Osim prethodno analiziranih dijagnostičkih karakteristika za ovu graničnu vrednost, primenom analize rizika utvrđeno je da je verovatnoća da ispitanice sa malignim tumorima imaju OPN iznad  $240\mu\text{g/L}$  je 8 puta viša ( $\text{OR}=8,11$ ) nego kod benignih tumora. Verovatnoća da će ispitanice sa malignim tumorima imati OPN iznad  $240\mu\text{g/L}$  je 44 puta viša ( $\text{OR}=44,63$ ) nego kod zdravih ispitanica. (Tabela 35).

**Tabela 35. Faktor rizika za nastanak maligniteta za cut-off vrednosti OPN ( $240\mu\text{g/L}$ ) u grupama ispitanica**

Simbol	Procena	Std. greška	Donja 95% CI	Gornja 95% CI
<b>MT prema BT</b>				
<b>OR</b>	<b>8,11</b>	<b>1,61</b>	<b>3,20</b>	<b>20,59</b>
<b>MT prema K</b>				
<b>OR</b>	<b>44,63</b>	<b>1,78</b>	<b>14,35</b>	<b>138,77</b>

OR (95% CI), odds ratio, 95% interval pouzdanosti

#### 4.4.1. Cox-ova regresiona analiza za *cut-off* 240 µg/L

Za izvođenje Cox-ove analize korišćeni su sledeći parametri: OPN kao kontinuirano obeležje, i kao atributivno obeležje sa *cut-off* vrednošću od 240 µg/L i sve nabrojane kliničko patološke varijable.

Prognostički potencijal svih ispitivanih faktora (osteopontina kao kontinuiranog i atributivnog obeležja, histološki tip tumora, stadijum tumorske bolesti, histološki i nuklearni gradus, veličina rezidualnog tumora, starost ispitanica), bio je veći u univarijantnom modelu Coxove regresione analize nego u multivarijantnom modelu. Univarijantnom Coxovom analizom najbolju prediktivnu vrednost (najjači prediktorski uticaj) na ishod bolesti imale su: FIGO stadijum bolesti i povišene koncentracije OPN>240 µg/L, dok se značajnost potpuno izgubila ( $p>0,05$ ) za histološki i nuklearni gradus u predikciji smrtnog ishoda. (Tabela 36.).

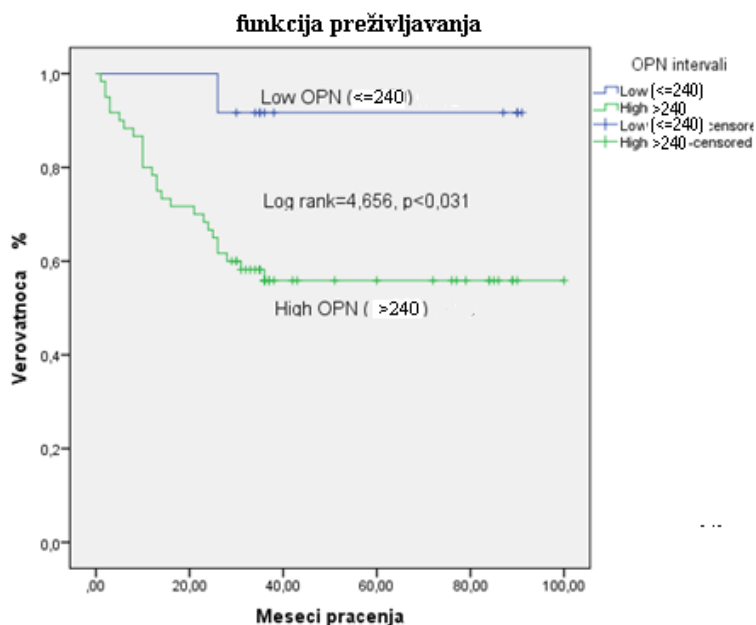
**Tabela 36. Cox univarijantna regresiona analiza za nivo ekspresije osteopontina i relativan rizik od smrtnog ishoda**

Varijable/ preživljavanje	HR	95,0% CI for HR		Sig.p.
		Donja	Gornja	
Osteopontin nizak/visok	<b>2,031</b>	1,066	3,871	<b>0,031*</b>
Osteopontin-kontinuirano	1,011	1,001	1,021	<b>0,001**</b>
FIGO stadijum	<b>3,346</b>	1,862	6,014	<b>0,000***</b>
Histološki gradus	1,148	0,933	1,414	0,192/ns
Rezidualni tumor	<b>1,505</b>	1,095	2,068	<b>0,012*</b>
Nuklearni gradus	1,131	0,904	1,415	0,282/ns
Starost-kontinuirano	1,034	1,013	1,055	<b>0,002**</b>



Dokazano je da je vrednost osteopontina kao atributivnog obeležja podeljena u vrednost ispod i iznad 240  $\mu\text{g/L}$  prediktor sa dva puta većom šansom za smrtni ishod (HR=2,031). Takodje, dokazano je da su vrednost osteopontina kao kontinuiranog obeležja (HR=1,011), postojanje rezidualnog tumora (HR=1,505) i starost bolesnica (HR=1,034) prediktori koji uvećavaju šansu za smrtni ishod u prikazanom Coxovom modelu.

Kaplan-Meier-ova kriva preživljavanja dokazuje statističku razliku u verovatnoći preživljavanja ispitanica sa OPN ispod 240  $\mu\text{g/L}$  i ispitanica sa OPN iznad 240  $\mu\text{g/L}$  (Logrank test=4,656,  $p<0,031$ ).



**Grafikon 26. Vreme preživljavanja u odnosu na vrednost osteopontina do i preko 240  $\mu\text{g/L}$**

#### 4.4.1. Cox-ova regresiona analiza za cut-off 760 $\mu\text{g/L}$

Druga veličina koja je bila od interesa za procenu preživljavanja u univarijantnoj Cox-ovoj regresionoj analizi je visina tumorskog markera OPN-a sa *cut off* vrednošću od 760  $\mu\text{g/L}$ , kao pouzdanim markerom progresivnog napretka maligniteta. Osim podele pacijentkinja na osnovu ove granične vrednosti na one sa niskim i visokim vrednostima OPN-a, u analizu su uključeni i odabrani parametri koji opisuju histološku dijagnozu, stadijum tumora, veličinu rezidualnog tumora, starost ispitanica.

Dokazano je da je osteopontin kao atributivna vrednost podeljen na koncentracije ispod i iznad 760 µg/L prediktor sa preko 6 puta većom verovatnoćom smrtnog ishoda kod ispitanica sa OPN iznad 760 µg/L (HR=6,222). Takodje je dokazano je da je vrednost osteopontina kao kontinuiranog obeležja uvećavaju šansu za smrtni ishod u prikazanom Coxovom modelu (HR=1,121), kao i viši FIGO stadijum (HR=9,616), veći rezidualni tumor (HR=1,680). Verovatnoća smrtnog ishoda kod ispitanica sa OPN iznad 760 µg/L kod FIGO III/IV je viša skoro 10 puta, u odnosu na niži FIGO i OPN ispod 760 µg/L.

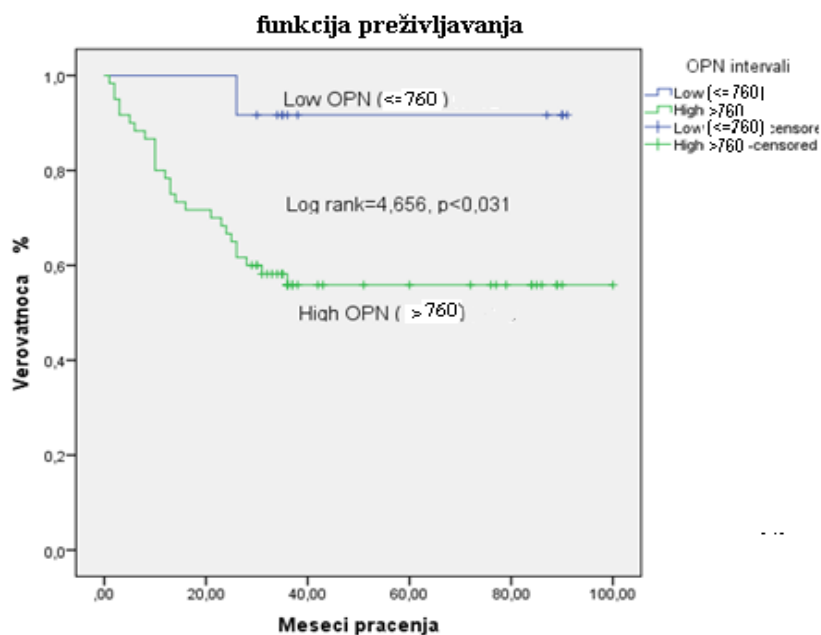
Za razliku od analiziranih vrednosti osteopontina do i preko 240 µg/L, u ovoj analizi dokazana je prediktorska snaga i histološkog i nuklearnog gradusa, odnosno viši histološki gradus (HR=1,881) i viši nuklearni gradus (HR=1,636) prediktori su koji uvećavaju šansu za smrtni ishod u prikazanom Coxovom modelu, a veća starost bolesnica prediktor je za smrtni ishod kod ispitanica sa OPN iznad 760 µg/L (HR=1,238) (Tabela 37).

**Tabela 37. Univarijantna Coxova regresiona analiza za nivo ekspresije osteopontina i relativan rizik od smrtnog ishoda**

Kliničkopatološke varijable/ukupno preživljavanje	HR	95,0% CI for HR		Sig.p.
		Donja	Gornja	
<b>Osteopontin Low/High</b>	<b>6,222</b>	1,469	26,363	<b>0,01**</b>
<b>Osteopontin-kontinuirano</b>	<b>1,121</b>	<b>1,001</b>	<b>1,321</b>	<b>0,001**</b>
<b>FIGO stadijum</b>	<b>9.616</b>	<b>2.792</b>	<b>33.121</b>	<b>0,0001***</b>
<b>Histološki gradus</b>	<b>1.881</b>	<b>0.928</b>	<b>2.755</b>	<b>0,001**</b>
<b>Rezidualni tumor</b>	<b>1.680</b>	<b>1.126</b>	<b>2.510</b>	<b>0,01*</b>
<b>Nuklearni gradus</b>	<b>1.636</b>	<b>1.016</b>	<b>2.633</b>	<b>0,011*</b>
<b>Starost-kontinuirano</b>	<b>1,238</b>	<b>1,011</b>	<b>1,527</b>	<b>0,019</b>

p<0,05 statistički značajna vrednost HR, hazard ratio; 95% interval pouzdanosti

Kaplan-Meier kriva preživljavanja dokazuje statističku razliku u verovatnoći preživljavanja ispitanica sa OPN ispod 760 µg/L i ispitanica sa OPN iznad 760 µg/L (Logrank test=28,752, p<0,0001).



**Grafikon 27. Verovatnoća preživljavanja u odnosu na vrednost osteopontin do i preko 760  $\mu\text{g/L}$**

#### **4.5. FAKTORSKA I DISKRIMINANTNA ANALIZA**

U cilju redukcije velikog broja podataka kojima se raspolaže u kliničkoj praksi u predikciji prirode adneksalnih tumora i njihovog grupisanja u manji broj podgrupa koje su odgovorne za najveći procenat varijabilnosti njihovih originalnih vrednosti

sprovedena je preliminarna faktorska analiza. U ovom radu primenjen je najjednostavniji oblik faktorske analize, analiza glavnih komponenti (*Principal components analysis*, PCA) kojom su izdvojene podgrupe promenljivih označene kao „faktori“ i koje predstavljaju osnovne dimenzije svih ispitivanih parametara. Faktori ili komponente su izdvojeni na osnovu ukupne varijacije u jednom setu podataka, čime su identifikovane tri grupe klastera: anamnestički, ultrazvučni i laboratorijski.

Od interesa istraživanja je bilo da se diskriminantnom analizom, u odnosu na prisustvo malignog oboljenja jajnika (prediktanta), odredi pripadnost ispitivanog skupa varijabli (prediktora) iz prethodno identifikovanih grupa.

Diskriminantna analiza je varijacija mnogostruke linearne regresije za predviđanje učestalosti ili neučestalosti nekog događaja. Na račun nenumeričke prirode prediktanta diskriminantna analiza se koristi kao vrsta regresione funkcije koja se obično izvodi na takav način da pozitivne vrednosti funkcije odgovaraju "učestalosti", a negativne vrednosti "neučestalosti." Vrednosti funkcije ispod i iznad praga vrednosti (obično je to nula) mogu se koristiti za predviđanje učestalosti događaja koji se analizira, što u našem slučaju predstavlja pojavu maligniteta ovarijuma.

U grupi anamnestičkih podataka čiji je prediktorski značaj ispitivan udruženo, nadjen je dobar diskriminantni faktor između grupe benignih i grupe malignih tumora. Korektno je klasifikovano 84,8% analizom obuhvaćenih slučajeva. U grupi benignih 86,7% a grupi malignih 83,3% slučajeva korektno je klasifikovano. (Tabela 38).

Kao što se vidi na Tabeli 38 još bolji rezultati klasifikacije postignuti su u grupama ultrazvučnih i laboratorijskih prediktora. 91,4-91,9% slučajeva korektno je klasifikovano na osnovu primenjenog diskriminantnog faktora između grupa.

**Tabela 38. Klasifikaciona tabela**

prediktori	grupe ovarijalnih tumora % korektno klasifikovanih slučajeva	
	benigni	maligni

anamneza (84,8%)	86,7	83,3
ultrazvuk (91,4%)	91,7	91,2
laboratorja(91,9%)	100,0	86,7

Prikaz pojedinačnih diskriminantnih funkcija dat je na Tabeli 39. Suma svih varijansi izvornih varijabli je ukupna varijansa. Deo ukupne varijanse predstavljen jednom glavnom komponentom je njegova svojstvena vrednost ili latentni koren (Eigenvalue).

Kanonička korelacija (CR) je multipla korelacija između prediktora i diskriminantne funkcije. Za svaku pojedinačnu funkciju varijansa ( $CR^2$ ) predstavlja ukupnu procenu modela. Interpretira se tako da model "objašnjava" od 50,26 % do 80,46% varijabilnosti grupnih varijabli kada je u pitanju prisustvo malignitet ovarijuma.

Wilks  $\lambda$  pokazuje signifikantnost diskriminantne funkcije, a prema rezultatima  $p$  vrednosti koja je manja od 0,05, vidi se da su sve tri funkcije sa Tabele 39 značajne. Ovaj parametar predstavlja proporciju "neobjašnjenog" varijabiliteta grupnih varijabli (nasuprot  $CR^2$ ). Odabir mogućih prediktora/modela i razlika među grupama benignih i malignih je potvrđena  $\chi^2$  testom.

**Tabela 39.** Značajnost diskriminantnih funkcija maligniteta po grupama prediktora

grupe prediktora	Eigenvalue	Wilks $\lambda$	$\chi^2$	CR	$CR^2$	p
anamneza	1,009	0,498	18,835	0,709	50,26	0,016
ultrazvuk	2,144	0,318	100,792	0,826	68,02	p<0,001
laboratorija	4,096	0,196	50,484	0,897	80,46	p<0,001

Eigenvalue-koren diskriminantne jednačine, CR – kanonička korelacija

Tabela 40 pokazuje korelaciju svake varijable iz grupe u odnosu na standardizovanu diskriminantnu funkciju. Pearsonovi koeficijenti su ustvari strukturni koeficijenti diskriminantnog udela. Stoga njegova veličina odražava udeo svake varijable. Generalno, slično faktorskoj analizi, granična vrednost od 0.30 predstavlja podelu između značajnih i manje značajnih varijabli. Tako da na Tabeli 40 rang varijabli

predstavlja njihov značaj u diskriminantnoj funkciji maligniteta ili benignosti ovarijalnog tumora za određenu grupu.

**Tabela 40. Strukturna matrica kanoničke diskriminantne funkcije – faktorska struktura**

anamneza		
varijabla	koeficijent*	rang
Simptomi	<b>0,512</b>	<b>I</b>
Starost	<b>0,493</b>	<b>II</b>
BMI	<b>0,485</b>	<b>III</b>
Porodica anamneza	<b>0,300</b>	<b>IV</b>
Menarha	0,299	
Menopauza	0,266	
Broj pobacaja	-0,122	
Broj porodjaja	-0,048	
ultrazvuk		
varijabla	koeficijent*	rang
Metastaza	<b>0,652</b>	<b>I</b>
Lokularnost	<b>-0,594</b>	<b>II</b>
Ascit	<b>-0,308</b>	<b>III</b>
Solidni	0,106	
Dijametar	0,100	
Lateralnost	0,040	
laboratorija		
varijabla	koeficijent*	rang
ROMA INDEX %	<b>0,664</b>	<b>I</b>
Sedimentacija	<b>0,576</b>	<b>II</b>
CRP	<b>0,358</b>	<b>III</b>
OPN	<b>0,355</b>	<b>IV</b>
HE4	<b>0,345</b>	<b>V</b>
CA125	<b>0,326</b>	<b>VI</b>
Trombociti	0,186	
CEA	0,114	

\*Pearsonov koeficijent svake varijable sa diskriminantnom funkcijom

Roma Index, sedimentacija eritrocita i CRP, kao i markeri (OPN, HE4 i CA125 sa sličnim udelom) su statistički značajni prediktori kod diferencijacije malignih tumora u odnosu na benigne tumore (Tabela 40).

Kao najsnažniji prediktori za maligne tumore u odnosu na sve ostale tumore izdvojili su se simptomi, starost pacijentkinja, zatim BMI i porodična anamneza iz anamnestičkih varijabli, a iz ultrazvučnih metastaze, lokularnost i ascit.

Izraženi simptomi, viša starosna dob, pozitivna porodična anamneza, viši BMI, metastaze, ascit, kao i multilokularnost su u našem ispitivanom uzorku karakteristike žena sa malignim tumorima. Odsustvo simptoma, negativna porodična anamneza, niži BMI, izostanak ascita i multilokularnosti tumora, karakteristike su žena sa benignim tumorima.

## **5. DISKUSIJA**

Kod velikog broja žena u nekom periodu života dijagnostikuje se cista na jajniku. Precizna dijagnostika je neophodna da bi se obezbedilo pravilno zbrinjavanje bolesnica. Nažalost, ni danas se sa sigurnošću ne može preoperativno utvrditi priroda adneksalnih tumora, a statistički podaci govore da od 10 operisanih pacijentkinja samo jedna ima karcinom jajnika (180). Time se značajno povećava morbiditet od ove bolesti. Pravilnom preoperativnom trijažom bolesnica bilo bi omogućeno da bolesnice sa ovarijalnim kancerima budu adekvatno zbrinute od strane ginekologa-onkologa, a bolesnice sa benignim bolestima lečene konzervativnim metodama, što donosi i medicinski i socijalni benefit. U svakodnevnoj kliničkoj praksi za dijagnostiku i lečenje ovarijalnih tumora danas se koristi nekoliko tumor markera CA125, HE4, OVA1, CEA, CA19,9, od kojih su neki odobreni od strane US FDA. CA125 je otkriven kao originalni marker za ovarijum [181], najbolje ispitan i pokazao se kao nezavistan prognostički faktor [182]. Ipak, ovaj marker je značajno povećan samo u 70%-90% slučajeva uznapredovalih stadijuma ovarijalnih karcinoma, u ranim stadijumima bolesti povišen je samo u 50% bolesnica, pa je zbog nedovoljne senzitivnosti ograničena njegova primena u ranoj dijagnostici [79]. Takođe, CA125 je povišen u mnogim benignim stanjima: ciroze jetre, endometrioze, peritonitisa i dr, što umanjuje njegovu specifičnost [80,81]. Značaj HE4 i OVA1-markerskog panela, zbog brojnih kontraverzi koje su o njima napisane, još uvek nije pouzdano utvrđen i ovi markeri se nalaze u fazi ispitivanja i evaluacije benefita koji imaju u predikciji ovarijalnog kancera. Zato, unazad dugi niz godina istraživači u svetu, ali i kod nas pokušavaju da pronadju senzitivne i specifične tumor markere koji bi pomogli u ranoj dijagnostici ovih veoma malignih tumora [183,184, 201]. Danas je identifikacija novog tumor markera koji će obezbediti dobru dijagnostičku tačnost i adekvatnu stratifikaciju bolesnica sa ovarijalnim cistama urgentna potreba i zadatak. Krucijalni napredak u razvoju biomarkera ostvaren je savremenim genomik, proteomik i drugim kompjuterskim tehnikama koje omogućavaju dobijanje velikog broja novih informacija o potencijalnim biomarkerima [185,186]. OPN je jedan od kandidata za novi marker ovarijalnog kancera dobijen ovim tehnikama [92].



Fiziološki OPN se sintetiše u velikom broju tkiva i ćelija: osteoklastima, osteoblastima, ćelijama dentina, renalnim ćelijama, aktiviranim T-limfocitima, „*natural killer*“ ćelijama, aktiviranim makrofagama, miocitima, vaskularnim endotelnim ćelijama, epitelnim ćelijama dojke, bubrega itd. Uključen je i u fiziološke [187] i u patološke procese [188]. Pored intracelularnog postoji i ekstracelularni OPN koji ima značajnu ulogu u zapaljenskim procesima, imunim reakcijama, remodeliranju koštanog skeleta i zarastanju rana. Sekretorni OPN je široko rasprostranjen u mnogim biološkim tečnostima, gde ima značajne uloge, u krvi, urinu, mleku, seminalnoj tečnosti i žuči. OPN je hidrofilan fosfoglikoprotein sa niskom izoelektričnom tačkom (3,5) i sastoji se od 42 serinska amino ostatka, 48 aspartatska i 27 glutaminskih aminoostataka koji čine gotovo polovinu od ukupnog broja (298 aminoostataka) u molekuli humanog OPN-a. Svoje brojne funkcije ovaj glikoprotein ostvaruje vezivanjem za specifične receptore na površini ćelije. Kao i drugi proteini ekstracelularnog matriksa (kolagen, fibronektin) OPN postoji i kao imobilizirana molekula ECM u mineralizovanim tkivima i kao citokin u telesnim tečnostima gde sadrži aktivnu RGD sekvencu, kojom se vezuje za integrinske i neintegrinske receptore [192]. Dokazana je interakcija OPN sa integrinima  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_5$ , kao i sa  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_9\beta_1$  i  $\alpha_8\beta_1$ . Vezivanje OPN za svaki od ovih integrina omogućava niz procesa u ćeliji i ćelijskih signalnih puteva. Najbolje je proučena interakcija između OPN-a i receptora  $\alpha_v\beta_3$  u osteoklastima, glatkim mišićnim ćelijama i tumorskim ćelijama [193], koja omogućava migraciju i adheziju ćelija. Mnogi istraživači su opisivali ulogu OPN-a u tumorigenezi i progresiji tumora različitog porekla [189-191].

### **5.1. Osteopontin marker tumora ovarijuma**

Prve podatke o OPN-u kao markeru transformacije epitelnih ćelija opisali su Senger i saradnici 1987 godine [194]. Brown i saradnici [195] su dokazali bitno povećan nivo mRNK osteopontina u svih 14 vrsta tumorskog tkiva koje su ispitali: kod tumora creva, jetre, dojke, želuca, materice i tiroidee u poređenju sa zdravim tkivima. Nivo ekspresije proteina OPN-a u krvi takođe je povezan sa nastankom tumora, njegovom invazijom i metastazama kancera [196]. Kim i saradnici [175] su prvi opisali osobine OPN-a kao dijagnostičkog biomarkera u detekciji ovarijalnih kancera: pojačana ekspresija DNK OPN-gena dokazana microarray tehnikom u obolelom tkivu jajnika,

RT-PCR tehnikom povišen nivo mRNK OPN-gena u pojedinačnim ćelijskim kulturama kancera jajnika, histohemijskim bojenjem dokazali su pojačanu koncentraciju OPN u tkivu kancera jajnika i potvrdili povezanost nivoa OPN-a u plazmi kod 144 bolesnice sa ovarijalnim kancerom. Prednosti OPN-a kao tumor markera se ogledaju i u tome što se osim u ekstracelularnom matriksu tkiva ovaj protein nalazi i u krvi, tj plazmi, gde vrednosti mogu da budu od 4 do 10 puta veće, u zavisnosti od stadijuma i vrste bolesti, i čije određivanje pruža korisne informacije o bolesnicama. Naši rezultati su takođe potvrdili da postoji statistički značajna razlika u prosečnim (srednjim) vrednostima koncentracije OPN-a (prosek $\pm$ SD) između grupe bolesnica sa ovarijalnim kancerom (1664,26 $\pm$ 900,00  $\mu$ gr/L) i drugih grupa: bolesnica sa benignim ovarijalnim tumorima (285,18 $\pm$ 165,07  $\mu$ gr/L) ( $p < 0,0001$ ) i zdravih ispitanica (145,84 $\pm$ 163,06  $\mu$ gr/L) ( $p < 0,0001$ ), (Tabela 17 i Grafikon 11). Najniže vrednosti OPN-a dobijene su u grupi zdravih ispitanica (K) gde je medijana vrednosti koncentracije OPN iznosila 70  $\mu$ gr/L, u grupi bolesnica sa benignim bolestima jajnika (BT) medijana koncentracije OPN je bila 250  $\mu$ gr/L, dok su najveće koncentracije bile u grupi bolesnica sa ovarijalnim kancerima (MT) sa medijanom koncentracije od 900  $\mu$ gr/L. Ovi rezultati potvrđuju sposobnost preoperativno izmerenog OPN-a da pruži korisne kliničke informacije u predikciji i lečenju bolesnica sa ovarijalnim kancerom. Do ovakvog zaključka su došli i drugi autori [175, 177, 197] koji su takođe, određivali koncentracije OPN ELISA tehnikom. Test ELISA koji je u ovom radu korišćen sadrži dve vrste antitela mišija monoklonalna i zečija poliklonalna antitela, čime je obezbeđeno kvantitativno, brzo i reproducibilno merenje OPN-a iz plazme.

Koncentracije OPN-a su u našoj studiji bile u korelaciji sa stadijumima tumorske bolesti. Da bi odredili da li postoji razlika u koncentraciji OPN-a kod pre i postmenopauzalnih bolesnica ispitivali smo koncentracije OPN-a kod bolesnica sa benignim bolestima i bolesnica u početnim i uznapredovalim stadijumu malignih bolesti u periodima pre i post-menopauze. Naši rezultati pokazuju da je trend rasta osteopontina kod pacijentkinja koje su u menopauzi značajno brži sa malignim pogoršanjem bolesti nego kod žena u premenopauzi. Na osnovu rezultata dobijenih upoređenjem prosečnih koncentracija OPN-a kod žena u menopauzi u odnosu na premenopauzu, ustanovljeno je da kod bolesnica sa benignim tumorima, kao i u ranoj fazi razvoja maligniteta nema značajne razlike. U uznapredovalo formi razvoja maligniteta ustanovljena je značajno

veća koncentracija OPN-a kod žena u menopauzi u odnosu na bolesnice koje su u premenopauzi, a u istom stadijumu tumorske bolesti. Shodno ovom zaključku, kao i na osnovu rezultata ROC – analize za dobijanje graničnih vrednosti OPN-a u odnosu na menopauzu, potvrđeno je da nema signifikantne razlike. Zbog toga su u nastavku studije granične vrednosti OPN-a određivane u ukupnom uzorku žena, bez obzira na menopauzu. Osetljivost OPN-a je manja kod premenopauzalnih bolesnica, ali se prema epidemiološkim podacima bolest u ovoj dobi znatno ređe javlja [7]. U radovima koje su objavili Bautista i saradnici [197], posle određivanja bazalnog nivoa OPN kod zdravih ispitanica, nivoi pre- i menopauzalnih ispitanica se nisu razlikovali ( $p>0,16$ ) i ostali su stabilni tokom 4 nedelje i nezavisni od hormonskih promena u menstrualnom ciklusu.

### **5.2. OPN u različitim histopatološkim tipovima tumora jajnika**

Kod bolesnica sa ovarijalnim tumorima ispitivali smo nivoe OPN-a u zavisnosti od histološkog tipa kancera. Nismo dokazali signifikantnu razliku u koncentraciji OPN-a između različitih histoloških tipova u grupi bolesnica sa benignim bolestima ( $p=0,621$ ). U grupi bolesnica sa benignim ovarijalnim cistama u našoj ispitivanoj studiji najčešće zastupljeno benigno oboljenje kod bolesnica u premenopauzi bilo je endometriotična cista jajnika (46,7%), zatim dermoidne ciste jajnika i cistadenofibromi. Koncentracije OPN-a kod ovih pacijantkinja se nisu značajno razlikovale od drugih benignih cisti jajnika ( $p>0,01$ ). Takođe, u našoj studiji nije bilo signifikantne razlike u preoperativnim koncentracijama OPN-a kod različitih histoloških tipova ovarijalnih kancera ( $p=0,081$ ). Nakae i saradnici [177] su takođe došli do zaključka da povišen nivo OPN ne zavisi od histopatološkog tipa kancera jajnika. Što ukazuje na činjenicu da svi oblici histopatoloških tipova ovarijalnog kancera pokazuju povišen nivo plazmatskog OPN-a. Najviše vrednosti nivoa OPN bile su zastupljene kod kombinovanih karcinoma jajnika (*adenocarcinoma mixtum*), dok su najniže vrednosti imali mucinozni (*adenocarcinoma mucinosum*) ovarijalni kanceri bez statistički značajne razlike. Ipak ono što je bitno istaći i našta naši rezultati ukazuju je da se neki oblici ovarijalnog karcinoma mogli detektovati samo OPN-om, ne i sa CA125. Mucinozni adenokarcinomi koji su u našoj studiji ispitivani imali su koncentracije markera CA125 ispod cut-off vrednosti za ovaj marker, dok su koncentracije OPN-a bile više ( $Me=468,5 \mu\text{gr/L}$ ) u odnosu na definisane

cut-off vrednosti (320  $\mu\text{g/L}$ ). Iako su prosečne vrednosti koncentracija OPN-a mucinoznih ovarijalnih karcinoma najniže u grupi malignih neoplazmi ovarijuma, one su ipak veće od graničnih vrednosti između benignih i malignih bolesti jajnika. Mada pouzdan zaključak o ovoj prednosti OPN-a treba potvrditi u većim studijama sa velikim brojem ispitanica iz različitih centara, naši dobijeni rezultati upućuju na ovaj zaključak i na potrebu daljeg ispitivanja u ovom smeru. Nakae i saradnici [177] su takođe, u svojoj studiji izneli slična zapažanja. U opsežnom istraživanju koje su 2011. godine objavili Yip i saradnici [34] od ispitivanih 259 kandidata za marker ovarijuma u serumu 500 pacijanata, 175 parametara je pokazalo značajnu razliku u nivoima između benignih i malignih uzoraka. Devet najinformativnijih markera imali su različitu diskriminantnu snagu u različitim histološkim subtipovima ovarijalnog kancera, dok je kod mucinoznog tipa samo CA72-4 imao značaj u diferencijaciji pacijentkinja, pa se nameće potreba za novim markerima ili panelima markera u detekciji ovog tipa karcinoma.

### 5.3. OPN marker progresivnog napretka bolesti

Pored toga, dokazali smo da nivo OPN u plazmi korelira sa stadijumom tumorske bolesti. U plazmi bolesnica koje su obuhvaćene ovom studijom postoji statistički značajna razlika u nivoima osteopontina između bolesnica koje su u ranim, početnim stadijumima bolesti (FIGO I-II) i onih koje su u uznapredovalim stadijumima bolesti (FIGO III-IV)  $p < 0,01$ . Sa našim rezultatima slažu se Coppola i saradnici [198]. Oni su u svojim radovima potvrdili da pored povišenog nivoa OPN-a u tumorskom tkivu postoji i korelacija između nivoa OPN-a i stadijuma tumorske bolesti. Nakae i saradnici [177], kao i Kim i saradnici [175] su precizirali da se svaki FIGO stadijum može okarakterisati sa odgovarajućom koncentracijom OPN-a,  $p < 0,05$ . Nasuprot ovome Tiniakos i saradnici [199] su mišljenja da ni histološki tip ni klinički stadijum nisu u korelaciji sa koncentracijom OPN-a. Rezultati dobijeni u našem radu ukazuju na činjenicu da se na osnovu nivoa koncentracije preoperativnog OPN-a, bolesnice mogu svrstati u dve grupe: prvu grupu čine bolesnice kod kojih je bolest u ranoj fazi (FIGO I/II) kada su mogućnosti lečenja bolje, i u drugu grupu spadaju bolesnice kod kojih je bolest uznapredovala (FIGO III/IV) i kada je lečenje neizvesnije. Koristeći *cut-off* vrednost OPN-a od 760  $\mu\text{g/L}$ , optimalne veličine senzitivnosti i specifičnosti su 78,8% i

79,2%, (Tabela 27). Kada je potvrđena uloga OPN-a u inhibiciji apoptoze postalo je jasno da progresija bolesti i pojava metastaza korelira sa povišenim nivoima OPN-a.

### 5.4. Određivanje dijagnostičkog i kliničkog značaja OPN testa

Dijagnostički značaj proteina OPN u predikciji ovarijalnih karcinoma je ispitan ROC (Receiver Operating Characteristic) analizom i određene su karakteristike testa: dijagnostička efikasnost testa, njegova senzitivnost, specifičnost i prediktivna vrednost testa. Površina dobijena ispod ROC krive za bolesnice sa malignim tumorima u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanica imala je vrednost od 94,6% (AUC = 0,946±0,019, za p<0,0001). Na osnovu veličine dobijene površine ispod krive (AUC = 0,946) saznajemo da će ispitanice sa malignim tumorima imati 94,6% veće šanse nego zdrave ispitanice da imaju povišene vrednosti OPN (Grafikon 16). Visoka senzitivnost u primeni ovog dijagnostičkog testa sa određenom graničnom vrednošću OPN-a u predikciji malignog tumora jajnika obezbeđuje minimalan broj lažno negativnih rezultata (5,4%). Izborom granične vrednosti OPN-a od 240µg/L i sa ovako dobijenim svojstvima testa obezbeđena je mogućnost blagovremenog zbrinjavanja bolesnica. Za ovu veličinu senzitivnosti pokazatelj specifičnosti testa je adekvatna mera od 78% (Tabela 24). Kako su senzitivnost i specifičnost karakteristike testa zasnovane na utvrđenoj graničnoj vrednosti markera, prediktivne veličine su uslovljene prevalencom bolesti u delu populacije koja se testira. Za kliničara, bitna je procena da u okviru uzorka ljudi koji imaju test-pozitivne rezultate stvarno postoji bolest. Obrnuto je u slučajevima negativnih rezultata testa. Pozitivna prediktivna vrednost (82,5) i negativna prediktivna vrednost (88,6) za utvrđenu graničnu vrednost OPN-a od 240µg/L u pojavi malignih tumora jajnika su zadovoljavajuće vrednosti.

U ovom radu smo ispitali performanse dijagnostičkog testa OPN-a u detekciji prisustva epitelnih neoplazmi ovarijuma. ROC analiza je primenjena na određivanje značajne granične vrednosti u grupi bolesnica sa benignom formom bolesti u odnosu na zdrave ispitanice. I u ovom slučaju prioritetan selekcionni kriterijum za dijagnostičku korisnost primene testa sa određenom graničnom vrednošću bila je veličina površine ispod ROC krive. Upoređenjem bolesnica sa benignim tumorima u odnosu na kontrolnu grupu zdravih ispitanica dobijena je površina ispod ROC krive od 77,8% (AUC=0,778±0,048,

za  $p < 0,0001$ ) (*Grafikon 17*). Za optimalnu *cut off* vrednost od 110,00  $\mu\text{g/L}$  određena je senzitivnost od 88 % i specifičnost od 62%. Ako se uporede senzitivnost kod malignih tumora i kod benignih tumora u odnosu na vrednosti kod zdravih ispitanica, može se zaključiti da je senzitivnost za *cut off* vrednosti od 110,00  $\mu\text{g/L}$  neznatno manja kod benignih u odnosu na senzitivnost za maligne tumore (91,2% prema 88,0%). Niža specifičnost za odgovarajuće *cut off* vrednosti je u grupi benignih u odnosu na maligne prema kontrolnoj grupi (78% prema 62,2%). (*Tabela 25*). Niža specifičnost dobijena primenom OPN testa kao markera za prisustvo benigne neoplazije ovarijuma, znači mogućnost da čak 37,8% rezultata bude lažno pozitivno. U slučaju benigne neoplazije koja neposredno ne ugrožava život ili znatno ne umanjuje kvalitet života, prisustvo većeg broja lažno-pozitivnih rezultata, prihvatljiva je alternativa za veću senzitivnost.

Osnovna veličina na osnovu koje se upoređuje dijagnostička korisnost testova je veličina površine ispod ROC krive, to se na osnovu signifikantnosti oba testa može zaključiti da njihova primena obezbeđuje pouzdanu klasifikaciju i diferencijaciju bolesnih od zdravih ispitanica.

Jedan od najvažnijih kriterijuma u ispitivanju performansi tumor markera je njegova sposobnost da odvoji bolesnice sa benignim adneksalnim masama od bolesnica sa malignim karcinomima. Postojanje markera koji bi sa velikom osetljivošću i specifičnošću mogao da klasifikuje bolesnice sa dijagnostifikovanim ovarijalnim cistama na one kojima je hitno potrebna operacija i bolesnice čije lečenje je moguće konzervativnim metodama, predstavljalo bi veliki napredak u diferencijalnoj dijagnostici tumora jajnika. ROC analizom vrednosti OPN-a između benignih i malignih bolesnica u našem ispitivanom uzorku dobijena je površina ispod krive 87% (AUC=0,871,  $p < 0,0001$ ), (*Grafikon 18*). *Cut-off* vrednost OPN-a od 340  $\mu\text{g/L}$  imala je osetljivost od 80,7% i specifičnost od 76% u diferencijalnoj dijagnostici benignih i malignih cisti jajnika. Kako se iz Tabela 26, može videti iznad granične vrednosti OPN-a od 340  $\mu\text{g/L}$  sa senzitivnošću od 80,7%, može se tvrditi da je u pitanju maligna forma tumora epitela ovarijuma. Prethodno utvrđene granične vrednosti OPN-a za pojavu benigne epitelne neoplazije ovarijuma od 110  $\mu\text{g/L}$  i 240  $\mu\text{g/L}$  za pojavu maligniteta ovog oboljenja znače da će značajna većina bolesnica sa benignim ovarijalnim tumorom imati koncentracije OPN-a u ovim granicama. Kako je, na osnovu specifičnosti dijagnostičkog testa za malignitet ovarijuma, moguća pojava od 22% lažno

pozitivnih rezultata, to je velika verovatnoća da bi se oni mogli naći u koncentracijama OPN-a od 240-340  $\mu\text{g/L}$ .

Ovi rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima mnogih autora [175, 177, 201].

U ispitivanoj grupi bolesnica sa malignim neoplazmama jajnika (MT) u ovom istraživanju nalazile su bolesnice sa dijagnozom invazivni epitelni ovarijalni karcinomi (EOC) i *border-line* tumori ili tumori niskog malignog potencijala (BLT-LMP). BLT kojih je u našem ispitivanom uzorku bilo 7, bili su seroznog i mucinoznog histološkog tipa i svi su pripadali FIGO I stadijumu bolesti. Testiranjem razlika u koncentraciji OPN-a kod ova dva tipa malignih kancera nije dokazana statistički značajna razlika (KW=0,006, p=0,937). Medijana vrednost koncentracije OPN-a kod BLT je bila 480  $\mu\text{g/L}$ , dok je kod EOC koji su FIGO I stadijum bolesti bila 450  $\mu\text{g/L}$  bez statistički značajne razlike. Nasuprot našim rezultatima Tiniakos i saradnici [199], koji su određivali ekspresiju OPN imunohistohemijski, *Western blott* tehnikom i *in situ* hibridizacijom došli su do zaključka da je ekspresija OPN veća kod *border line* tumora sa niskim malignim potencijalom nego kod benignih tumora jajnika, ali je takođe veća i od koncentracije koja se nalazi kod invazivnih karcinoma. Autor ovog rad ukazuje na činjenicu da ukoliko se potvrdi da je ekspresija OPN-a veća kod BL-tumora nego kod tumora visokog stepena malignosti dobijamo intrigantan novi dokaz o ulozi OPN-a kod LMP tumora jajnika. Ovo mišljenje pokušali su da objasne Liapis i saradnici [200] dokazavši da karcinomi niskog malignog potencijala imaju manju ekspresiju  $\alpha_v\beta_3$  integrina za koje se vezuje OPN u poređenju sa invazivnim karcinomima, otuda dolazi do izostanka malignog efekta OPN-a iako je on prisutan u visokoj koncentraciji. Naši rezultati pokazuju da je nivo OPN-a u plazmi povišen i kod kancera niskog i visokog stepena malignosti.

### **5.5. Poređenje OPN sa drugim markerima u predikciji ovarijalnog kancera**

Osim evaluacije markera OPN-a u predikciji ovarijalnih kancera i stratifikaciji bolesnica, uporedili smo njegove karakteristike sa dosada najčešće korišćenim i najbolje ispitanim tumor markerima CA125 i HE4. Sa ciljem da se unapredi specifičnost

pojedinačnih markera u praksi se često primenjuju i algoritmi. Algoritam rizika za dobijanje ovarijalnog kancera (ROCA, *Risk of Ovarian Cancer Algorithm*) koji se izračunava iz serijskih merenja CA125 i interpretira kao bazična vrednost u odnosu na koju se posmatraju novoizmerene koncentracije CA125, je primenjen u dvema velikim studijama [55, 56] koje će pokazati (rezultati se očekuju 2015.god) njegovu tačnost u inicijalnoj dijagnostici kao i uticaj na smanjenje mortaliteta od OC. Indeks za dobijanje maligniteta (RMI, *Risk of Malignancy Index*) je takođe dizajniran sa namerom da popravi specifičnost detekcije ovarijalnih kancera i predstavlja kombinaciju vrednosti markera CA125, ultrazvučnog skora i menopauzalnog statusa. Međutim, mnogi autori se slažu sa konstatacijom da primena ovih algoritama nije značajno unapredila performanse samog markera Ca125 [110]. Danas se u kliničkoj praksi najčešće koristi algoritam ROMA (*Risk of Ovarian Malignancy Algorithm*) koji predstavlja kombinaciju izmerenih vrednosti CA125 i HE4. Zato smo performanse OPN-a poredili i sa ovim algoritmom za dobijanje ovarijalnog maligniteta. Naši podaci svedoče o najvećoj dijagnostičkoj korisnosti upotrebe ovog indeksa kada se utvrđuje priroda postojećeg tumora epitela ovarijuma. Poređenjem dijagnostičke efikasnosti OPN-a sa tumor markerima Ca125 i HE4 je dokazano, da bez obzira na utvrđene minimalne razlike u veličinama površina ispod ROC krive, te razlike, na usvojenom nivou pouzdanosti, nisu značajne (*Tabela 28, Grafikon 20*). Znači da se primena bilo koga od nabrojanih markera u dijagnostičkoj proceduri može smatrati jednako pouzdanom. Kada se uporedi dijagnostički potencijal ova tri markera i ROMA indeksa u diferencijalnoj dijagnostici ranih i kasnih stadijuma ovarijalnih karcinoma, naši podaci potvrđuju da su ROMA indeks (AUC=0,992) i HE4 (AUC=0,955) značajno boljih performansi ( $p<0,008$ ;  $p<0,026$ ) od CA125(AUC=0,818) i OPN(AUC=0,857), (*Tabela 29*). Osim veličine površine ispod ROC krive to je izraženo i najvećom senzitivnošću i 91,7% i specifičnošću 90,9% ROMA indeksa u odnosu na ostale parametre.

Optimalna *cut-off* vrednost je definisana tako da omogućava najbolju senzitivnost i specifičnost za svaki biomarker. Kako ni jedan biomarker na pokazuje istovremeno visoku specifičnost i visoku osetljivost pri odluci o *cut-off* vrednostima postoji kompromis. Ako se poveća specifičnost to dovodi da naglog smanjenja osetljivosti markera. Kako je prevalenca OC vrlo niska (12,6 na 100.000 žena) u generalnoj



populaciji žena potreban je marker dobrih karakteristika, sa senzitivnošću od 75% i specifičnošću od 99,6% da bi imao PPV od 10% u detekciji ranih stadijuma bolesti [40]. Sva dosadašnja ispitivanja [34] pokazuju da ni jedan samostalan biomarker nema tako dobre karakteristike i da je primena panela biomarkera neophodna u cilju poboljšanja osobina potrebnih za kliničku upotrebu markera. Neki autori su poboljšanje osetljivosti i specifičnosti OPN-a pokušali da reše udruživanjem ovog markera sa CA125 kako u detekciji OC tako i u praćenju toka bolesti i pojavi recidiva [210]. Hwang i saradnici [176] su predložili panel od pet markera (OPN, CA125, leptin, prolactin i IGF-II), koji bi se određivali u preoperativno uzetim uzorcima seruma bolesnica sa adneksalnim masama.

Komercijalni test *OvaSure* konstruisan od strane Yale i saradnika predstavljao je kombinaciju: leptina, prolaktina, osteopontina, IGF-II, CA125 i MFI, i prema podacima autora imao specifičnost od 99,4% za osetljivost od 95,3%. Međutim, ovaj test nije zaživeo u praksi i nije došlo do njegove veće primene [34].

Pored multivarijantnih panela koji sadrže OPN, opisani su i brojni drugi paneli markera za koje su autori smatrali da će dati značajan benefit u detekciji ovarijalnih kancera: *OvPlex* (Ca125, CRP, serumski amiloid, IL-6 i IL-8) [205], *OVA1* (Ca125, transtiretin, apolipoprotein A1, transferin i  $\beta$ 2-mikroglobulin) [206], *OvaCheck* (CA125 i još sedam markera) [207] kao i mnogi drugi. Ipak ni jedan od predloženih panela nije našao primenu u rutinskom radu kliničara pri dijagnostici ovarijalnih kancera. Razlozi su bili u dugom i neefikasnom određivanju ovako velikog broja markera, u nemogućnosti reprodukcije objavljenih dobrih rezultata, kao i u materijalnoj podršci.

Brojne kontraverze su iznete kada je u pitanju boljitak u dijagnostici koji se dobija primenom algoritama. Da li je i koliko ROMA indeks bolji od RMI u ranoj dijagnostici kancera jajnika kao i u diferencijalnoj dijagnostici malignih i benignih tumora ostalo je da se ispita u daljem uporednom određivanju ovih algoritama na velikim uzorcima ispitanica. Takođe su podeljena mišljenja o tome da li je i koliko HE4 bolji od CA125 [104-108]. Na osnovu svega iznetog sigurno je da su potrebna nova unapređenja u dijagnostici i diferenciranju pelvičnih masa.

Mi smo udruživanjem OPN-a sa CA125 dobili marker sa značajno boljim dijagnostičkim performansama u predikciji ovarijalnih kancera, dok kombinacijom sva tri ispitivana markera OPN+CA125+HE4 nije dobijen veći boljitak u dijagnostičkom potencijalu AUC=0,945. Poznato je da udruživanjem markera, koji nisu u jakoj

međusobnoj korelaciji postoje veće šanse za individualnim doprinosom svakog pojedinačnog markera. Naše tri markera su Pearson-ovom korelacijom (*Tabele 32, 33, 34*) pokazali jaku povezanost zbog čega udruživanjem nismo dobili željeni kvalitet.

### **5.6. Prognostički značaj OPN-a**

Mnogi noviji dokazi podržavaju OPN kao potencijalni prognostički faktor kod humanog kancera. Međutim, uloga OPN-a u razvoju tumora je kompleksna i multifunkcionalna. Javljanje OPN u tumorima različitog porekla ukazuje da OPN igra ključnu ulogu u formiranju tumorskih formacija i progresiji tumora. Njegove funkcije su uključene u tumorigenezu i nezavistan rast transformisanih ćelija, stimulaciju migracije, invazije ćelija, vezivanje i aktivacija metaloproteinaza, sprečavanje apoptoze, ubrzanje metastatske aktivnosti, kao i u stimulaciju proliferacije kancerskih ćelija i progresiju tumora [202-204].

U ovoj studiji dokazana je povišena koncentracija OPN-a u krvi kod bolesnica sa epitelnim ovarijalnim kancerom i prognostički značaj ovog markera. Ovaj porast koncentracije je u jakoj asocijaciji sa kasnim stadijumima bolesti, seroznim histološkim tipom, suboptimalnom hirurškom intervencijom i postojanjem rezidualnog tumora. Kod bolesnica koje su u kasnim stadijumima bolesti, OPN predstavlja nezavistan prognostički indikator koji ukazuje na lošu prognozu bolesti. Cox-ovom univarijantnom regresionom analizom u ovoj studiji je pokazano da viši nivoi OPN i FIGO stadijumi bolesti imaju najjači prediktorski uticaj i ukazuju na lošu prognozu bolesti (*Tabela 36,37; Grafikon 26,27*). Ovarijalni kancer je najsmrtonosniji ginekološki malignitet [6]. Jedan od razloga je činjenica da u ranim fazama bolest „teče tiho“ i asimptomatski. U vreme postavljanja dijagnoze najveći broj bolesnica je već u odmaklim stadijumima bolesti [40]. Ono što karakteriše ovu bolest su česte ponovljene forme bolesti. Napredak u preživljavanju bolesnica je postignut u poslednjih desetak godina sa boljim terapijskim lekovima, ali smrtnost od ove bolesti je ostala nepromenjena. Manifestacije i simptomi bolesti se razlikuju od slučaja do slučaja. Biomarker koji bi mogao da predvidi pojavu bolesti pre pojave kliničkih simptoma mogao bi da pomogne

u postavljanju individualne terapije. U kombinaciji sa drugim prognostičkim indikatorima, ovaj novi biomarker bi doprineo subklasifikaciji pacijentkinja i boljoj individualnoj terapiji [208, 209].

### **5.7. Faktorska analiza i diskriminantna analiza kliničkih parametara koji se koriste u predikciji ovarijalnih tumora**

Jedan od razloga velike smrtnosti bolesnica od ovarijalnog kancera je i nedostatak precizne dijagnostičke metode koja uključuje visokoosetljive i specifične laboratorijske markere u ovoj bolesti. Faktori rizika za dobijanje malignih tumora jajnika su: reproduktivni faktori (infertilitet, kasne trudnoće), kasna menarha, rana menopauza, supstitucionna terapija estrogenom kontinuirano u period od 10 godina, pozitivna porodična istorija (5-10% ovarijalnih kancera su nasledni), genetske faktore rizika (supresor gene (BRCA1/2) i onkogene), kao i način života [16-20]. Ipak, u ovoj studiji nije dokazana statistički značajna razlika u broju porođaja i pobačaja žena između grupa. Ipak, u menopauzu su ušle značajno ranije žene sa malignim tumorom u odnosu na zdrave žene (*Tabela 5*). Kasna menarha kao jedan od faktora rizika je u rezultatima dobijenim u ovom radu potvrđen. Bolesnice sa dijagnozom malignih tumora su menarhu dobile u prosečno najvećoj starosti ( $13,7 \pm 1,76$ ), statistički značajno u odnosu na ostale ispitanice ( $F=4,082$ ,  $p=0,019$ ) (*Tabela 5*). Rezultati ove studije su pokazali da ispitanice sa pozitivnom porodičnom anamnezom imaju šest puta veću šansu da obole od karcinoma jajnika, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima. Povećana telesna težina je u pozitivnoj korelaciji sa kancerima ovarijuma. Visok BMI može da bude faktor rizika pogotovo kod premenopauzalnih žena. Rezultati ove studije potvrđuju pomenute literaturne podatke.

Veličina tumora nije uticala na stepen malignosti ovarijalnog tumora, najveći broj malignih tumora je imao tumore dijametra 5-10cm. Multi lokularnost i pojava ascita su bile karakteristike malignih tumora jajnika (*Tabela 7*).

U cilju redukcije velikog broja podataka kojima se raspolaže u kliničkoj praksi u predikciji prirode adneksalnih tumora i njihovog grupisanja u manji broj podgrupa koje su odgovorne za najveći procenat varijabilnosti njihovih originalnih vrednosti sprovedena je preliminarna faktorska analiza. U ovom radu primenjen je najjednostavniji oblik faktorske analize, analiza glavnih komponenti (PCA) kojom su izdvojene podgrupe promenljivih označene kao „faktori“ i koje predstavljaju osnovne dimenzije svih ispitivanih parametara. Faktori ili komponente su izdvojeni na osnovu ukupne varijacije u jednom setu podataka, čime su identifikovane tri grupe klastera: anamnestički, ultrazvučni i laboratorijski. Dokazano je da su sva tri faktora dobri diskriminantni faktori između benignih i malignih tumora jajnika.

Diskriminantna analiza je primenjena sa ciljem da se u odnosu na prisustvo malignog oboljenja jajnika (prediktanta), odredi pripadnost ispitivanog skupa varijabli (prediktora) iz prethodno identifikovanih grupa. U grupi anamnestičkih podataka čiji je prediktorski značaj ispitivan udruženo, nadjen je dobar diskriminantni faktor između grupe benignih i grupe malignih tumora. Korektno je klasifikovano 84,8% analizom obuhvaćenih slučajeva. U grupi benignih 86,7% a grupi malignih 83,3% slučajeva korektno je klasifikovano. Naši rezultati ukazuju da su bolji rezultati klasifikacije postignuti su u grupama ultrazvučnih i laboratorijskih prediktora. 91,4-91,9% slučajeva korektno je klasifikovano na osnovu primenjenog diskriminantnog faktora između grupa (*Tabela 38*). Sa ovim rezultatima se slažu i drugi autori [186].

U zaključku ovih istraživanja se može reći da ispitivani OPN ima dobar dijagnostički potencijal u predikciji ovarijalnih kancera, kao i u klasifikaciji benignih i malignih ovarijalnih tumora tj. u pravilnoj trijaži bolesnica. Takođe je potvrđen njegov prognostički značaj i dokazano je da kod bolesnica koje su u kasnim stadijumima bolesti, OPN predstavlja nezavistan prognostički indikator koji ukazuje na lošu prognozu bolesti. Ova studija takođe upućuje na mogućnost uključivanja OPN u markerske panele koji bi bili prihvaćeni u kliničkoj praksi i čija primena je neophodna u eri personalizovene medicine, kada se postojeće terapije širokog spektra menjaju individualnim pristupom ka ciljnim molekulama. Izbor novih terapijskih sredstava je povezan sa novim saznanjima o markerima kancera jajnika.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu svega izloženog može se zaključiti sledeće:

1. U ispitivanoj studiji pokazana je statistički značajna razlika u koncentraciji glikoproteina OPN-a u plazmi između sve tri ispitivane grupe. U grupi bolesnica sa karcinomima jajnika medijana koncentracije OPN u plazmi je iznosila 900  $\mu\text{g/L}$  (95%CI 1145,7-2182,83  $\mu\text{g/L}$ ), kod bolesnica sa benignim bolestima jajnika vrednost medijane je bila 250  $\mu\text{g/L}$  (95%CI 238,27-332,09  $\mu\text{g/L}$ ), dok je u grupi zdravih ispitanica bila 70  $\mu\text{g/L}$  (95%CI 99,5-192,2  $\mu\text{g/L}$ ). Statistički najviše vrednosti su bile u grupi bolesnica sa malignim tumorima.
2. Nije dokazana statistički značajna razlika u vrednostima osteopontina u grupi bolesnica sa benignim tumorima jajnika u odnosu na različite histopatološke tipove tumora. Kod bolesnica sa malignim tumorima postoji značajna korelacija između vrednosti osteopontina u odnosu na histološku dijagnozu. Više vrednosti osteopontina značajno su češće u korelaciji sa seroznim, kombinovanim i „*clear cell*“ karcinomima.
3. Više vrednosti OPN-a su u korelaciji sa višim stadijumima tumorske bolesti, postojanjem rezidualnih tumora i suboptimalnim hirurškim intervencijama. Dokazana je statistički značajna razlika u nivoima osteopontina u ranim i kasnim *FIGO* stadijumima tumorske bolesti: *FIGO I/II* vs *FIGO III/IV*. Takođe, trend kretanja nivoa OPN-a od benignih bolesti ka početnom stadijumu (*FIGO I*) malignih bolesti bio je pozitivan, a sa pogoršanjem bolesti taj trend rasta ima značajan korelacioni koeficijent. Ovo je karakteristično kako za pre tako i za postmenopauzalne bolesnice.
4. Granična vrednost OPN-a od 240 $\mu\text{g/L}$  (91,2% senzitivnost i 78% specifičnost) određena je ROC analizom, kao pouzdani dijagnostički kriterijum za predikciju maligniteta ovarijalnog tumora tako da se iznad ove granične vrednosti može naći signifikantan broj obolelih od malignog tumora ovarijuma.(AUC=94,6%).

5. Uz dijagnostičku korisnost primene markera OPN-a od oko 78% moguće je, uz graničnu vrednost koncentracije od 110,00  $\mu\text{g/L}$  (senzitivnost od 88 % i specifičnost od 62%), detektovati slučajeve benigne neoplazije ovarijuma, iznad ove koncentracije.
6. Granična vrednost OPN-a od 340  $\mu\text{g/L}$  može poslužiti kao dodatni kriterijum u diferencijalnoj dijagnostici benigne i rane faze maligne forme bolesti, jer se sa verovatnoćom od preko 80% iznad ove koncentracije nalaze bolesnice kod kojih je benigna prešla u malignu formu ovarijalnog tumora.
7. Granična vrednost OPN-a od 760  $\mu\text{g/L}$  uz optimalne veličine senzitivnosti od 78,8% i specifičnosti od 79,2%, predstavlja predikcionu vrednost dijagnostičkog testa od oko 86% verovatnoće za diferencijalnu dijagnostiku rane faze (FIGO I/II) u odnosu na kasnu fazu (FIGO III/IV) maligne bolesti epitela ovarijuma.
8. Koncentracije tumor markera CA 125, HE4 kao i ROMA indeksa statistički značajno se razlikuju između grupe sa malignim tumorima u odnosu na grupu sa benignim tumorima jajnika i kontrolnu grupu ispitanica, osim kod Ca19.9 i CEA, gde među grupama nije dokazana značajnija razlika.
9. U slučajevima benignih tumora ovarijuma ne postoji značajna povezanost koncentracija OPN-a sa drugim markerima, kao ni sa ROMA indeksom, dok je kod zdravih ispitanica značajna povezanost dokazana između osteopontina i CA125.
10. Osteopontin je u visoko signifikantnoj pozitivnoj korelaciji sa ostalim upoređivanim markerima CA125 i HE4, kao i sa ROMA indeksom kod postojanja malignog tumora ovarijuma.
11. Upoređenjem površina pod ROC krivom, kao pokazatelja korisnosti dijagnostičkih markera, između OPN-a i ostalih markera: Ca125, HE4, kao i ROMA indexa, zaključeno je da nema statistički značajne razlike u ovim veličinama, bilo da se dijagnostikuje pojava maligniteta ili progresija maligne bolesti ovarijuma iz rane u kasnu fazu. Primena bilo koga od upoređivanih markera u dijagnostičkoj proceduri može se smatrati jednako pouzdanom.

12. Udruživanje OPN sa postojećim markerima u panel markera OPN+Ca125 ili OPN+HE4 može da popravi njihovu senzitivnost, specifičnost i predikcioni potencijal. Najbolji efekat se dobija kombinovanjem sva tri tumor markera OPN+CA125+HE4 (površina ispod ROC krive je 94,8%, specifičnost 92%, i osetljivost 83,2%).
13. Univarijantnom Cox-ovom regresionom analizom najbolju prediktivnu vrednost na ishod bolesti imaju, osim povišene koncentracije OPN>240 µg/L i FIGO stadijum bolesti. Dokazano je da je vrednost osteopontina kao atributivnog obeležja podeljena u vrednost ispod i iznad 240 µg/L prediktor sa dva puta većom šansom za smrtni ishod (HR=2,031).
14. Kada se u Cox-ovom regresionom modelu za *cut-off* vrednost uzme koncentracija OPN-a od 760 µg/L prediktorska snaga OPN-a se značajno povećava i bolesnice sa OPN-om višim od 760 µg/L imaju preko 6 puta veću verovatnoću smrtnog ishoda. U ovom modelu pored FIGO stadijuma bolesti koji ima najjaču prediktorsku snagu, prediktori koji uvećavaju šansu za smrtni ishod su i rezidualni tumor, viši histološki gradus, viši nuklearni gradus, kao i veća starost ispitanica.
15. Kaplan-Meier-ova kriva preživljavanja dokazuje statistički značajnu razliku u verovatnoći preživljavanja ispitanica sa OPN ispod 240 µg/L i iznad 240 µg/L (Logrank test=4,656, p<0,031), a naročito OPN-a ispod i iznad 760 µg/L (Logrank test=28,752, p<0,0001).
16. Veliki broj podataka kojima se raspolaže u kliničkoj praksi predikcije prirode adneksalnih masa grupisan je faktorskom analizom glavnih komponenti u tri klastera identifikovana kao anamnestički, ultrazvučni i laboratorijski. Diskriminantnom kanoničkom analizom pokazano je da su najsnažniji prediktori kod diferencijacije malignih od benignih tumora: starost pacijentkinja, porodična anamneza, simptomi, i BMI od anamnestičkih varijabli, a od ultrazvučnih prisustvo metastaza, ascita i lokularnost tumora. Roma indeks i markeri (OPN, HE4 i CA125 sa sličnim udelom), kao i sedimentacija eritrocita i CRP od laboratorijskih.

## 7. LITERATURA

1. Young RH, Clement PB, Scully RE, Sternberg SS. The Ovary. Diagnostic Surgical Pathology, Vol. 3. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999;2307–2394.
2. Scully RE. World Health Organization International Histological Classification of Tumours. New York: Springer, 1999.
3. Prat J: Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. Virchows Arch 2012;460(3): 237-49.
4. Cramer DW: The epidemiology of endometrial and ovarian cancer. Hematol Oncol Clin North Am 2012;26(1):1-12.
5. SEER survival monografi. Chapter 16: Carol L Kosary. Cancer of the ovary.
6. American Cancer Society.: Cancer Facts and Figures 2013. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2013.
7. World Health Organization International Agency for Research on Cancer, Globocan 2008 (IARC) Section of Cancer Information (9/8/2013)7. Ovarian cancer National Alliance, SEER .National Cancer Institute: Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program.
8. Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. Semin Surg Oncol. 2000;19(1):3-10
9. Hannibal CG, Cortes R, Engholm G, Kjaer SK: Survival of ovarian cancer patients in Denmark: Excess mortality risk analysis of five-year relative survival in the period 1978-2002. Acta Obstet Gynecol Scand 2008;1:9.
10. Dodge JE, Covens AL, Lacchetti C et al. Preoperative identification of a suspicious adnexal mass: A systematic review and meta-analysis. Gynecologic Oncology 2012; 126:157-166.
11. Institut za javno zdravlje Srbije “Dr Milan Jovanović-Batut”. Registar za rak; 2010



12. Riman T, Persson I, Nilsson S: Hormonal aspects of epithelial ovarian cancer: review of epidemiological evidence. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998;49(6): 695-707.
13. Cramer DW, Welch WR: Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1983;71(4):717-21.
14. Risch HA: Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90(23):1774-86.
15. Ness RB, Cottreau C: Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(17):1459-67.
16. E. Banks, "The epidemiology of ovarian cancer," in *Ovarian Cancer: Methods and Protocols*, J. M. S. Bartlett, Ed., Humana Press, Totowa, NJ, USA, 2000.
17. Dor J, Lerner-Geva L, Rabinovici J, et al.: Cancer incidence in a cohort of infertile women who underwent in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2002;77(2): 324-7.
18. Moorman PG, Schildkraut JM, Calingaert B, et al.: Menopausal hormones and risk of ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193(1):76-82.
19. Whittemore AS, Balise RR, Pharoah PD, et al.: Oral contraceptive use and ovarian cancer risk among carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Br J Cancer* 2004; 91(11):1911-5.
20. Gronwald J, Byrski T, Huzarski T, et al.: Influence of selected lifestyle factors on breast and ovarian cancer risk in BRCA1 mutation carriers from Poland. *Breast Cancer Res Treat* 2006;95(2):105-9.
21. Hankinson SE, Hunter DJ, Colditz GA, et al.: Tubal ligation, hysterectomy, and risk of ovarian cancer. A prospective study. *JAMA* 270 (23): 2813-8, 1993.
22. Rebbeck TR, Lynch HT, Neuhausen SL, et al.: Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *N Engl J Med* 346 (21): 1616-22, 2002.
23. Klaren HM, van't Veer LJ, van Leeuwen FE, et al.: Potential for bias in studies on efficacy of prophylactic surgery for BRCA1 and BRCA2 mutation. *J Natl Cancer Inst* 95 (13): 941-7, 2003.

24. Schorge JO, Muto MG, Lee SJ, et al. BRCA1-related papillary serous carcinoma of the peritoneum has a unique molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 2000;60:1361–1364.
25. Lancaster JM, Dressman HK, Clarke JP, et al. Identification of genes associated with ovarian cancer metastasis using microarray expression analysis. *Int J Gynecol Cancer.* 2006;16:1733–1745.
26. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr. Rev.* 2001;22: 255–288.
27. Prat J. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch* 2012;460(3): 237-49.
28. Carlson KJ, Skates SJ, Singer DE. Screening for ovarian cancer. *Ann Intern Med.* 1994;121:124–32.
29. Ford D, Easton DF, Bishop DT, et al. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet* 1994;343:692-95.
30. Lynch, H.T.; Casey, M.J.; Snyder, C.L.; Bewtra, C.; Lynch, J.F.; Butts, M.; Godwin, A.K. Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. *Mol. Oncol.* 2009;3:97–137.
31. Shih I-M, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis-a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 2004;164:1511-1518.
32. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. Department of obstetrics, gynecology, Women s health, Louisville. 2008, KY, United States.

33. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, et al. eds. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2012.
34. Yip P, Chen T-H, Seshaiyah P, Stephen LL, Michael-Ballard KL, et al. Comprehensive Serum Profiling for the Discovery of Epithelial Ovarian Cancer Biomarkers. PLoS ONE 2011;6:12.
35. Smith R.A, Brooks D, Cokkinides V, Saslow D.and Brawley OW.(2013), Cancer screening in the United States. CA: A Cancer Journal for Clinicians,2013; 63:87-105.
36. Goff BA, Muntz HG. Screening and early diagnosis of ovarian cancer. Women s health in primary care. 2005;8(6):262-268.
37. Low EL, Waller J, Menon U, Jones A, Reid F, Simon AE. Ovarian cancer symptom awareness and anticipated time to help-seeking for symptoms among UK women. J Fam Plann Reprod Health Care. 2013;39 (3):163-71.
38. Lim AW, Mesher D, Gentry-Maharaj A, Balogun N, Jacobs I, Menon U, Sasieni P.Predictive value of symptoms for ovarian cancer: comparison of symptoms reported by questionnaire, interview, and general practitioner notes.J Natl Cancer Inst. 2012;104(2):114-24.
39. Permuth-Wey J, Boulware D, Valkov N, et al. Sampling strategies for tissue microarrays to evaluate biomarkers in ovarian cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Pr. 2009;18(1):28–34.
40. Jacobs IJ, Menon U. Progress and challenges in screening for early detection of ovarian cancer. Mol Cell Proteomics 2004,3:355-366.
41. Hensley ML. A Step Forward for Two-Step Screening forOvarian Cancer. 2010 American Society of Clinical Oncology,

42. Calster BV, Vickers AJ, Pencina MJ, Baker SG, Timmerman D, Steyerberg EW. Evaluation of Markers and Risk Prediction Models: Overview of Relationships between NRI and Decision-Analytic Measures. *Med Decis Making* published online 11 January 2013
43. Sassone AM, Timor-Tritsch IE, Artner a, Westhoff C, Warren WB. Transvaginal sonographic characterization of ovarian disease: evaluation of a new scoring system to predict ovarian malignancy. *Obstet Gynecol* 1991;78(1):70-6.
44. Lerner JP, Timor-Tritsch IE, Federman A, Abramovich G. Transvaginal ultrasonographic characterization of ovarian masses with an improved, weighted scoring system. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170(1):81-5.
45. DePriest PD, Shenson D, Fried A, Hunter JE, Andrews SJ, Gallion H. et al. A morphology index based on sonographic findings in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1993;51(1):7-11.
46. Ferrazzi E, Zanetta G, Dordoni D, Berlanda N, Mezzopane R, Lissoni AA. Transvaginal ultrasonographic characterization of ovarian masses; comparison of five scoring systems in a multicenter study. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1997;10(3):192-7.
47. Engelen MJA, Bongaerts AHH, Sluiter WJ, de Haan HH, Bogchelman DH, Tenvergert EM, et al. Distinguishing benign and malignant pelvic masses: the value of different diagnostic methods in everyday clinical practice. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008;136(1):94-101.
48. Timmerman D, Verrelst H, Bourne TH, de Moor B, Collins WP, Vergote I, et al. Artificial neural network models for the preoperative discrimination between malignant and benign adnexal masses. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1999;13(1):17-25.

49. Kaijser J, Bourne T, Valentin L, Sayasneh A, Van Holsbeke C, Vergote I, Testa AC, Franchi D, Van Calster B, and Timmerman D. Improving strategies for diagnosing ovarian cancer: a summary of the International ovarian tumor analysis (IOTA) studies. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013;41:9-20.
50. Timmerman D, Testa AC, Bourne T, Ferrazzi E, Ameye L, et al. Logistic regression model to distinguish between the benign and malignant adnexal mass before surgery: a multicenter study by the International Ovarian Tumor Analysis Group. *J Clin Oncol* 2005;23:8794–8801.
51. Van Nagell JR, DePriest PD, Ueland FR et al.: “Ovarian cancer screening with annual transvaginal sonography: findings of 25,000 women screened” *Cancer* 2007;109(9):1887–1896.
52. Sato S, Yokoyama Y, Sakamoto T, Futagami M, and Saito Y, “Usefulness of mass screening for ovarian carcinoma using transvaginal ultrasonography,” *Cancer* 2000;89(3):582–588.
53. Fishman DA, Cohen L, Blank SV, et al. The role of ultrasound evaluation in the detection of early-stage epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;192:1214-1221.
54. Kobayashi H, Yamada Y, Sado T, Sakata M, Yoshida S, Kawaguchi R, Kanayama S, Shigetomi H, Haruta S, Tsuji Y, Ueda S, Kitanaka. A randomized study of screening for ovarian cancer: a multicenter study in Japan. *Int J Gynecol Cancer.* 2008;18(3):414-20.
55. Smith AR, Brooks D, Cokkinides V, Saslow D, Brawley OW. Cancer screening in the United States, 2013 *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 63: 87–105.
56. Menon U, Gentry-Maharaj A, Hallett R, et al. Sensitivity and specificity of multimodal and ultrasound screening for ovarian cancer, and stage distribution of

- detected cancers: results of the prevalence screen of the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS). *Lancet Oncol* 2009;10(4):327-40.
57. Dodge JE, Covens AL, Lacchetti C, Elit LM, Le T, Devries-Aboud M, Fung-Ke-Fung M; Gynecology Cancer Disease Site Group. Preoperative identification of a suspicious adnexal mass: a systematic review and meta-analysis. *Gynecologic Oncology* Volume 2012;126(1):157–166.
58. Menon U. Ovarian cancer: challenges of early detection. *Nature clinical practice Oncology*.2007;4,9:498-499.
59. US Preventive Services Task Force. Screening for Ovarian Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Reaffirmation Recommendation Statement [published online ahead of print September 11, 2012]. *Ann Intern Med*.
60. National Institutes of Health. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. Ovarian Cancer: Screening Treatment, and Followup. NIH Consensus Statement 1994. *Bethesda, MD*: National Institutes of Health; 1994: 1-30.
61. American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Gynecologic Practice. The role of the generalist obstetrician-gynecologist in the early detection of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2002;87(3)237-9.
62. Myers E, Bastian L, Havrilesky L, Kulasingam S, Terplan M, Cline K, et al- Management of adnexal mass. Rockville (MD): Agency for healthcare research and quality. Evidence Report/Technology Assesment No:130.AHRQ.41. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz Textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. Fourth edition. Chapter 23: Chan DW, Booth RA, Diamandis EP. Tumor markers; 745-786.
63. Phillip G. Febbo, MD; Marc Ladanyi, MD; Kenneth D. Aldape, MD; Angelo M. De Marzo, MD, PhD; M. Elizabeth Hammond, MD; Daniel F. Hayes, MD; A.

- John Iafrate, MD, PhD; R. Kate Kelley, MD; Guido Marcucci, MD; Shuji Ogino, MD, PhD, MS; William Pao, MD, PhD; Dennis C. Sgroi, MD; NCCN Task Force Report: Evaluating the Clinical Utility of Tumor Markers in Oncology. *JNCCN* 2011;9(5):S1–S32.
64. Skates SJ, Jacobs IJ, Knapp RC. Tumor markers in screening for ovarian cancer. *Ovarian Cancer: Methods and Protocols*, J. M. S. Bartlett, Ed. Humana Press, Totowa, NJ, USA, 2000;61-73.
  65. Abstracts of the first scientific workshop of the Early Detection Research Network September 2000. *Dis Markers*. 2001;17(1):3-38
  66. Bast RC Jr, Badgwell D, Lu Z, Marquez R, Rosen D, Liu J, Baggerly KA, Atkinson EN, Skates S, Zhang Z, Lokshin A, Menon U, Jacobs I, Lu K: New tumor markers: CA125 and beyond. *Int J Gynecol Cancer* 2005;15(3):274-81.
  67. Meyer T, Rustin GJ: Role of tumour markers in monitoring epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 2000, 82:1535-1538.
  68. Rai AJ, Zhang Z, Rosenzweig J, Shih I-M, Pham T, Fung E, Sokoll LJ, Chan DW. Proteomic approaches to tumor marker discovery: Identification of biomarkers for ovarian cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2002;26:1581-26.
  69. Zhang Z, Bast RC, Yu Y, Li J, Sokoll LJ, Rai AJ, et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early state ovarian cancer. *Cancer Res* 2004; 64:5882-90.
  70. Welsh JB, Sapinoso LM, Kern SG, et al. Large-scale delineation of secreted protein biomarkers over-expressed in cancer tissue and serum. *PNAS USA* 2003; 100:3410-15.
  71. Welsh JB, Zarrinkar PP, Sapinoso LM, et al. Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of EOC. *PNAS USA* 2001;98:1176-81.
  72. Hogdall E: Cancer antigen 125 and prognosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008, 20:4-8.
  73. Bast RC Jr, Feeney M, Lazarus H, Nadler LM, Colvin RB, Knapp RC. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest* 1981; 68:1331-1337.

74. Bast RC Jr, Klug TL, St John E, Jenison E, Niloff JM, Lazarus H, Berkowitz RS, Leavitt T, Griffiths CT, Parker L, Zurawski VR Jr, Knapp RC. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 1983; 309:883-887.
75. Nustad K, Bast RC Jr, Brien TJ, Nilsson O, Seguin P, Suresh MR, Saga T, Nozawa S, Borner OP, de Bruijn HW, Nap M, Vitali A, Gadnell M, Clark J. Specificity and affinity of 26 monoclonal antibodies against the CA 125 antigen: first report from the ISOBM TD-1 workshop. *International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. Tumour Biol* 1996;17:196-219.
76. O'Brien TJ, Raymond LM, Bannon GA, et al. New monoclonal antibodies identify the glycoprotein carrying the CA125 epitope. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;165:1857–1864.
77. Sturgeon CM et al. National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for the use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers. *Clin Chem* 2008;54:e11-e79.
78. Markman M. Optimizing primary chemotherapy in ovarian cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2003;17:957-68.
79. Bast RC. Status of tumor markers in ovarian cancer screening. *J Clin Oncol.* 2003;21:200–205.
80. Pauler DK, Menon U, McIntosh M, Symecko HL, Skates SJ, Jacobs IJ. Factors influencing serum CA125II levels in healthy postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:489-93.
81. Fleisher M, Dinistrian A, Sturgeon C, Lamerz R, Witliff J. Practice guidelines and recommendations for use of tumor markers in the clinic. In: Diamandis EP, Fritsche H, LiljaH, Chan DW, Schwartz M, eds. *Tumor markers. Physiology, pathobiology, technology, and clinical applications.* Washington, DC: AACC Press, 2002:33-63.
82. Jacobs I, Bast RC, Jr. The CA125 tumour-associated antigen: a review of the literature. *Hum Reprod* 1989;4:1-12.



83. Bast RC, Jr, Siegal FP, Runowicz C, et al. Elevation of serum CA125 prior to diagnosis of an epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 1985;22:115–120.
84. Einhorn N, Sjøvall K, Knapp RC, et al. Prospective evaluation of serum CA125 levels for early detection of ovarian cancer. *Obstet Gynecol.* 1992;80:14–18.
85. Jacobs IJ, Skates S, Davies AP, et al. Risk of diagnosis of ovarian cancer after raised serum CA125 concentration: a prospective cohort study. *Br Med J.* 1996;313:1355–1358
86. Bonfrer J, Duffy M, Radke M, Segurado O, Torre G, Van Dalen A, et al. Tumor markers in gynecological cancers: EGTM recommendations. *Anticancer Res* 1999;19:2807-2810.
87. American College of Physicians. Clinical Guideline: Screening for Ovarian Cancer: Recommendations and Rationale. *Ann Intern Med* 994;121:141-142.
88. European Society for Medical Oncology. Minimal clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of ovarian cancer. 2002.
89. Ovarian Cancer. NCCN clinical practice guidelines in oncology v1.2005.
90. NIH consensus conference. Ovarian cancer. Screening, treatment, and follow-up. NIH consensus development conference. *JAMA* 1995;273:491-97.
91. Skates SJ, Xu FJ, Yu YH, Sjøvall K, Einhorn N, Chang Y, et al. Toward an optimal algorithm for ovarian cancer screening with longitudinal tumor markers. *Cancer* 1995;76:2004-10.
92. Sturgeon CM, Duffy MJ, Stenman UH, Lilja H, Chan DW, Babaian R, Bast RC et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines for Use of Tumor Markers in Testicular, Prostate, Colorectal, Breast, and Ovarian Cancers. *Clinical Chemistry* 2008;54(12):e55-e64.
93. Zhang Z, Bast RC, Jr., Yu Y, Li J, Sokoll LJ, Rai AJ, et al. Three Biomarkers Identified from Serum Proteomic Analysis for the Detection of Early Stage Ovarian Cancer. *Cancer Res* 2004;64:5882-5890.
94. Jacobs IJ, Skates SJ, MacDonald N, et al. Screening for ovarian cancer: a pilot randomised controlled trial. *Lancet.* 1999;353:1207–1210.

95. Menon U, Skates SJ, Lewis S, et al. Prospective study using the risk of ovarian cancer algorithm to screen for ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:7919–7926.
96. Skates S, Feng-ji X, Yin-Hua Y, Sjøvall K, Einhorn N, Chang YC, Basta R, Knapp RC. Toward an optimal algorithm for ovarian cancer screening with longitudinal tumor markers. *Cancer* 1995;76 (10).
97. Meyer T, Rustin GJ. Role of tumour markers in monitoring epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 2000;82:1535-8.
98. Rustin GJ, Quinn M, Thigpen T, Du Bois A, Pujade-Lauraine E, Jakobsen A, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors (ovarian cancer). *J Natl Cancer Inst* 2004;96:487-488.
99. Rustin GJS. Can We Now Agree to Use the Same Definition to Measure Response According to CA-125? *J Clin Oncol* 2004;22:4035-4036.
100. Gronlund B, Hogdall C, Hilden J, Engelholm SA, Hogdall EVS, Hansen HH. Should CA-125 Response Criteria Be Preferred to Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) for Prognostication During Second-Line Chemotherapy of Ovarian Carcinoma? *J Clin Oncol* 2004;22:4051-4058.
101. Cooper BC, Sood AK, Davis CS, Ritchie JM, Sorosky JI, Anderson B, et al. Preoperative CA125 Levels: An Independent Prognostic Factor for Epithelial Ovarian Cancer. *Obstet Gynecol* 2002;100:59-64.
102. Gadducci A, Cosio S, Fanucchi A, Negri S, Cristofani R, Genazzani AR. The predictive and prognostic value of serum CA125 half-life during paclitaxel/platinum-based chemotherapy in patients with advanced ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology* 2004;93:131-136.
103. Rustin GJ. The clinical value of tumour markers in the management of ovarian cancer. *Ann Clin Biochem* 1996;33:284-289.
104. Heliström I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Research* 2003;63(13):3695–3700.
104. Montagnana M, Danese E, Giudici S, et al. HE4 in ovarian cancer: from discovery to clinical application. *Advances in Clinical Chemistry* 2011;55:1–20.

105. Chang X, Ye X, Dong L. et al. Human epididymis protein 4 (HE4) as a serum tumor biomarker in patients with ovarian carcinoma. *International Journal of Gynecological Cancer* 2011;21(5):852–858.
106. Li J, Dowdy S, Tipton T. et al. HE4 as a biomarker for ovarian and endometrial cancer management. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2009;9(6):555–566.
107. Moore RG, Brown AK, Miller AC et al. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecologic Oncology* 2008;108(2):402–408.
108. Escudero JM, Auge JM, Filella X, Torne A, Pahisa J and Molina R. Comparison of serum human epididymis protein 4 with cancer antigen 125 as a tumor marker in patients with malignant and nonmalignant diseases. *Clinical Chemistry* 2011; 57(11):1534–1544.
109. Molina R, Escudero JM, Augé JM et al. HE4 a novel tumour marker for ovarian cancer: comparison with CA 125 and ROMA algorithm in patients with gynaecological diseases. *Tumour Biology* 2011;32(6):1087–1095..
110. Moore RG, Miller MC, Disilvestro P et al. Evaluation of the diagnostic accuracy of the risk of ovarian malignancy algorithm in women with a pelvic mass. *Obstetrics and Gynecology* 2011;118(2): 280–288.
111. Kawasaki K, Weiss KM. Evolutionary genetics of vertebrate tissue mineralization: the origin and evolution of the secretory calcium-binding phosphoprotein family. *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular Development and Evolution* 2006;306:295–316.
112. Kawasaki K, Buchanan AV, Weiss KM. Gene duplication and the evolution of vertebrate skeletal mineralization. *Cells, Tissues, Organs* 2007;186:7–24.
113. Kawasaki K. The SCPP gene family and the complexity of hard tissues invertebrates. *Cells, Tissues, Organs* 2011;194: 108–112.
114. Rowe PS. The chicken or the egg: PHEX, FGF23 and SIBLINGs unscrambled. *Cell Biochemistry and Function* 2012.
115. Rowe PS, Kumagai Y, Gutierrez G, Garrett IR, Blacher R, Rosen D, Cundy J, Navvab S, Chen D, Drezner MK et al. 2004 MEPE has the properties of an osteoblastic phosphatonin and minhibin. *Bone* 2004;34:303–319.

116. Fisher LW, Fedarko NS. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connective Tissue Research* 2003;44(1):33–40.
117. Bellahcene A, Castronovo V, Ogbureke KU, Fisher LW & Fedarko NS. Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. *Nature Reviews. Cancer* 2008;8:212–226.
118. Boskey AL, Chiang P, Fermanis A, Brown J, Taleb H, David V, Rowe PS. MEPE's diverse effects on mineralization. *Calcified Tissue International* 2009;86:42–46.
119. Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001;280:460–465.
120. David V, Martin AC, Hedge AM, Drezner MK, Rowe PS. ASARM peptides: PHEX-dependent, independent regulation of serum phosphate. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 2010; 300: F783–F791.
121. Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 2000;11:279–303.
122. Crosby AH, Edwards, SJ, Murray, JC, Dixon, M.J. Genomic organization of the human osteopontin gene: exclusion of the locus from a causative role in the pathogenesis of dentinogenesis imperfecta type II. *Genomics* 1995; 27(1):155–160.
123. Denhardt DT and Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB Journal*.1993;7:1475–1482.
124. Ashizawa N, Graf K, Do YS, et al. Osteopontin is produced by rat cardiac fibroblasts and mediates A(II)-induced DNA synthesis and collagen gel contraction. *J.Clin. Invest.*1996; 98 (10): 2218–27.
125. Sodek J, Chen J, Nagata T, Kasugai S, Todescan R Jr, Li IW, Kim RH. Regulation of osteopontin expression in osteoblasts. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1995;760:223–241.
126. Dodds RA, Connor JR, James IE, Rykaczewski EL, Appelbaum E, Dul E, Gowen M. Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption

- surfaces: an in vitro and ex vivo study of remodeling bone. *Journal of Bone and Mineral Research* 1995;10:1666–1680.
127. Zohar R, Lee W, Arora P, Cheifetz S, McCulloch C, Sodek J. Singlecell analysis of intracellular osteopontin in osteogenic cultures of fetal rat.
128. Murry CE, Giachelli CM, Schwartz SM, Vracko R. Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *Am J Pathol.*1994; 145(6):1450–62.
129. Ikeda T, Shirasawa T, Esaki Y, Yoshiki S, Hirokawa K. Osteopontin mRNA is expressed by smooth muscle-derived foam cells in human atherosclerotic lesions of the aorta. *J Clin Invest*1993;92(6):2814–20.
130. Uaesoontrachoon K, Yoo HJ, Tudor E, Pike RN, Mackie EJ, Pagel CN. Osteopontin and skeletal muscle myoblasts: Association with muscle regeneration and regulation of myoblast function in vitro. *Int J Biochem. Cell Biol.* 2008;40(10):2303–14.
131. Jono S, Peinado C, Giachelli CM. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *Journal of Biological Chemistry.*2000;275:20197–20203.
132. Prince CW, Butler WT. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the biosynthesis of osteopontin, a bone-derived cell attachment protein, in clonal osteoblast-like osteosarcoma cells. *Coll Relat Res.* 1987;7 (1):305–313.
133. Yucha C, Guthrie D. Renal homeostasis of calcium. *Nephrol Nurs J.* 2003;30(1):755–764.
134. Guo H, Cai CQ, Schroeder RA, Kuo PC. Osteopontin is a negative feedback regulator of nitric oxide synthesis in murine macrophages. *J Immunol* 2001;166 (1):1079–1086.
135. Sodhi CP, Phadke SA, Battle D, Sahai A. Hypoxia and high glucose cause exaggerated mesangial cell growth and collagen synthesis: role of osteopontin. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;280 (1):667–674.
136. Mirza M, Shaughnessy E, Hurley JK, Vanpatten KA, Pestano GA, He B, Weber GF. Osteopontin-c is a selective marker of breast cancer. *Int J Cancer* 2008;122(1):889–897.

137. Wang KX, Denhardt DT. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008;19(5-6):333–45.
138. Banerjee A, Apte UM, Smith R, Ramaiah SK. Higher neutrophil infiltration mediated by osteopontin is a likely contributing factor to the increased susceptibility of females to alcoholic liver disease. *J Pathol.* 2006; 208(4):473–85.
139. Ohshima S, Kobayashi H, Yamaguchi N, Nishioka K, Umeshita-Sasai M, Mima T, Nomura S, Kon S, Inobe M, Uede T, Saeki Y. Expression of osteopontin at sites of bone erosion in a murine experimental arthritis model of collagen-induced arthritis: possible involvement of osteopontin in bone destruction in arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002;46(4):1094–101.
140. Burdo TH, Wood MR, Fox HS. Osteopontin prevents monocyte recirculation and apoptosis. *J Leukoc Biol* 2007;81(6):1504–11.
141. Nagasaka A, Matsue H, Matsushima H, et al. Osteopontin is produced by mast cells and affects IgE-mediated degranulation and migration of mast cells. *Eur J Immunol.* 2008; 38(2):489–99.
142. Da Silva AP, Pollett A, Rittling SR, Denhardt DT, Sodek J, Zohar R. Exacerbated tissue destruction in DSS-induced acute colitis of OPN-null mice is associated with downregulation of TNF- $\alpha$  expression and non-programmed cell death. *J Cell Physiol.* 2006;208(3):629–39.
143. Anderson HC. Matrix vesicles and calcification. *Current Rheumatology Reports* 2003;5:222–226.
144. Boskey AL, Maresca M, Ullrich W, Doty SB, Butler WT, Prince CW. Osteopontin–hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone and Mineral* 1993;22:147–159.
145. Boskey AL, Christensen B, Taleb H, Sorensen ES. Post-translational modification of osteopontin: effects on in vitro hydroxyapatite formation and growth. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2012;419:333–338.

146. Addison WN, Masica DL, Gray JJ, McKee MD. Phosphorylation-dependent inhibition of mineralization by osteopontin ASARM peptides is regulated by PHEX cleavage. *J. Bone Miner. Res.* 2010;25(4):695–705.
147. Kurzbach D, Platzer G, Schwarz TC, Henen MA, Konrat R, Hinderberger D. Cooperative Unfolding of Compact Conformations of the Intrinsically Disordered Protein Osteopontin. *Biochemistry* 2013;52(31):5167–75.
148. Hunter GK, O'Young J, Grohe B, Karttunen M, Goldberg HA .The flexible polyelectrolyte hypothesis of protein-biomineral interaction.*Langmuir* 2010;26(24):18639–46.
149. McKee MD, Nanci A .Postembedding colloidal-gold immunocytochemistry of noncollagenous extracellular matrix proteins in mineralized tissues. *Microsc Res. Tech.* 1995;31(1):44–62.
150. O'Young J, Chirico S, Al Tarhuni N, Grohe B, Karttunen M, Goldberg HA, Hunter GK . Phosphorylation of osteopontin peptides mediates adsorption to and incorporation into calcium oxalate crystals. *Cells Tissues Organs* 2009;189(1-4):51–5.
151. Furger K.A. et al. Beta(3) integrin expression increases breast carcinoma cell responsiveness to the malignancy-enhancing effects of osteopontin. *Mol Cancer Res* 2003,1:810–819.
152. Yokosaki, Y. et al. The integrin alpha 9 beta 1 binds to a novel recognition sequence SVVYGLR in the thrombin cleaved amino terminal fragment of osteopontin. *J Biol Chem* 1999,274:36328–36334.
153. Barry S et al. (2000) Analysis of the alpha 4 beta 1 integrin osteopontin interaction. *Exp. Cell Res.* 2000,258: 342–351.
154. Katagiri YU et al. CD44 variants but not CD44s cooperate with beta 1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer Res.* 1999,59:219–226.
155. Kim HR et al. Hyaluronan facilitates invasion of colon carcinoma cells in vitro via interaction with CD44. *Cancer Res.*2004, 64:4569–4576.

156. Wang H.S. et al. CD44 cross-linking induces integrin-mediated adhesion and transendothelial migration in breast cancer cell line by up-regulation of LFA-1 and VLA-4. *Exp. Cell Res.* 2005;304:116–126.
157. Jha P, Farooq A, Rao D L, Agarwal N, Buckshee K. *Int J Gynaecol Obstet.* 1991;36:33–38.
158. Hayes DF, Bast RC, Desch CE, Fritsche H et al. Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88:1456:66.
159. Kyriakides TR, Bornstein P. Matricellular proteins as modulators of wound healing and the foreign body response. *Thromb Haemost.* 2003;90(6):986–992.
160. Cho HJ, Kim HS. Osteopontin: A multifunctional protein at the crossroads of inflammation, atherosclerosis, and vascular calcification. *Curr Atheroscler Rep.* 2009;11(3):206–213.
161. Tuck AB, Chambers AF, Allan AL. Osteopontin overexpression in breast cancer: knowledge gained and possible implications for clinical management. *J Cell Biochem.* 2007;102(4):859–868.
162. Wai PY, Kuo PC. Osteopontin: Regulation in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2008;27(1):103–118.
163. Allan AL, George R, Vantyghem SA, Lee MW, Hodgson NC, Engel CJ, Holliday RL, Girvan DP, Scott LA, Postenka CO, Al-Katib W, Stitt LW, Uede T, Chambers AF, Tuck AB. Role of the integrin-binding protein osteopontin in lymphatic metastasis of breast cancer. *Am J Pathol.* 2006;169(1):233–246.
164. Cui R, Takahashi F, Ohashi R, Gu T, Yoshioka M, Nishio K, Ohe Y, Tominaga S, Takagi Y, Sasaki S, Fukuchi Y, Takahashi K. Abrogation of the interaction between osteopontin and  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin reduces tumor growth of human lung cancer cells in mice. *Lung Cancer.* 2007;57(3):302–310.
165. Anborgh PH, Wilson SM, Tuck AB, Winquist E, Schmidt N, Hart R, Kon S, Maeda M, Uede T, Stitt LW, Chambers AF. New dual monoclonal ELISA for measuring plasma osteopontin as a biomarker associated with survival in prostate cancer: clinical validation and comparison of multiple ELISAs. *Clin Chem.* 2009;55(5):895–903.



166. Tuck AB, O'Malley FP, Singhal H, Harris JF, Tonkin KS, Kerkvliet N, Saad Z, Doig GS, Chambers AF. Osteopontin expression in a group of lymph node negative breast cancer patients. *Int J Cancer*.1998;79(5):502–508.
167. Bao LH, Sakaguchi H, Fujimoto J, Tamaya T. Osteopontin in metastatic lesions as a prognostic marker in ovarian cancers. *J Biomed Sci*. 2007;14(3):373–381.
168. Forootan SS, Foster CS, Aachi VR, Adamson J, Smith PH, Lin K, Ke Y. Prognostic significance of osteopontin expression in human prostate cancer. *Int J Cancer*. 2006;118(9):2255–2261.
169. Agrawal D, Chen T, Irby R, Quackenbush J, Chambers AF, Szabo M, Cantor A, Coppola D, Yeatman TJ. Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94(7):513–521.
170. Chen RX, Xia YH, Xue TC, Zhang H, Ye SL (2011) Down-regulation of osteopontin inhibits metastasis of hepatocellular carcinoma cells via a mechanism involving MMP-2 and uPA. *Oncol Rep* 25(3):803-808.
171. Zhao B, Sun T, Meng F, Qu A, Li C, Shen H, Jin Y, Li W (2011) Osteopontin as a potential biomarker of proliferation and invasiveness for lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011,
172. Chien CY, Su CY, Chuang HC, Fang FM, Huang HY, Chen CH, Chen CM, Huang CC. Comprehensive study on the prognostic role of osteopontin expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*.2009;45(9):798–802.
173. Bramwell VH, Tuck AB, Wilson SM, Stitt LW, Cherian AK, Rorke SC, Al-Katib W, Postenka CO, Chambers AF. Expression of osteopontin and HGF/met in adult soft tissue tumors. *Cancer Biol Ther*.2005;4(12):1336–1341.
174. Saeki Y, Mima T, Ishii T, Ogata A, Kobayashi H, Ohshima S, Ishida T, Tabunoki Y, Kitayama H, Mizuki M, Katada Y, Asaoku H, Kitano M, Nishimoto N, Yoshizaki K, Maeda M, Kon S, Kinoshita N, Uede T, Kawase I. Enhanced production of osteopontin in multiple myeloma: clinical and pathogenic implications. *Br J Haematol*. 2003;123(2):263–270.
175. Kim JH, Skates SJ, Toshimitsu U, Wong K et al. Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer. *JAMA* 2002, 287(13):1671-1677.

176. Hwang J, Na S, Lee H, Lee D. Correlation between preoperative serum levels of five biomarkers and relationships between these biomarkers and cancer stage in epithelial ovarian cancer. *J Gynecol Oncol.* 2009 Sep;20(3):169-75.
177. Nakae M, Iwamoto I, Fujino T, et al. Preoperative plasma osteopontin level as a biomarker complementary to carbohydrate antigen 125 in predicting ovarian cancer. *J Obstet Gynaecol Res.*2006;32:309–314..
178. Bast RC. Early detection of ovarian cancer: new technologies in pursuit of a disease that is neither common nor rare. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2004;115:233–248.
179. Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin : role in cell signaling and cancer progression. *Trends in Cell Biology* 2006;16(2):80-86.
180. Menon U, Jacobs IJ. Ovarian cancer screening in the general population. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2001;13:61-64.
181. Boente MP, Schilder R, Ozols RF. Gynecological cancers. *Cancer chemother biol response modif.* 1999;18:418-434.
182. Bast RC Jr, “Biomarkers for ovarian cancer: new technologies and targets to address persistently unmet needs,” *Cancer Biomarkers*,2010; 8(4-5):161–166.
183. Ardekani AM, Hitt B, Brown MR, Fishman DA, Mills G et al. A high throughput proteomic approach to serum marker development for discrimination between ovarian cancer patients and unaffected individuals. *Proc Soc Gynecol Oncol* 2001;32:102.
184. Bast RC Jr. Status of tumor markers in ovarian cancer screening. *J Clin Oncol* 2003;21:S200–205.
185. Petković S, Kesić V, Poljaković Lj, Kastratović B. Some tumor markers in case of ovarian malignancies. *International Journal of Thymology* 1994; 2:154-163.
186. Terzić M. Dotlić J. Likić-Lađević I, Atanacković J at al. Evaluation of the risk malignancy index diagnostic value in patients with adnexal masses. *Vojnosanitetski pregled* 2010;68(7):589-94.

187. Lee CJ, Ariztia EV, Fishman DA. Conventional and proteomic technologies for the detection of early stage malignancies: markers for ovarian cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2007;44:87–114.
188. Wong KK, Cheng RS, Mok SC. Identification of differentially expressed genes from ovarian cancer cells by MICROMAX cDNA microarray system. *Biotechniques* 2001;30:670–5.
189. Brown LF, Berse B, Van de Water L, et al. Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell* 1992;3:1169–80.
190. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet.* 2002;359:572–577.
191. Thalmann GN, Sikes RA, Devoll RE et al. Osteopontin: possible role in prostate cancer progression. *Clin Cancer Res.*1999;5:2271-2277.
192. Newham P, Humphries MJ. Integrin adhesion receptors: structure, function and implications for biomedicine. *Mol Med Today* 1996;2:304–13.
193. Hu DD, Hoyer JR, Smith JW. Ca<sup>2+</sup> suppresses cell adhesion to osteopontin by attenuating binding affinity for integrin  $\alpha v \beta 3$ . *J Biol Chem* 1995;270:9917–25.
194. Senger, DR. et al. Adhesive properties of osteopontin: regulation by a naturally occurring thrombin-cleavage in close proximity to the GRGDS cell-binding domain. *J. Biol. Chem.* 1987; 262:2900–2907.
195. Brown LF, Berse B, Van de Water L, et al. Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell* 1992;3:1169–80.
196. Fedarko, NS et al. Elevated serum bone sialoprotein and osteopontin in colon, breast, prostate, and lung cancer. *FASEB J.* 2004;18:734–736.
197. Bautista DS, Saad Z, Chambers AF, Tonkin KS, O'Malley FP, Singhal H, Tokmakejian S, Bramwell V, Harris JF. Quantification of osteopontin in human plasma with an ELISA: basal levels in pre- and postmenopausal women. *Clin Biochem.* 1996;29(3):231-9.

198. Coppola D, Szabo M, Boulware D et al. Correlation of Osteopontin Protein Expression and Pathological Stage across a Wide Variety of Tumor Histologies. *Clin Cancer Res.* 2004;10:184.
199. Tiniakos DG, Yu H, Liapis H. *m Pathol* 1998;29:1250-1254.
200. Liapis H, Adler LM, Wick MR, Rader JS. Expression of  $\alpha v \beta 3$  integrin is less frequent in ovarian epithelial tumors of low malignant potential in contrast to ovarian carcinomas. *Hum Pathol.* 1997;28:443–9.
201. Milivojevic M, Bošković V, Atanacković J, Milićević S, Ražić S, Kastratović-Kotlica B. Evaluation of osteopontin and CA125 in detection of epithelial ovarian carcinoma. *EJGO* 2013;1:83-85.
202. Anborgh PH, Mutrie JC, Tuck AB, Chambers AF. Pre- and post-translational regulation of osteopontin in cancer. *J Cell Commun Signal.* 2011;5(2):111-22.
203. Neisch AL, and Fehon RG. Ezrin, Radixin and Moesin: Key regulators of membrane-cortex interactions and signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 2011; 23(4): 377–382.
204. Johnston NIF and El-Tanani MK. Osteopontin: a new role for a familiar actor. *Breast Cancer Res.* 2008;10(6): 306.
205. Edgell T, Martin-Roussety G, Barker G, Autelitano DJ, Allen D, et al. Phase II biomarker trial of a multimarker diagnostic for ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010;136:1079–1088.
206. Miller RW, Smith A, Desimone CP, Seamon L, Goodrich S, et al. Performance of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Ovarian Tumor Referral Guidelines With a Multivariate Index Assay. *Obstet Gynecol.* 2011; 117(6):1298-306.
207. Sessaiah P, Bertenshaw GP, Chen TH, Bergstrom K, Zhao J, et al. Validation of a Multivariate Serum Profile for Epithelial Ovarian Cancer Using a Prospective Multi-Site Collection. 2011;Nov.

208. Banerjee S, Gore M. The future of targeted therapies in ovarian cancer. *Oncologist*. 2009;14(7):706–716.
209. Hiss D. Optimizing Molecular-Targeted Therapies in Ovarian Cancer: The Renewed Surge of Interest in Ovarian Cancer Biomarkers and Cell Signaling Pathways. *Journal of Oncology*. 2012; ID 737981; 23 p.
210. Schorge JO, Drake RD, Lee H, Skates SJ, Rajanbabu R at al. Osteopontin as an adjunct to CA125 in detecting recurrent ovarian cancer. *Clinical cancer research*.2004;10: 3474-3478.

## **BIOGRAFIJA**

Mirjana Milivojević je upisala Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu školske 1980/81. godine, a diplomirala 1985. godine sa prosečnom ocenom 9,37. Te iste godine zaposlila se na Farmaceutskom fakultetu u Institutu za Medicinsku biohemiju kao asistent pripravnika i 1986. godine položila državni ispit. Godinu dana kasnije 1987. godine počinje da radi i u laboratoriji Urgentnog centra Instituta za Medicinsku biohemiju Kliničkog Centra Srbije. Poslediplomske studije završila je na Farmaceutskom fakultetu 1997. godine odbranivši magistarski rad na temu „Određivanje 5-hidroksi indol sirćetne kiseline metodom instrumentalne planarne hromatografije (IPC) i njen klinički značaj”. Naučno vešće Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu dodelilo je Mirjani Milivojević istraživačko zvanje istraživač-saradnik 1999. godine. Bila je saradnik-istraživač u projektu Ministarstva nauke i tehnologije, pod rukovodstvom prof. dr. Nade Majkić-Singh. Oktobra 2000. godine završava specijalističke studije iz medicinske biohemije na Farmaceutskom fakultetu, polaže specijalistički ispit sa odličnim uspehom i stiče zvanje specijaliste medicinske biohemije. Kao specijalista medicinske biohemije radi u laboratoriji Klinike za ginekologiju i akušerstvo gde započinje rad o svojoj doktorskoj disertaciji. Septembra 2007. godine odlukom Ministarstva zdravlja, a prema odluci Farmaceutskog društva Srbije stiče zvanje primarijusa. U centru za medicinsku biohemiju KCS od 2010. godine obavlja dužnost šefa odeljenja Kliničkog centra za medicinsku biohemiju na Klinici za opekotine, plastičnu i rekonstruktivnu hirurgiju. Takođe u Centru za medicinsku biohemiju KCS od 2002. godine obavlja dužnost internog proveravača sistema kvaliteta prema zahtevima ISO standarda.

Mirjana Milivojević je član Društva medicinskih biohemijara Srbije (DMBS) od njegovog osnivanja 1987. godine. Član je Komore biohemijara Srbije i zamenik predsednika centralne izborne komisije Komore biohemijara na izborima obavljenim 2014. godine za Skupštinu Komore i njene organe. Takođe, ona je član Američke asocijacije za kliničku hemiju (AACCC).

Pored uspešnog društvenog i stručnog rada, bavila se i naučno-istraživačkim radom na Farmaceutskom fakultetu i u Kliničkom centru Srbije. Autor je 6 radova u međunarodnim i nacionalnim časopisima i 134 saopštenja štampanih u izvodima u međunarodnim i skupovima od nacionalnog značaja. Sa svojim radovima bila je učesnik mnogih skupova i kongresa i član brojnih komisija i radnih tela na kongresima u inostranstvu.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Мирјана Миливојевић, mr sci

Број уписа \_\_\_\_\_

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

"Значај одређивања концентрације остеопонтине у плазми као показатеља  
присуства малигнух тумора јајника"

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 16.12.2014.

Мирјана Миливојевић

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Мирјана Миливојевић

Број уписа \_\_\_\_\_

Студијски програм Докторске студије из медицинске биохемије

Наслов рада Значај одређивања концентрације остеопонтинина у плазми  
као показатеља присуства малигних тумора јајника

Ментор Проф. др Наташа Петронијевић

Потписани Мирјана Миливојевић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 16.12.2014.

Мирјана Миливојевић



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

“Значај одређивања концентрације остеопонтина у плазми као показатеља присуства малигних тумора јајника”

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 16. 12. 2014.

Милош Миливојевић

- 1 Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.