

Przydatność oznaczeń surowiczego stężenia CA 125 i HE4 w diagnostyce raka jajnika

Usefulness of determining CA 125 and HE4 serum concentration in diagnosis of ovarian cancer

Izabela A. Gumółka

Beskidzkie Centrum Onkologii – Szpital Miejski im. Jana Pawła II w Bielsku-Białej

STRESZCZENIE

WSTĘP: Rak jajnika jest nowotworem złośliwym, będącym najczęstszą przyczyną zgonów kobiet z patologią narządu rodno. W diagnostyce raka jajnika kluczową rolę odgrywa marker CA 125. Zgodnie z ostatnimi doniesieniami, potencjalnym nowym markerem może być białko HE4 oraz Algorytm ROMA.

Celem pracy była ocena przydatności klinicznej równoczesnych oznaczeń stężeń obu markerów w surowicy kobiet chorych na raka jajnika oraz ocena Algorytmu ROMA, a następnie porównanie wyników tych oznaczeń z uzyskanymi u pacjentek ze schorzeniami ginekologicznymi innymi niż rak jajnika oraz u kobiet zdrowych.

MATERIAŁ I METODY: Badania przeprowadzono w Beskidzkim Centrum Onkologii – Szpitalu Miejskim im. Jana Pawła II w Bielsku-Białej, w następujących grupach kobiet: kontrolnej – osoby zdrowe, I badanej – pacjentki chore na raka jajnika, II badanej – pacjentki z nienowotworowymi schorzeniami ginekologicznymi oraz III badanej – pacjentki z rakiem trzonu macicy. Do oznaczeń stężeń obu markerów zastosowano metodę immunologiczną z wykorzystaniem technologii elektrochemiluminescencji (ECLIA).

WYNIKI: Wykazano znamiennej statystycznie różnicę między stężeniami obu markerów oraz wartością Algorytmu ROMA w grupach kobiet zdrowych i chorych na raka jajnika ($p < 0,001$) oraz chorych na nienowotworowe schorzenia ginekologiczne (CA 125 $p < 0,001$; HE4 $p = 0,034$; Algorytm ROMA $p = 0,012$). Analiza krzywych ROC wykazała, że łączne oznaczanie stężeń obu markerów i wyznaczanie Algorytmu ROMA istotnie podnosi wartość diagnostyczną testu w porównaniu z oznaczaniem pojedynczych markerów (AUC: CA 125 69%; HE4 85%; Algorytm ROMA 90%).

WNIOSKI: Stwierdzono dużą użyteczność równoległych oznaczeń stężeń CA 125 i HE4 oraz wyznaczania Algorytmu ROMA dla diagnostyki różnicowej guzów miednicy mniejszej i nowotworów narządu rodno (rak jajnika, rak trzonu macicy).

SŁOWA KLUCZOWE

rak jajnika, CA 125, HE4, Algorytm ROMA

Received: 06.11.2014

Revised: 21.11.2014

Accepted: 06.01.2015

Published online: 15.10.2015

Adres do korespondencji: Dr n. med. Izabela A. Gumółka, Beskidzkie Centrum Onkologii Szpital Miejski im. Jana Pawła II w Bielsku-Białej, ul. Wyzwolenia 18, 43-300 Bielsko-Biała, tel. + 48 508 363 198, fax. +48 334 984 056, e-mail: izabelagumolka@wp.pl

Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
www.annales.sum.edu.pl

ABSTRACT

INTRODUCTION: Ovarian cancer is a malignant tumor that is the most common cause of death among women with abnormalities of the reproductive organs. CA125 plays a key role in the diagnosis of ovarian cancer. However, according to recent reports, potentially new markers may be HE4 and ROMA. The aim of study was to assess the clinical usefulness of marker concentrations in the serum of women with ovarian cancer and ROMA determination, as well as to compare the results of those obtained from patients with endometrial cancer and from healthy women.

MATERIALS AND METHODS: The study was conducted in the Beskid Oncology Centre in Bielsko-Biala, in the following groups of women: control group – healthy women, I research group – women with ovarian cancer, II research group – women with non-malignant gynecological diseases and III research group – women with endometrial cancer. In order to determine the concentrations of the markers, the immunological method with electrochemiluminescence technology was applied.

RESULTS: A statistically significant difference between the marker concentrations and specified value of ROMA in the groups of healthy women and of those with ovarian cancer ($p < 0.001$) and with non-malignant gynecological disorders (CA125 $p < 0.001$, HE4 $p = 0.034$; ROMA $p = 0.012$) was demonstrated. The ROC curve analysis showed that determining the markers' total concentration and determining ROMA significantly improves the diagnostic value of the test as compared to single-marker determination (AUC:CA125 69%; HE4 85%; ROMA 90%).

CONCLUSIONS: Simultaneous measurements of CA125 and HE4 concentrations as well as determining ROMA for the differential diagnosis of pelvic tumors and gynecological cancers (ovarian, endometrial cancer) were proven useful.

KEY WORDS

ovarian cancer, CA 125, HE4, ROMA algorithm

WSTĘP

Rak jajnika jest przyczyną wysokiej śmiertelności wśród kobiet chorujących na nowotwór narządu rodowego. Główną przyczyną takiego stanu są trudności w rozpoznaniu choroby we wczesnych jej stadiach [1]. Obecnie powszechnie stosowany marker CA 125 nie jest badaniem w pełni wystarczającym w diagnostyce raka jajnika. Oznaczanie CA 125 w kombinacji z HE4 oraz wyliczenie Algorytmu ROMA pozwoli na podniesienie czułości i swoistości oznaczanych parametrów [2,3,4,5].

U pacjentek z I stopniem zaawansowania raka jajnika, kiedy choroba zwykle przebiega bezobjawowo, marker CA 125 często przyjmuje wartości z przedziału referencyjnego metody [6,7]. Wzrost stężenia HE4 w surowicy krwi u tych pacjentek jest zauważalny dużo szybciej niż CA 125. Oznaczenie stężenia HE4 w takich przypadkach może przyspieszyć diagnostykę raka jajnika, zwiększając tym samym szansę na wyleczenie pacjentki z niskim stopniem zaawansowania nowotworu [8,9,10,11].

Należy jednak zaznaczyć, że oznaczanie tego markera nie jest, jak dotąd, badaniem stosowanym w diagnostyce omawianego schorzenia. Dla wykazania przydatności diagnostycznej tego parametru podjęto badania, w których jednocześnie oznaczono zarówno stężenia CA 125, jak i HE4 w surowicy krwi kobiet chorych na raka jajnika oraz wyznaczono dla nich

Algorytm ROMA, a następnie porównano te wyniki z surowiczymi wartościami stężeń wymienionych markerów u pacjentek ze schorzeniami ginekologicznymi innymi niż rak jajnika bądź u kobiet zdrowych.

Dla realizacji nadrzędnego celu pracy przyjęto następujące zadania badawcze:

- ocenę stężenia CA 125 i HE4 w surowicy krwi kobiet z rakiem jajnika o różnym typie histogenetycznym i zróżnicowaniu histopatologicznym guza oraz o różnym stopniu zaawansowania klinicznego nowotworu;
- określenie ewentualnej korelacji między stężeniem CA 125 i HE4 u chorych na raka jajnika a stopniem klinicznego zaawansowania nowotworu i stopniem jego dojrzałości histopatologicznej;
- ocenę stężeń CA 125 i HE4 w surowicy krwi pacjentek z innymi schorzeniami ginekologicznymi niż rak jajnika;
- ocenę stężeń CA 125 i HE4 w surowicy krwi kobiet z grupy kontrolnej oraz określenie ewentualnej korelacji tych wartości z wiekiem, statusem menopauzalnym, stosowaniem leków hormonalnych oraz paleniem tytoniu; wyznaczenie czułości, swoistości oraz wartości predykcyjnej dodatniej i ujemnej dla oznaczania stężenia obu markerów na podstawie krzywych ROC;
- walidację metod oznaczania stężenia CA 125 i HE4 oraz ocenę metody oznaczania stężenia CA 125 i HE4 w surowicy i osoczu krwi.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto 261 kobiet leczonych lub odbywających wizyty kontrolne w Beskidzkim Centrum Onkologii – Szpitalu Miejskim im. Jana Pawła II w Bielsku-Białej. Kobiety podzielono na cztery grupy – jedną kontrolną i trzy grupy badane (tab. I).

Do badań wykorzystano krew pozyskaną od kobiet, które odbywały wizyty kontrolne w gabinetach ginekologicznych w Poradni Beskidzkiego Centrum Onkologii – Szpitala Miejskiego im. Jana Pawła II w Bielsku-Białej. Do badań zostały zakwalifikowane osoby, które w ostatnim roku nie przebyły chorób wymagających hospitalizacji, nie wykonywano u nich zabiegów chirurgicznych, a w czasie poprzedzającym badania nie były leczone farmakologicznie.

Krew do badań pobierano z żyły dołu łokciowego, do probówek „na skrzep”, wirowano przez 10 minut, 1500 x g, w temperaturze 20°C. Uzyskane w ten sposób surowice krwi zamrożono i przechowywano w temperaturze -20°C do czasu rozpoczęcia badań stanowiących cel pracy.

METODY

U wszystkich kobiet wykonano oznaczenia stężeń markerów nowotworowych, tj. CA 125 i HE4, za pomocą analizatora immunochemicznego Cobas e-411 Rack firmy ROCHE DIAGNOSTICS, który stosowany jest do rutynowych oznaczeń z zakresu immunochemii, z wykorzystaniem technologii elektrochemiluminescencji (ECLIA). Metoda oznaczania stężeń CA 125 i HE4 polegała na reakcji antygen–przeciwciała, opartej na fazie stałej. Próbkę surowicy krwi kobiet inkubowano dwukrotnie. Pierwszą inkubację przeprowadzono z biotynylowanymi przeciwciałami monoklonalnymi, swoistymi dla CA 125 i HE4, które były znakowane kompleksem rutenu. Drugą inkubację próbki przeprowadzono po dodaniu mikrocząsteczek opłaszczonych streptawidyną. Powstały kompleks wiązał się z fazą stałą, dzięki powinowactwu biotyny do streptawidyny. Mieszaninę reakcyjną przenoszono do komory pomiarowej, gdzie mikrocząsteczki zostały przyciągnięte magnesem do powierzchni elektrody. Następnie usunięto niezwiązane substancje za pomocą płynów systemowych ProCell. Napięcie przyłożone do elektrody indukowało reakcję elektrochemiluminescencji i emisję fotonu, którą mierzono fotopowielaczem. Wyniki odczytywano na podstawie dwupunktowej krzywej kalibracyjnej.

ANALIZA STATYSTYCZNA

Wyniki uznawano za statystycznie istotne przy $p < 0,05$. Analizy statystyczne wykonano korzystając z profesjonalnego pakietu procedur statystycznych STATISTICA PL wersja 10.0 firmy StatSoft Polska. Dla zmiennych o rozkładach odbiegających od normalnego zastosowano medianę, jako miarę tendencji centralnej, oraz zakres międzykwartyłowy, jako typowy zakres zmienności. Normalność rozkładów badanych parametrów weryfikowano testem Shapiro-Wilka. Różnice pomiędzy dwiema średnimi niezależnymi o rozkładach, których nie można było uznać za normalne, porównano nieparametrycznym testem U Manna-Whitneya. Dokonano porównania wartości średnich testem kolejności par Wilcoxon dla dwóch prób zależnych. Do oszacowania zmian w różnicach pomiędzy wartościami, zastosowano nieparametryczną analizę wariancji Kruskala-Wallisa. Wykonano również testy wielokrotnych porównań. Do zbadania siły zależności między zmiennymi zależnymi użyto współczynnika korelacji liniowej Pearsona oraz współczynnika korelacji rang Gamma. Do oszacowania dokładności diagnostycznej testów do oznaczania stężenia obu markerów oraz wyznaczania Algorytmu ROMA wykonano kompleksową analizę krzywych ROC.

WYNIKI

We wszystkich trzech grupach badanych oraz w grupie kontrolnej (tab. I) porównano stężenia CA 125 i HE4 oraz wartości Algorytmu ROMA. Stwierdzono, że w przypadku obu markerów oraz Algorytmu ROMA istnieją znamienne statystycznie różnice między stężeniem markerów oraz wartością Algorytmu ROMA w grupie kobiet zdrowych i chorych na raka jajnika (CA 125 $p < 0,001$; HE4 $p < 0,001$; Algorytm ROMA $p < 0,001$). Dodatkowo wykazano istotną statystycznie różnicę w stężeniu HE4 pomiędzy grupą kobiet z nienowotworowymi schorzeniami ginekologicznymi a grupą kobiet chorych na raka jajnika (HE4 $p = 0,034$). Przeprowadzone badania wykazały znamienne statystycznie różnice między stężeniem białka HE4 u kobiet chorych na raka trzonu macicy oraz u kobiet chorych na raka jajnika (HE4 $p < 0,001$), a także statystycznie istotne różnice między stężeniem markera CA 125 i wartością wyznaczonego Algorytmu ROMA w grupie kobiet z nienowotworowymi schorzeniami ginekologicznymi i w grupie kontrolnej

Tabela I. Charakterystyka wszystkich grup kobiet
Table I. Characteristics of all groups of women

Grupa	Charakterystyka	Pacjentki
Kontrolna (N = 72)	Wiek	
	zakres	18–74 lat
	średnia	49 lat
	mediana	47 lat
	Status menopauzalny	
	przed menopauzą	41
	po menopauzie	31
	Wiek	
	zakres	21–77 lat
	średnia	60 lat
mediana	60 lat	
I badana (N = 109)	Status menopauzalny	
	– przed menopauzą	3
	– po menopauzie	106
	Dojrzałość guza	
	G1	20
	G2	35
	G3	54
	FIGO	
	I	36
	II	18
III	47	
IV	8	
II badana (N = 38)	Histopatologia	
	<i>Adenocarcinoma serosum</i>	61
	<i>Adenocarcinoma mucinosum</i>	19
	<i>Adenocarcinoma endometrioides</i>	10
	<i>Adenocarcinoma clarocellulare</i>	6
	<i>Adenocarcinoma mixtum</i>	6
	inne:	7
	<i>Adenocarcinoma transitionale</i>	2
	<i>Adenocarcinoma planoepitheliale</i>	2
	<i>Carcinoma nondifferentiatum</i>	1
	<i>Carcinoma nonclassificatum</i>	1
	<i>Tumor Brenner</i>	1
	Wiek	
	zakres	19–76 lata
	średnia	47 lata
mediana	48 lata	
Status menopauzalny		
przed menopauzą	26	
– po menopauzie	12	
Rozpoznanie		
mięśniak macicy	5	
endometrioza	8	
guz łagodny (torbiel)	25	
III badana (N = 42)	Wiek	
	zakres	51–83 lata
	średnia	64 lata
	mediana	63 lata
	Status menopauzalny	
przed menopauzą	0	
po menopauzie	42	

(CA 125 $p < 0,001$; Algorytm ROMA $p = 0,012$). Nie stwierdzono znamiennej statystycznej różnicy stężeń w przypadku obu markerów, które pozwalałyby na odróżnienie grupy kobiet zdrowych od pacjentek z rozpoznaniem rakiem trzonu macicy.

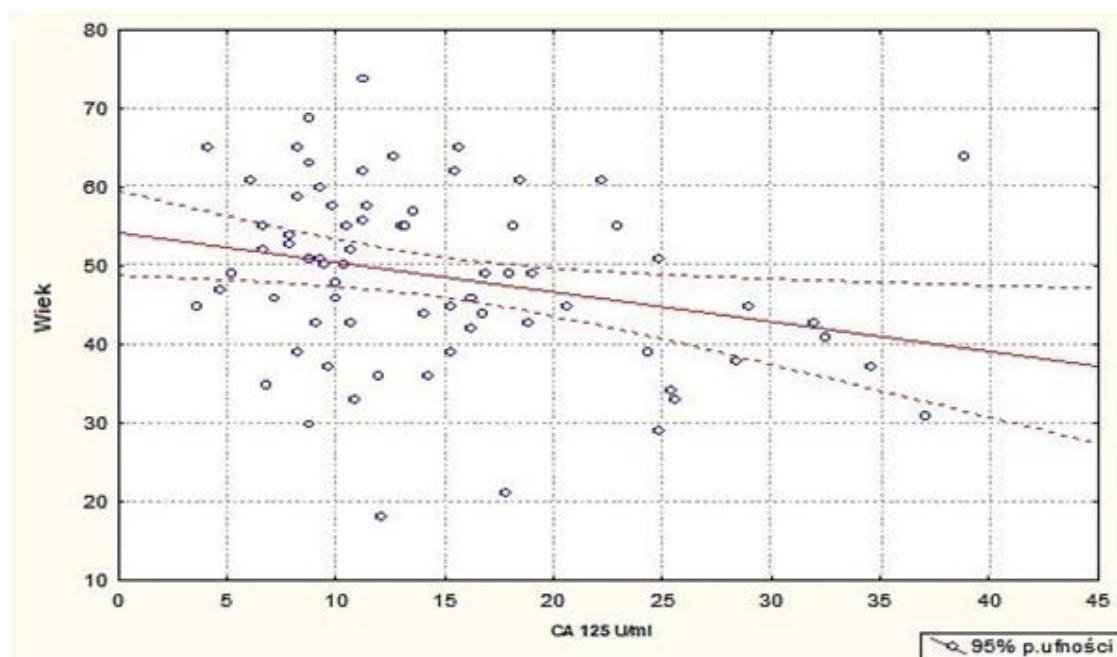
W grupie pacjentek chorych na raka jajnika porównano oznaczone parametry w zależności od: typu histogenetycznego raka jajnika, stopnia zaawansowania nowotworu według FIGO i stopnia zróżnicowania histopatologicznego G. Różnice wykazano jedynie na poziomie tendencji, w zakresie średniego stężenia markera CA 125 i średniej wartości wyznaczonego Algorytmu ROMA, między surowiczym (*Adenocarcinoma serosum*) a śluzowym (*Adenocarcinoma mucinosum*) typem raka jajnika (CA 125 $p = 0,067$; Algorytm ROMA $p = 0,080$).

Wykazano statystycznie istotne ($p < 0,001$) dodatnie korelacje między wszystkimi parametrami, tj. stężeniami CA 125 i HE4 oraz wartościami wyznaczonych algorytmów ROMA a stopniem klinicznego zaawansowania nowotworu według FIGO oraz stopniem zróżnicowania histopatologicznego G raka jajnika. Wykazano, że w przypadku wszystkich badanych parametrów istnieją znamienne statystycznie różnice między stężeniem markerów oraz wartością Algorytmu ROMA w grupie pacjentek z FIGO I i w grupie pacjentek z FIGO III ($p < 0,001$). Dodatkowo stwierdzono statystycznie istotną zależność między stężeniem białka HE4 i wartością Algorytmu ROMA w grupie pacjentek z FIGO I i w grupie kobiet z FIGO IV (HE4, Algorytm ROMA $p < 0,001$). Wykazano, że w przypadku obu markerów oraz Algorytmu ROMA istnieją znamienne statystycznie różnice stężeń markerów oraz wartością Algorytmu ROMA między grupą pacjentek z G1 a grupą pacjentek z G3 (CA 125 $p = 0,008$; HE4, Algorytm ROMA $p < 0,001$). Dodatkowo stwierdzono statystycznie istotną korelację pomiędzy stężeniem białka HE4 i wartością Algorytmu ROMA w grupie pacjentek z G1 a grupą pacjentek z G2 (HE4 $p = 0,005$; Algorytm ROMA $p = 0,008$).

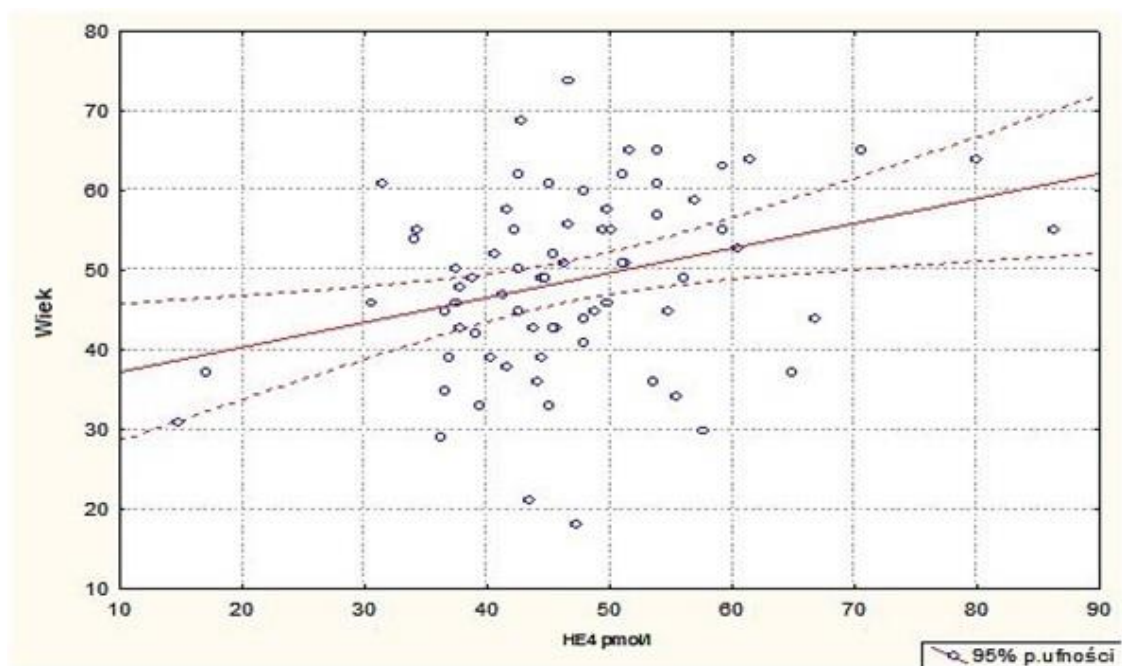
W grupie kontrolnej dokonano porównań stężeń oznaczonych markerów w zależności od: wieku i statusu menopauzalnego kobiet, palenia bądź niepalenia tytoniu, stosowania bądź niestosowania terapii hormonalnej oraz materiału biologicznego użytego do badań. Analiza wykazała statystycznie istotną korelację pomiędzy wszystkimi parametrami a wiekiem kobiet, dodatnie korelacje pomiędzy stężeniami HE4 ($r = 0,314$; $p = 0,007$) oraz wartościami wyznaczonych algorytmów ROMA ($r = 0,397$; $p = 0,001$) oraz ujemne korelacje między stężeniami (CA 125: $r = -0,270$; $p = 0,022$) a wiekiem. Na rycinach 1, 2 i 3 przedstawiono korelację pomiędzy stężeniami CA 125 i HE4 oraz wartością Algorytmu ROMA w zależności od wieku kobiet z grupy kontrolnej.

W celu sprawdzenia jakości wykonywanych oznaczeń, przeprowadzono walidację metod oznaczania stężeń CA 125 i HE4. Wyznaczono następujące parametry walidacyjne: zakres analityczny metody, precy-

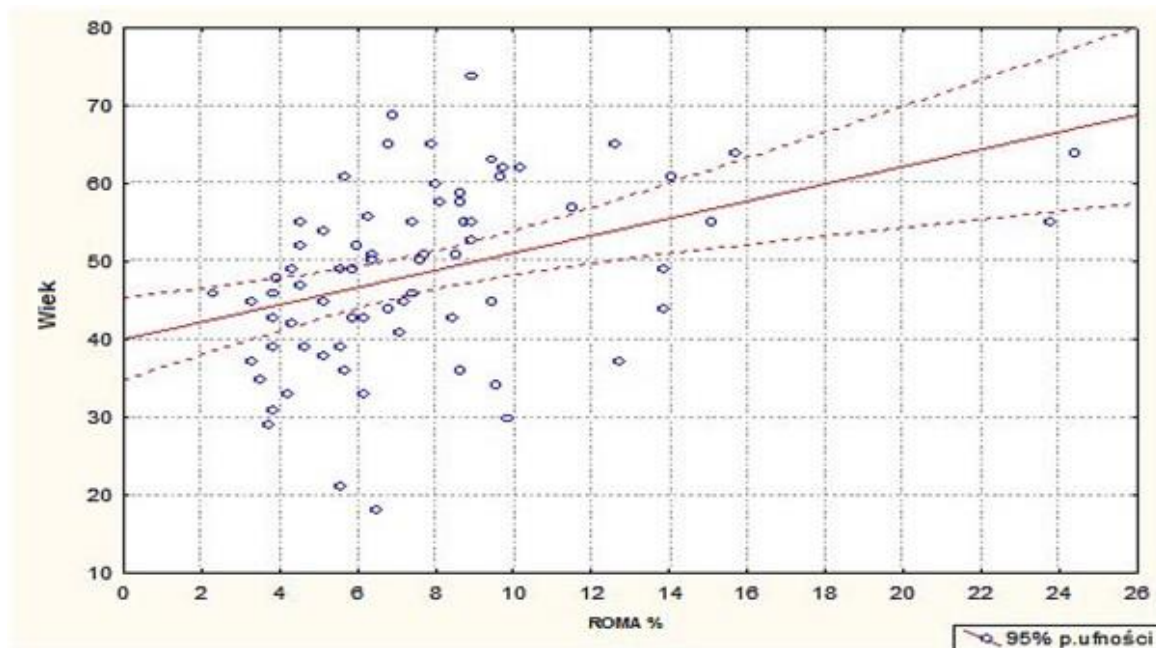
zję, czułość analityczną, powtarzalność oraz dwiema metodami – granicę wykrywalności i granicę oznaczalności. Wyniki oznaczeń wszystkich parametrów walidacyjnych przedstawia tabela II.



Ryc. 1. Rozkład stężeń CA 125 w surowicy krwi kobiet z grupy kontrolnej w zależności od wieku.
Fig. 1. Distribution of CA 125 serum concentrations of women from control group, depending on age.



Ryc. 2. Rozkład stężeń HE4 w surowicy krwi kobiet z grupy kontrolnej w zależności od wieku.
Fig. 2. Distribution of HE4 serum concentrations of women from control group, depending on age.



Ryc. 3. Rozkład wartości Algorytmu ROMA u kobiet z grupy kontrolnej w zależności od wieku.
Fig. 3. Distribution of ROMA Algorithm of women from control group, depending on age.

Tabela II. Zbiorcze przedstawienie wyznaczonych parametrów walidacyjnych
Table II. Summary presentation of designated parameter validation

Parametr walidacyjny	Wartości parametrów walidacyjnych	
	CA 125	HE4
Zakres analityczny	3,00–481 U/ml	4,13–213 pmol/l
Precyzja	4,07%	6,60%
Czułość analityczna	4,53%	3,69%
Powtarzalność	9,41%	14,6%
Granica wykrywalności – metoda 1	4,37 U/ml	11,2 pmol/l
Granica wykrywalności – metoda 2	3,00 U/ml	7,69 pmol/l
Granica oznaczalności – metoda 1	8,73 U/ml	22,3 pmol/l
Granica oznaczalności – metoda 2	6,00 U/ml	15,4 pmol/l

Dodatkowo wykazano statystycznie istotne różnice pomiędzy wszystkimi parametrami: stężeniami CA 125 $p = 0,031$; stężeniami HE4 $p = 0,004$ oraz wartościami wyznaczonych algorytmów ROMA $p < 0,001$ a stanem menopauzalnym kobiety. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy wszystkimi parametrami: stężeniami CA 125 i HE4 oraz wartościami wyznaczonych algorytmów ROMA a stosowaniem leków hormonalnych przez kobiety z grupy kontrolnej. Wykazano natomiast, że tylko w przypadku markera CA 125 istnieje statystycznie istotna różnica między CA 125 w grupach kobiet palących i niepalących (CA 125 $p = 0,028$). Stwierdzono również, że tylko w przypadku markera CA 125 różnica w jego stężeniu między osoczem a surowicą jest istotna statystycznie ($p = 0,002$). Oce-

nę wartości stężeń CA 125 i HE4 oraz wartości algorytmów ROMA we wszystkich grupach kobiet przedstawia tabela III.

Aby oszacować dokładność diagnostyczną testów do oznaczania stężenia CA 125 i HE4 oraz wyznaczania Algorytmu ROMA, wykonano kompleksową analizę krzywych ROC, obejmującą wykresy krzywych ROC, wyznaczanie pól powierzchni odpowiednio pod krzywymi ROC dla każdego parametru oraz porównanie statystyczne wielkości tych pól wraz z obliczeniem poziomów istotności. W przypadku wszystkich parametrów punkt odcięcia został wyznaczony na podstawie badań własnych. Stwierdzono, że istnieją statystycznie istotne różnice między AUC (*area under curve*) dla testu CA 125 w porównaniu z AUC dla testu HE4 oraz AUC dla Algorytmu ROMA

Tabela III. Analiza wartości stężeń oznaczanych markerów we wszystkich grupach kobiet
Table III. Analysis of marker concentrations in all groups of women

	Stężenie CA 125 U/ml										Stężenie HE4 pmol/l										Wartość Algorytmu ROMA%																						
	Me	3	4	5	6	7	8	Me	Min	Max	Q1	Q3	Me	Min	Max	Q1	Q3	Me	Min	Max	Q1	Q3	Me	Min	Max	Q1	Q3																
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17																											
grupa kontrolna	72 (27)	12,0	3,47	38,8	8,90	18,2	45,4	14,7	86,1	40,5	52,5	6,85	2,30	24,4	5,10	8,92																											
rak jajnika	109 (42)	18,7	3,00	6564	12,0	75,2	80,4	7,70	16840	56,8	210	19,1	4,40	99,9	11,3	62,6																											
nienowotworowe schorzenia ginekologiczne	38 (15)	26,8	5,52	287	12,3	55,2	52,1	29,5	218	44,2	70,4	8,95	3,60	83,9	7,10	13,9																											
rak trzonu macicy	42 (16)	12,4	4,57	65,7	8,09	19,5	50,6	8,71	147	46,0	63,4	10,6	4,90	3,80	7,90	16,4																											
<i>Adenocarcinoma serosum</i>	61 (56)	29,9	3,00	6564	13,6	384	100	7,70	1684	56,0	406	27,4	6,25	99,9	11,4	95,4																											
<i>Adenocarcinoma mucinosum</i>	19 (17)	12,7	4,67	261	9,50	19,6	64,3	35,4	1925	45,4	79,8	11,5	4,40	97,9	9,60	17,1																											
<i>Adenocarcinoma endometrioides</i>	10 (9)	12,9	6,27	81,2	8,03	19,9	68,6	40,8	261	44,6	90,3	13,9	9,10	68,4	11,3	26,6																											
<i>Adenocarcinoma clarocellulare</i>	6 (5,5)	24,3	8,95	93,1	9,84	29,9	120	41,5	366	60,5	158	27,0	5,10	62,1	10,4	57,2																											
<i>Adenocarcinoma mixtum</i>	6 (5,5)	25,2	12,6	485	13,5	48,7	94,7	76,0	281	80,4	210	27,2	15,7	90,9	15,8	57,8																											
Inny:																																											
<i>Adenocarcinoma transitionale</i>																																											
<i>Adenocarcinoma planoepitheliale</i>																																											
<i>Carcinoma nondifferentiatum</i>	7 (6)	16,9	5,90	4787	7,96	486	102	43,6	967	73,1	454	22,9	6,60	98,8	14,0	97,3																											
<i>Carcinoma nonclassificatum</i>																																											
<i>Tumor Brenner</i>																																											
FIGO																																											
I	37 (34)	13,3	4,67	795	10,1	19,6	59,6	7,70	4034	44,7	76,0	12,0	4,40	99,6	9,59	15,9																											
II	18 (17)	16,3	3,00	81,2	12,6	21,6	73,2	39,6	235	47,6	101	16,4	6,25	58,3	10,7	23,5																											
III	46 (42)	49,3	5,90	6564	13,9	486	155	33,4	6548	73,1	426	49,0	7,50	99,9	15,34	95,8																											
IV	8 (7)	182	12,7	3983	81,7	1606	687	61,9	16840	133	6532	98,6	12,6	99,9	54,7	99,4																											
G																																											
1	20 (18)	12,5	4,67	81,2	9,94	19,1	55,1	7,70	210	41,2	75,2	10,8	4,40	57,8	9,55	14,1																											
2	35 (32)	17,1	5,19	4787	11,7	75,2	90,3	42,4	6548	56,0	332	30,6	6,30	99,9	11,5	88,4																											
3	54 (50)	29,0	3,00	6564	12,7	382	102	39,6	16840	63,0	366	25,6	5,10	99,9	12,6	90,9																											

cd. tab. III

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Status																	
menopauzalny	przed	41 (57)	15,3	3,47	37,1	9,90	24,2	44,1	14,7	66,6	38,8	47,7	5,5	2,30	13,8	4,23	7,10
	po	31 (43)	10,5	4,10	38,8	8,66	13,4	49,9	31,4	86,1	42,6	59,1	8,70	4,50	24,4	7,40	11,5
Palenie tytoniu	tak	31 (43)	10,6	4,10	31,9	8,10	16,1	44,8	60,4	86,1	39,2	53,9	6,75	2,30	23,7	4,50	9,40
	nie	41 (57)	13,0	3,47	38,8	9,24	20,6	46,2	14,7	80,0	41,4	51,0	7,10	3,30	24,4	5,51	8,90
Terapia hormonalna	tak	30 (42)	10,4	4,10	38,8	8,66	13,2	45,2	34,1	80,0	42,4	54,7	7,08	3,80	24,4	5,50	9,40
	nie	42 (58)	15,4	3,47	37,1	9,90	22,1	45,4	14,7	86,1	37,5	51,6	6,85	2,30	23,7	4,30	8,90
Materiał biologiczny	osocze	47 (100)	18,1	4,20	963	12,5	36,1	72,7	29,6	1500	59,1	111	-	-	-	-	-
	surowica	47 (100)	18,3	3,90	1027	12,3	33,3	71,9	26,4	1500	58,4	108	-	-	-	-	-

N – liczebność grupy, Me – mediana, Min – minimum, Max – maksimum, Q1 – dolny kwartyl, Q3 – górny kwartyl

Tabela IV. Parametry opisujące testy diagnostyczne do oznaczenia stężenia CA 125, HE4 i wyliczenia Algorytmu ROMA
Table IV. All parameters describing diagnostic tests to determining CA 125 and HE4 concentrations and ROMA algorithm calculation

Test diagnostyczny	CA 125	CA 125	HE4	Algorytm ROMA
	11,5 U/ml	35 U/ml ¹	59,6 pmol/l	9,1%
Punkt odjęcia				
TP	85	39	80	98
FP	37	3	7	17
FN	24	70	29	11
TN	35	69	65	55
Czułość %	78	36	73	90
Swoistość %	49	96	90	76
1 – swoistość %	51	4	10	24
ACC %	66	60	80	84
PPV %	70	93	92	85
NPV %	59	50	69	83
OR	1,52	8,59	7,55	3,81
AUC %	69²	69²	85³	90

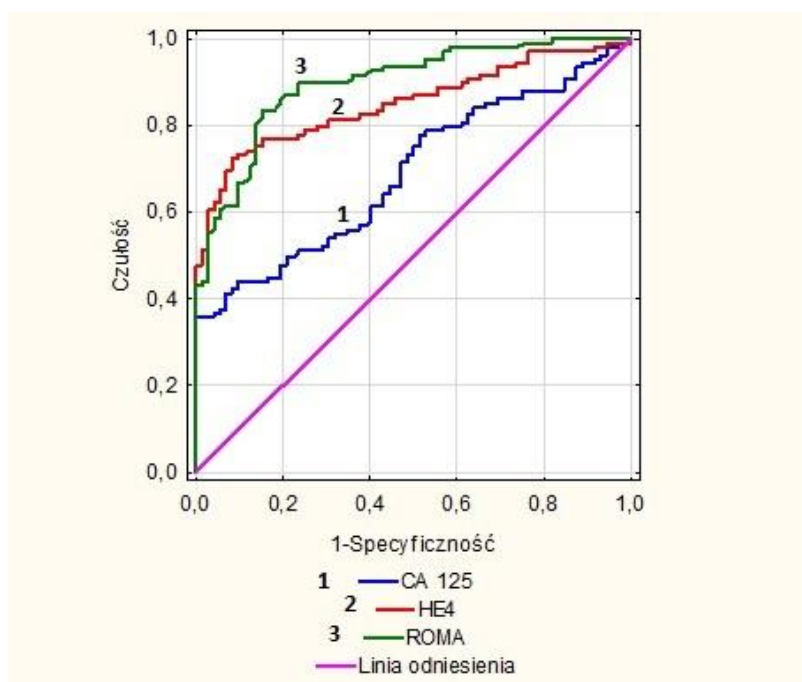
1 – przyjęty punkt odjęcia na podstawie danych literaturowych [12,13,14,15,16,17]

2 – zmienność statystyczna różnic z testem HE4 i Algorytmem ROMA (p < 0,001)

3 – zmienność statystyczna różnic z Algorytmem ROMA (p = 0,049)

TP – liczba wyników prawdziwie dodatnich; FP – liczba wyników fałszywie dodatnich; FN – liczba wyników fałszywie ujemnych; TN – liczba wyników fałszywie dodatnich;

ACC – dokładność testu diagnostycznego; PPV – wartość predykcyjna dodatnia; NPV – wartość predykcyjna ujemna; OR – iloraz szans; AUC – pole pod krzywą ROC



Ryc 4. Krzywe ROC dla wszystkich testów diagnostycznych: CA 125, HE4 i Algorytmu ROMA.
Fig. 4. ROC curves for all diagnostic tests: CA 125, HE4 and ROMA Algorithm.

($p < 0,001$). Wykazano również statystycznie istotną różnicę między AUC dla testu HE4 w porównaniu z AUC dla Algorytmu ROMA ($p = 0,049$). Zbiórny przebieg krzywych ROC dla poszczególnych testów diagnostycznych: CA 125, HE4 i Algorytmu ROMA obrazuje rycina 4. Na podstawie krzywych ROC wyznaczono optymalne punkty odcięcia, a następnie obliczono odpowiadające im wielkości, charakteryzujące badane testy diagnostyczne – czułość, specyficzność, ACC, wartości predykcyjne dodatnie i ujemne oraz iloraz szans. Wyniki wszystkich parametrów przedstawia tabela IV.

DISKUSJA

Pomimo postępów w chirurgii i chemioterapii, przeżywalność pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem jajnika jest nadal niska. We wczesnym stopniu zaawansowania choroby (I i II wg FIGO) rak jajnika rozpoznawany jest przypadkowo, a postawienie diagnozy w późniejszych stopniach zaawansowania (III i IV wg FIGO) wiąże się w 75% z niezadowolającymi wynikami leczenia [18,19]. Ze względu na brak skutecznych, laboratoryjnych badań przesiewowych, poszukuje się nowych markerów, których oznaczenie znacznie przyspieszyłoby i rozszerzyłoby diagnostykę raka jajnika. Dokonano analizy białek obecnych w tkance osób chorych na raka jajnika i stwierdzono

nadekspresję niektórych z nich [20]. W ten sposób wykryto m.in. białko HE4. Do rutynowo oznaczanego stężenia markera CA 125 dodano zatem oznaczenie stężenia białka HE4. Dodatkowym atutem płynącym z oznaczenia obu markerów jest możliwość wyliczenia Algorytmu ROMA, który służy do szacowania prawdopodobieństwa złośliwości wykrytego guza przydatków [21].

W niniejszej pracy stwierdzono statystycznie istotną różnicę między stężeniami HE4 w surowicy kobiet z grupy kontrolnej oraz u chorych na raka jajnika. Uzyskane wyniki znajdują potwierdzenia w badaniach opublikowanych w ostatnich latach, mówiących o znaczącym wzroście stężenia białka HE4 we krwi kobiet chorych na raka jajnika [22,23]. W przeprowadzonych badaniach własnych wykazano również statystycznie istotną różnicę pomiędzy stężeniami HE4 w grupie pacjentek z rakiem jajnika a stężeniami tego białka w grupie pacjentek z nienowotworowymi schorzeniami ginekologicznymi oraz w grupie pacjentek z rakiem trzonu macicy.

W niniejszej pracy podjęto próbę wyznaczenia parametrów testu jednoczesnego oznaczania stężenia CA 125 i HE4 oraz wyznaczania wartości Algorytmu ROMA poprzez analizę czułości i swoistości testu metodą krzywych ROC. Stwierdzono statystycznie znaczącą różnicę pomiędzy AUC (pole pod wykresem krzywej ROC) dla testu CA 125 i AUC dla testu HE4 oraz Algorytmu ROMA. W analizie metodą krzywych ROC stwierdzono, że wartość diagnostycz-

na posiadają jedynie testy: HE4 i Algorytm ROMA (AUC dla HE4 85%; AUC dla Algorytmu ROMA 90%). Test CA 125 nie ma wartości diagnostycznej (AUC dla CA 125 69%). W diagnostyce raka jajnika do oznaczeń stężenia powszechnie stosowanego markera CA 125 należy zatem dodać oznaczenie stężenia dodatkowego parametru, jakim jest HE4, i wyznaczyć Algorytm ROMA, którego czułość i swoistość jest największa [24,25]. Wyznaczanie Algorytmu ROMA przyczynia się do lepszego oszacowania ryzyka złośliwego charakteru zmiany jeszcze przed wykonaniem zabiegu chirurgicznego.

Przeprowadzona walidacja metod oznaczania stężenia CA 125 i HE4 testami firmy ROCHE DIAGNOSTICS, na analizatorze immunochemicznym cobas e-411 Rack, wskazuje na pełną przydatność tych metod w diagnostyce raka jajnika, ze względu na: szeroki zakres analityczny metody, bardzo dobrą precyzję (< 10%), czułość analityczną oraz dobrą powtarzalność (< 15%), niską granicę wykrywalności i oznaczalności metody.

Ostatnio przeprowadzono badania dotyczące porównania metod oznaczania stężenia CA 125 i HE4 na dwóch analizatorach dostępnych na polskim rynku diagnostycznym [26]. Oznaczenia stężenia HE4 i CA 125 wykonywano zestawami odczynnikowymi produkcji ABBOTT LABORATORIES oraz ROCHE DIAGNOSTICS na analizatorach immunochemicznych odpowiednio Architect i1000 i cobas e-411. Użyteczność diagnostyczna wyników oznaczeń stężenia CA 125 za pomocą obu systemów pomiarowych jest zbliżona, natomiast obserwuje się tendencję do wyższej użyteczności oznaczeń stężenia antygenu HE4 przy użyciu analizatora cobas e-411. Z punktu widzenia użyteczności diagnostycznej obserwowane różnice między porównywanymi systemami pomiarowymi nie mają zasadniczego znaczenia, ponieważ badania stężenia CA 125 i HE4 u poszczególnych chorych z założenia muszą być wykonywane przy użyciu zestawów odczynnikowych i analizatorów immunochemicznych pochodzących od tego samego wytwórcy.

Warto nadmienić, że analiza metody oznaczania stężeń obu markerów w surowicy i osoczu krwi wykazała możliwość zbadania jedynie stężenia HE4 w obu analizowanych materiałach biologicznych, tj. surowicy i osoczu, co znacznie ułatwi oznaczanie tego białka u pacjentek, u których występują trudności w pobraniu krwi z powodu niewidocznych lub cienkich żył. Porównanie metod oznaczania stężenia markera CA 125 w surowicy i osoczu nie wykazało możliwości zbadania tego parametru w obu materiałach. Do oznaczania stężenia markera CA 125 zaleca się zatem pobieranie krwi do próbek „na skrzep” i po odwirowaniu zbadanie go w surowicy, a nie w osoczu krwi.

W pracy podjęto próbę oceny stężeń CA 125 i HE4 w surowicy krwi kobiet z rakiem jajnika, w zależności

od typu histogenetycznego nowotworu. Stężenie HE4 nie koreluje z typem histologicznym raka jajnika.

Należy dodać, że mediany wartości Algorytmu ROMA i mediany stężenia CA 125 są najwyższe w grupie pacjentek z surowicznym rakiem jajnika. W tej grupie badanej zaobserwowano u jednej z pacjentek najwyższy wynik stężenia CA 125 i najwyższą wartość Algorytmu ROMA (odpowiednio 6564 U/ml i 99,9%). Najwyższe stężenie białka HE4 zaobserwowano u pacjentki ze śluzowym rakiem jajnika (1925 pmol/l). Z danych literaturowych wynika, że najwyższe stężenia białka HE4 obserwuje się u pacjentek z surowicznym i endometrialnym rakiem jajnika [27,28].

Uważa się, że HE4 jest markerem wskazującym na obecność przerzutów [23,29,30]. Być może wysokie stężenie tego białka u chorych na raka jajnika w III i IV stopniu klinicznego zaawansowania według FIGO związane jest z procesem tworzenia przerzutów. Jednym z celów pracy były: ocena stężeń obu markerów i wartości Algorytmów ROMA w surowicy krwi kobiet z rakiem jajnika, w zależności od stopnia klinicznego zaawansowania nowotworu i typu histogenetycznego raka jajnika, a także określenie ewentualnej korelacji między stopniem według FIGO i stopniem G a stężeniami CA 125 i HE4 oraz wartościami Algorytmu ROMA.

Wykazano statystycznie istotne dodatnie zależności między wszystkimi parametrami a stopniem klinicznego zaawansowania nowotworu według FIGO i stopniem dojrzałości histopatologicznej G raka jajnika. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że istnieje statystycznie istotna różnica między stężeniami HE4 i wartościami Algorytmu ROMA w grupie pacjentek z III i IV stopniem według FIGO w porównaniu z grupą pacjentek z I stopniem według FIGO. Warto dodać, że w I i II stopniu według FIGO obserwuje się wzrost białka HE4 ponad zakres referencyjny metody, czego nie zaobserwowano w przypadku markera CA 125.

Wydaje się zatem, że wzrost stężenia HE4 w niskich stopniach zaawansowania nowotworu znacznie wyprzedza wzrost stężenia CA 125 [23,28,29,31]. Można zatem wysunąć wniosek, że do wzrostu stężenia białka HE4 dochodzi w przypadku tworzenia się przerzutów. Zatem poszerzenie diagnostyki guzów miednicy mniejszej o oznaczanie białka HE4 i wyznaczanie Algorytmu ROMA byłoby istotnym uzupełnieniem w aspekcie aktywności procesu nowotworowego, a tym samym zwiększałoby szansę na wyleczenie pacjentek ze zdiagnozowanymi niskimi stopniami zaawansowania raka jajnika (I i II wg FIGO).

Warto dodać, że wyniki stężeń obu markerów oraz wartości Algorytmu ROMA u pacjentek z I stopniem zróżnicowania histopatologicznego nowotworu G1 były w zakresie referencyjnym odpowiednich metod oznaczania. Wyniki stężeń białka HE4 i wartości

Algorytmu ROMA u pacjentek z G2 i G3 znacznie przekraczały zakres referencyjny metody, a wyniki stężeń markera CA 125 były niższe od literaturowego punktu odcięcia. Wykazano statystycznie istotne różnice między stężeniem CA 125, stężeniem HE4 i wartościami Algorytmu ROMA w grupach pacjentek z G1 i G3.

W grupach chorych z G2 i G3 stwierdzono znamienne istotne różnice tylko między stężeniami HE4 i wartościami Algorytmu ROMA. Wydaje się zatem, że dodanie do oznaczeń stężenia CA 125 oznaczenia białka HE4 dokładniej określi szacunkowy czas przeżycia pacjentki ze zdiagnozowanymi guzami nisko zróżnicowanymi G3 i średnio zróżnicowanymi G2 niż oznaczanie wyłącznie stężenia markera CA 125 [32].

Warto byłoby rozszerzyć badania dotyczące oznaczania stężenia białka HE4 w celu monitorowania ewentualnych nawrotów i progresji nabłonkowego raka jajnika po zastosowaniu chemioterapii [29,33,34]. Zmiany stężenia HE4 równe lub większe niż 25% w surowicy krwi kobiet poddanych monitorowaniu przebiegu choroby uważa się za istotne dla stwierdzenia ewentualnych nawrotów i progresji raka jajnika.

Choroby nowotworowe od wielu lat stanowią przedmiot badań naukowców, z uwagi na indywidualny obraz tego samego nowotworu u chorych w tym samym wieku i stopniu klinicznego zaawansowania choroby. Wiąże się z tym potrzeba rozważenia indywidualizacji zastosowanego leczenia.

Należy wykorzystać analizy profilu białkowego, który mógłby przewidywać rozwój choroby i wspomóc leczenie poprzez dobór najlepszych metod terapeutycznych, a nawet odpowiednio wcześniej jej zapobiegać. Można przypuszczać, że białko HE4 znajdzie się wśród innych białek, które będą miały zastosowanie przede wszystkim w diagnostyce różnicowej guzów miednicy mniejszej i innych schorzeń ginekologicznych.

PODZIĘKOWANIA

Pani Prof. dr hab. n. med. Krystynie Olczyk za poświęcony czas i nieocenioną pomoc w powstawaniu tej pracy.

Panu dr. n. med. Rafałowi Muchackiemu, Dyrektorowi Beskidzkiego Centrum Onkologii – Szpitala Miejskiego im. Jana Pawła II w Bielsku-Białej za umożliwienie przeprowadzenia badań w podległej Mu placówce.

Firmie ROCHE DIAGNOSTICS za udostępnianie wysokiej jakości odczynników do oznaczania markerów nowotworowych.

WNIOSKI

1. U kobiet z rozpoznanym nowotworem jajnika wysokie stężenia CA 125 i HE4 w surowicy krwi oraz wysokie wartości Algorytmu ROMA wskazują na złośliwy charakter guza.
2. Stężenie CA 125 i HE4 w surowicy krwi kobiet chorych na raka jajnika oraz wartość Algorytmu ROMA zależą od czynników prognostycznych guza, tj. stopnia klinicznego zaawansowania nowotworu według FIGO oraz stopnia dojrzałości histopatologicznej G guza.
3. Oznaczanie stężeń CA 125 i HE4 oraz wyznaczenie Algorytmu ROMA jest przydatne w diagnostyce różnicowej guzów miednicy mniejszej i nowotworów narządu rodowego, tj. rak jajnika, rak trzonu macicy, oraz w diagnostyce nienowotworowych schorzeń ginekologicznych.
4. U kobiet zdrowych stężenie CA 125 i HE4 oraz wartość Algorytmu ROMA zależą od czynników ryzyka zachorowania na raka jajnika, tj. wieku i statusu menopauzalnego, natomiast nie zależą od przyjmowania leków hormonalnych. Palenie tytoniu przez kobiety wpływa wyłącznie na wynik oznaczania stężenia CA 125.
5. Analiza krzywych ROC potwierdza przydatność stosowania w diagnostyce raka jajnika łącznie obu markerów wraz z wyliczeniem Algorytmu ROMA.
6. Przeprowadzona walidacja metody oznaczania stężenia CA 125 i HE4 testami firmy ROCHE DIAGNOSTICS wskazuje na ich przydatność w raka jajnika, z uwagi na: szeroki zakres analityczny metody, bardzo dobrą precyzję i czułość analityczną oraz dobrą powtarzalność, niską granicę wykrywalności i oznaczalności metody.
7. Analiza metody oznaczania stężenia obu markerów w surowicy i osoczu krwi potwierdziła możliwość zbadania stężenia HE4 w obu materiałach biologicznych. Oznaczanie stężenia markera CA 125 należy przeprowadzać w surowicy krwi.

PIŚMIENNICTWO

1. Stempczyńska J., Potemski P. Nowotwory jajnika. W: Onkologia-podręcznik dla studentów i lekarzy. Red. R. Kordek. Medical Press, Gdańsk 2003, 190–195.
2. Partheen K., Kristjansdottir B., Sundfjeldt K. Evaluation of ovarian cancer biomarkers HE4 and CA-125 in women presenting with a suspicious cystic ovarian mass. *J. Gynecol. Oncol.* 2011; 22: 244–252.
3. Van Gorp T., Veldman J., Van Calster B. et al. Subjective assessment by ultrasound is superior to the risk of malignancy index (RMI) or risk of ovarian

malignancy algorithm (ROMA) in discriminating benign from malignant adnexal masses. *Eur. J. Cancer* 2012; 48: 1649–1656.

4. Havrilesky L.J., Whitehead C.M., Rubatt J.M. et al. Evaluation of biomarker panels for early stage ovarian cancer detection and monitoring for disease recurrence. *Gynecol. Oncol.* 2008; 110: 374–382.

5. Galgano M.T., Hampton G.M., Frierson H.F. Jr. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. *Mod. Pathol.* 2006; 19: 847–853.

6. Kurman R.J., Hedrick Ellenson L., Ronnett B.M. Blaustein's pathology of the female genital tract. Springer Sixth Edition. London 2011, 684–685.
7. Webb P.M., Purdie D.M., Grover S., Jordan S., Dick M.L., Green A.C. Symptoms and diagnosis of borderline, early and advanced epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 2004; 92: 232–239.
8. Hellström I., Raycraft J., Hayden-Ledbetter M. et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 2003; 63: 3695–3700.
9. Dahl Steffensen K., Waldström M., Brandslund I., Jakobsen A. Prognostic impact of prechemotherapy serum levels of HER2, CA125, and HE4 in ovarian cancer patients. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2011; 21: 1040–1047.
10. Lu R., Sun X., Xiao R., Zhou L., Gao X., Guo L. Human epididymis protein 4 (HE4) plays a key role in ovarian cancer cell adhesion and motility. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012; 419: 274–280.
11. Zou S.L., Chang X.H., Ye X. et al. Effect of human epididymis protein 4 gene silencing on the malignant phenotype in ovarian cancer. *Chin. Med. J.* 2011; 124: 3133–3140.
12. Bast R.C., Feeney M., Lazarus H., Nadler L.M., Colvin R.B., Knapp R.C. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J. Clin. Invest.* 1982; 5(68): 1331–1337.
13. Meyer T., Rustin G.J.S. Role of tumour markers in monitoring epithelial ovarian cancer. *Br. J. Cancer* 2000; 82: 1535–1538.
14. Rufford B., Menon U., Jacobs I. Screening for familial ovarian cancer. W: *Familial breast and ovarian cancer. Genetics, screening and management.* Ed. Morrison P.J., Hodgson S.V., Haites N.E. Cambridge University Press, Cambridge 2002, 220–233.
15. Bagan P., Berna P., Assouad J., Hupertan V., Le Pimpec Barthes F., Riquet M. Value of cancer antigen 125 for diagnosis of pleural endometriosis in females with recurrent pneumothorax. *Eur. Respir. J.* 2008; 1: 140–142.
16. Amaral V.F., Ferriani R.A., Sá M.F. et al. Positive correlation between serum and peritoneal fluid CA-125 levels in women with pelvic endometriosis. *Sao Paulo Med. J.* 2006; 124: 223–227.
17. Sarandakou A., Protonotariou E., Rizos D. Tumor markers in biological fluids associated with pregnancy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2007; 2: 151–178.
18. Jemal A., Tiwari R., Murray T. et al. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J. Clin.* 2004; 54: 8–29.
19. Pike M., Pearce C.L., Wu A.H. Prevention of cancers of the breast, endometrium and ovary. *Oncogene* 2004; 23: 6379–6391.
20. Patterson S.D., Aebersold R.H. Proteomics: the first decade and beyond. *Nat. Genet.* 2003; Suppl. 33: 311–323.
21. Molina R., Escudero J.M., Augé J.M. et al. HE4 a novel tumour marker for ovarian cancer: comparison with CA 125 and ROMA algorithm in patients with gynaecological diseases. *Tumour Biol.* 2011; 32: 1087–1095.
22. Holcomb K., Vucetic Z., Miller M.C., Knapp R.C. Human epididymis protein 4 offers superior specificity in the differentiation of benign and malignant adnexal masses in premenopausal women. *Am. J. Obstet Gynecol.* 2011; 205: 358.e1-6.
23. Nolen B., Velikokhatnaya L., Marrangoni A. et al. Serum biomarker panels for the discrimination of benign from malignant cases in patients with an adnexal mass. *Gynecol. Oncol.* 2010; 117: 440–445.
24. Kim Y.M., Whang D.H., Park J. et al. Evaluation of the accuracy of serum human epididymis protein 4 in combination with CA125 for detecting ovarian cancer: a prospective case-control study in a Korean population. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2011; 49: 527–534.
25. Andersen M.R., Goff B.A., Lowe K.A. et al. Use of a Symptom Index, CA125, and HE4 to predict ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 2010; 116: 378–383.
26. Kulpa J.K., Wójcik E., Rychlik U., Sobolewska K., Tarapacz J. HE4 i CA 125 – porównanie metod oznaczeń. *Diagn. Lab.* 2012; 48: 41–49.
27. Rein B.J., Gupta S., Dada R., Safi J., Michener C., Agarwal A. Potential markers for detection and monitoring of ovarian cancer. *J. Oncol.* 2011; 2011:U75983. doi: 10.1155/2011/475983.
28. Shah C.A., Lowe K.A., Paley P. et al. Influence of ovarian cancer risk status on the diagnostics performance of the serum biomarkers mesothelin, HE4, and CA 125. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 2009; 18: 1365–1372.
29. Anastasi E., Marchei G.G., Viggiani V., Gennarini G., Frati L., Reale M.G. HE4: a new potential early biomarker for the recurrence of ovarian cancer. *Tumour Biol.* 2010; 31(9): 113–119.
30. Halila H., Stenman W.H., Sepälä M. Ovarian cancer antigen CA 125 levels in pelvic inflammatory disease and pregnancy. *Cancer* 1986; 57: 1327–1329.
31. Urban N., Thorpe J., Karlan B.Y. et al. Interpretation of single and serial measures of HE4 and CA125 in asymptomatic women at high risk for ovarian cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2012; 21: 2087–2094.
32. Bignotti E., Ragnoli M., Zanotti L. et al. Diagnostic and prognostic impact of serum HE4 detection in endometrial carcinoma patients. *Br. J. Cancer* 2011; 104: 1418–1425.
33. Kalogera E., Scholler N., Powless C. et al. Correlation of serum HE4 with tumor size and myometrial invasion in endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.* 2012; 124: 270–275.
34. Hynninen J., Auranen A., Dean K. et al. Serum HE4 profile during primary chemotherapy of epithelial ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2011; 21: 1573–1578.