



Univerza v Mariboru

---

Medicinska fakulteta

DOKTORSKA DISERTACIJA

**ODKRIVANJE BIOLOŠKIH OZNAČEVALCEV S  
POMOČJO ORODIJ METABOLOMIKE, Z  
NAMENOM ZGODNJEGA ODKRIVANJA OBLIK  
RAKA PRI ŽENSKAH**

**Nejc KOZAR, dr. med.**

**November, 2018**



Univerza v Mariboru

---

Medicinska fakulteta

DOKTORSKA DISERTACIJA

**ODKRIVANJE BIOLOŠKIH OZNAČEVALCEV S  
POMOČJO ORODIJ METABOLOMIKE, Z  
NAMENOM ZGODNJEGA ODKRIVANJA OBLIK  
RAKA PRI ŽENSKAH**

**Nejc KOZAR, dr. med.**

**Mentor: Red. prof. dr. Iztok TAKAČ, dr. med., svetnik**

UDK 618.1-006-074:577.121+519.2/.8(043.3)

**November, 2018**



## Povzetek

### Izhodišče

Rak je ena izmed najtežjih boleznih z visoko smrtnostjo v svetovnem merilu. Kljub številnim znanstvenim odkritjem v zadnjih desetletjih, še vedno obstaja veliko neznank, kar otežuje uspešno zdravljenje. Ključnega pomena ostaja zgodnje odkrivanje bolezni, kar največ prispeva k ugodni prognozi. Namen raziskave je bil s pomočjo orodij metabolomike odkriti potencialne tumorske označevalce, ki bi bili uporabni pri zgodnjem odkrivanju raka jajčnikov, dojk ter endometrija.

### Preiskovanke in metode dela

Delo je prospektivna raziskava, v katero je bilo vključenih 15 bolnic z rakom jajčnikov, 39 bolnic z rakom dojk, 15 bolnic z rakom endometrija, 21 zdravih žensk ter 21 bolnic z benignimi ginekološkimi obolenji, ki so bile zdravljene na Kliniki za ginekologijo in perinatologijo Univerzitetnega kliničnega centra Maribor. Vsem udeleženkam smo po opravljeni diagnostiki ter določenem stadiju bolezni odvzeli vzorce krvi za kvantitativno določitev 232 metabolitov s pomočjo HPLC-TQ/MS. Z multivariatno in univariatno analizo ter metodami strojnega učenja smo nato ob primerjavi bolnic z rakavimi obolenji in zdravih posameznic identificirali metabolite, ki najbolje ločujejo obe skupini. Izbranim označevalcem smo določili še uspešnost klasifikacije z določanjem površine pod krivuljo ter ustrezne občutljivosti in specifičnosti.

### Rezultati

Pri raku jajčnikov smo identificirali 5 označevalcev iz skupine ceramidov in sfingomielinov (C16-ceramid, C22-ceramid, C24-ceramid, C18-sfingomielin, C18:1-sfingomielin), s pomočjo katerih smo uspeli ločiti skupino bolnic z rakom jajčnikov od zdravih žensk in tistih z benignimi ginekološkimi obolenji z občutljivostjo 83 %, specifičnostjo 80 % in AUC 0,920. Pri raku dojk so se za najpomembnejše izkazali 4 označevalci in sicer tetradecenoilkarnitin, tetradekanoilkarnitin, dodekanoilkarnitin in 9,12-linoleinska kislina, ki so dosegli 81 % občutljivost ob 81 % specifičnosti in AUC 0,839. Pri raku endometrija so bili 4 najpomembnejši označevalci C16-ceramid, C22-ceramid, hidroksiheksadecenoilkarnitin in 1-metiladenozin, ki so se izkazali z 93 % občutljivostjo ob 75 % specifičnosti in AUC 0,925.

## **Zaključek**

V raziskavi smo odkrili 5 pomembnih metabolnih označevalcev, s katerimi je mogoče ločiti obolele ženske od zdravih in tistih z benignimi obolenji s podobno diagnostično natančnostjo, kot jo ponuja kombinacija trenutno uporabljenih tumorskih označevalcev CA 125 in HE4. Pri raku dojke in endometrija smo odkrili pri vsakem po 4 pomembne biološke označevalce, ki po diagnostični učinkovitosti bistveno presežejo vse do sedaj uporabljene tumorske označevalce, kar pomeni velik potencial za uporabo metabolomike v diagnostiki ginekoloških rakov v prihodnosti.

## Abstract

### **Title: Metabolomic biomarker discovery for detection of early stage women's cancers**

#### **Background**

Cancer is one of the most severe diseases with high morbidity and mortality. Despite numerous scientific breakthroughs in last decades, many questions still remain unanswered which hinder successful treatment. Early diagnosis remains a key factor to a favorable prognosis. The aim of the research was an identification of potential tumor markers with the use of metabolomics that could aid in early diagnosis of ovarian, breast and endometrial cancer.

#### **Patients and methods**

The research of prospective type included 15 patients with ovarian cancer, 39 patients with breast cancer, 15 patients with endometrial cancer, 21 healthy women and 21 patients with benign gynecological diseases. All patients were recruited at the Department of gynecology and perinatology at University Medical Centre Maribor, where they received treatment. All patients were diagnosed and staged prior to recruitment. Serum blood samples were collected to quantitatively determine concentrations of 232 known metabolites using HPLC-TQ/MS. Using multivariate and univariate analysis and machine learning algorithms, best classifiers were selected. Best performing metabolites were further analysed using ROC analysis to determine their diagnostic potential.

#### **Results**

5 potential tumor markers were identified for ovarian cancer that belong to the group of ceramides and sphingomyelins (C16-ceramide, C22-ceramide, C24-ceramide, C18-sphingomyelin, C18:1-sphingomyelin) and demonstrated 83% sensitivity, 80% specificity and AUC 0.920 for discriminating ovarian cancer patients from healthy control group and patients with benign gynecological diseases. For breast cancer, 4 best performing markers were tetradecenoylcarnitine, tetradecanoylcarnitine, dodecanoylcarnitine and 9,12-linoleic acid that demonstrated 81% sensitivity, 81% specificity and AUC 0.839. For endometrial cancer, 4 best-performing markers were C16-ceramide, C22-ceramide, hidroxyhexadecenoylcarnitine and 1-methyladenosine, that demonstrated 93% sensitivity, 75% specificity and AUC 0.925.

## **Conclusion**

The research identified 5 potential tumor markers for ovarian cancer that enable similar or better diagnostic potential than currently used CA 125 and HE4. For breast and endometrial cancer, 4 markers were proposed respectively, that outperform all currently used tumor markers. Those findings propose great potential for metabolomics in discovery of early gynecological cancers.

## Kazalo vsebine

<b>Povzetek</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>Kazalo vsebine</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 Seznam kratic, uporabljenih v besedilu</b> .....	<b>9</b>
<b>1.2 Kazalo grafov</b> .....	<b>13</b>
<b>1.3 Kazalo shem</b> .....	<b>13</b>
<b>1.4 Kazalo tabel</b> .....	<b>15</b>
<b>2. Uvod</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1 Rak</b> .....	<b>17</b>
1.1.1 Ozadje raka .....	17
1.1.2 Breme raka.....	17
<b>2.2 Rak jajčnikov</b> .....	<b>19</b>
2.2.1 Etiologija in dejavniki tveganja.....	19
2.2.2 Rak jajčnikov kot diagnostični izziv.....	20
2.2.3 Breme raka jajčnikov.....	21
2.2.4 Presejanje raka jajčnikov .....	25
2.2.5 Tumorski označevalci.....	25
2.2.6 Tumorski označevalci pri raku jajčnikov .....	26
2.2.6.1 CA 125 .....	26
2.2.6.2 Karcinoembrionalni antigen (CEA) .....	27
2.2.6.3 CA 19-9.....	27
2.2.6.4 CA 15-3.....	27
2.2.6.5 CA 72-4.....	28
2.2.6.6 CYFRA 21-1 .....	28
2.2.6.7 Humani kalikrein .....	28
2.2.6.8 Vaskularni endotelijski rastni faktor (VEGF-C) .....	28
2.2.6.9 D-dimer .....	29
2.2.6.10 Alfa fetoprotein (AFP) .....	29
2.2.6.11 Laktatna dehidrogenaza (LDH) .....	29
2.2.6.12 Humani horionski gonadotropin (hCG).....	30



2.2.6.13	HE4 .....	30
<b>2.3</b>	<b>Rak dojk .....</b>	<b>31</b>
2.3.1	Etiologija in dejavniki tveganja.....	31
2.3.2	Breme raka dojk .....	33
2.3.3	Presejanje raka dojk.....	39
2.3.4	Presejanje z mamografijo.....	40
2.3.5	Učinkovitost presejanja z mamografijo .....	40
2.3.6	Državni program presejanja raka dojk DORA .....	41
2.3.7	Tumorski označevalci pri raku dojk .....	41
2.3.7.1	CA 15-3 in CEA .....	41
2.3.7.2	Hormonski receptorji.....	42
2.3.7.3	HER2.....	42
2.3.7.4	Urokinazni plazminogen aktivator (uPA).....	42
2.3.7.5	p53 .....	43
<b>2.4</b>	<b>Rak endometrija.....</b>	<b>44</b>
2.4.1	Etiologija in dejavniki tveganja.....	44
2.4.2	Breme raka endometrija.....	45
2.4.3	Presejanje raka endometrija .....	48
2.4.4	Tumorski označevalci pri raku endometrija.....	49
2.4.4.1	CA 125 .....	50
2.4.4.2	CA 15-3.....	50
2.4.4.3	CA 19-9.....	50
2.4.4.4	CEA .....	51
<b>2.5</b>	<b>Metabolomika.....</b>	<b>52</b>
2.5.1	Metabolomika kot znanost.....	52
2.5.2	Biologija sistemov.....	52
2.5.3	Metabolomika v biologiji sistemov .....	53
2.5.4	Analitične metode, uporabljene v metabolomiki.....	55
2.5.4.1	Nuklearna magnetna resonanca (NMR) .....	55
2.5.4.2	Masna spektrometrija (MS).....	56
2.5.4.3	Priprava vzorcev v metabolomiki .....	56
2.5.5	Primeri uporabe metabolomike .....	57
<b>2.6</b>	<b>Metabolomika in rak jajčnikov.....</b>	<b>58</b>
<b>2.7</b>	<b>Metabolomika in rak dojk .....</b>	<b>61</b>
<b>2.8</b>	<b>Metabolomika in rak endometrija.....</b>	<b>64</b>
<b>3.</b>	<b><i>Namen in hipoteza doktorske naloge.....</i></b>	<b>66</b>

<b>3.1</b>	<b>Hipoteza</b> .....	<b>67</b>
<b>3.2</b>	<b>Specifični cilji</b> .....	<b>67</b>
<b>4.</b>	<b>Materiali in metode</b> .....	<b>68</b>
<b>4.1</b>	<b>Bolnice</b> .....	<b>68</b>
4.1.1	Skupina bolnic z rakom jajčnikov, dojk in endometrija.....	68
4.1.1.1	Vključitveni kriteriji.....	68
4.1.1.2	Izključitveni kriteriji.....	69
4.1.1.3	Histopatološki izvid.....	69
4.1.1.4	Stopnja diferenciacije tumorja.....	69
4.1.2	Kontrolna skupina.....	69
4.1.3	Skupina z benignimi ginekološkimi obolenji.....	70
<b>4.2</b>	<b>Zbiranje vzorcev</b> .....	<b>70</b>
<b>4.3</b>	<b>Shranjevanje vzorcev</b> .....	<b>70</b>
<b>4.4</b>	<b>Transport vzorcev</b> .....	<b>71</b>
<b>4.5</b>	<b>Analiza in identifikacija metabolitov</b> .....	<b>71</b>
<b>4.6</b>	<b>Analiza vzorcev</b> .....	<b>72</b>
3.6.1	LC-MS/MS.....	72
<b>4.7</b>	<b>Analiza podatkov</b> .....	<b>72</b>
<b>4.8</b>	<b>Statistična analiza</b> .....	<b>73</b>
<b>5.</b>	<b>Rezultati</b> .....	<b>76</b>
<b>5.1</b>	<b>Rak jajčnikov</b> .....	<b>76</b>
5.1.1	Bolnice.....	76
5.1.2	Profil metabolitov.....	78
5.1.2.1	Analiza serumskega profila metabolitov s pomočjo HPLC-TQ/MS.....	78
5.1.2.2	Analiza PLS-DA.....	78
5.1.2.3	Univariatna analiza.....	79
5.1.2.4	Napovedni model.....	82
5.1.2.5	Izbor najpomembnejših označevalcev.....	82
<b>5.2</b>	<b>Rak dojk</b> .....	<b>84</b>
5.2.1	Bolnice.....	84
5.2.2	Profil metabolitov.....	85

5.2.2.1	Analiza serumskega profila metabolitov s pomočjo HPLC-TQ/MS .....	85
5.2.2.2	Analiza PLS-DA .....	85
5.2.2.3	Univariatna analiza .....	87
5.2.2.4	Napovedni model .....	89
5.2.2.5	Izbor najpomembnejših označevalcev .....	90
<b>5.3</b>	<b>Rak endometrija.....</b>	<b>91</b>
5.3.1	Bolnice.....	91
5.3.2	Profil metabolitov.....	92
5.3.2.1	Analiza serumskega profila metabolitov s pomočjo HPLC-TQ/MS .....	92
5.3.2.2	Analiza PLS-DA .....	92
5.3.2.3	Univariatna analiza .....	94
5.3.2.4	Napovedni model .....	96
5.3.2.5	Izbor najpomembnejših označevalcev .....	97
<b>6.</b>	<b>Razprava.....</b>	<b>98</b>
<b>6.1</b>	<b>Rak jajčnikov.....</b>	<b>98</b>
6.1.1	C16-ceramid.....	98
6.1.2	C22 in C24-ceramid .....	99
6.1.3	Sfingomielin.....	99
6.1.4	Potencial metabolomike pri raku jajčnikov.....	102
<b>6.2</b>	<b>Rak dojk .....</b>	<b>103</b>
6.2.1	L-karnitin.....	104
6.2.2	Acilkarnitin .....	104
6.2.3	PE 18:2/18:2 (9,12-linoleinska kislina) .....	105
6.2.4	Potencial metabolomike pri raku dojk .....	106
<b>6.3</b>	<b>Rak endometrija.....</b>	<b>108</b>
6.3.1	Cer 34:1;2 (C16-ceramid) in Cer 40:1;2 (C22-ceramid).....	109
6.3.2	Hidroksiheksadecenoilkarnitin (AC 16:1-OH).....	109
6.3.3	1-metiladenozin.....	110
6.3.4	Potencial metabolomike pri raku endometrija.....	110
<b>6.4</b>	<b>Prihodnost metabolomike .....</b>	<b>111</b>
<b>6.5</b>	<b>Omejitve raziskave.....</b>	<b>112</b>
<b>7.</b>	<b>Zaključki.....</b>	<b>114</b>
<b>8.</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>116</b>
<b>9.</b>	<b>Članek kot del doktorske disertacije .....</b>	<b>130</b>

<b>10. Priloge</b> .....	<b>131</b>
<b>10.1 Zahvala</b> .....	<b>131</b>
<b>10.2 Osebna bibliografija za obdobje 2007 – 2018</b> .....	<b>132</b>
<b>10.3 Mnenje komisije za medicinsko etiko</b> .....	<b>138</b>
<b>11. Delovni življenjepis kandidata</b> .....	<b>140</b>
<b>12. Izjava o avtorstvu in istovetnosti tiskane in elektronske oblike doktorske disertacije</b> .	<b>143</b>

### 1.1 Seznam kratic, uporabljenih v besedilu

AC – acilkarnitin

AFP – alfa fetoprotein

AMP – adenzin monofosfat

ATP – adenzin trifosfat

AUC – površina pod krivuljo (angl. *area under curve*)

BC – rak dojke (angl. *breast cancer*)

CA 125 – karcinomski antigen 125

CA 15-3 – karcinomski antigen 15-3

CA 19-9 – karcinomski antigen 19-9

CA 72-4 – karcinomski antigen 72-4

CEA – karcinoembrionalni antigen

Cer – ceramid

CerS – ceramid sintaza

CNTRL – kontrolna skupina

CoA – koencim A

CT – računalniška tomografija (angl. *computed tomography*)

CV – koeficient variacije (angl. *coefficient of variance*)

CYFRA 21-1 – citokeratinski fragment 21-1

DES – dihidroceramid desaturaza

DNK – deoksiribonukleinska kislina

DORA – Državni presejalni program za raka dojk

EC – rak endometrija (angl. *endometrial cancer*)

FIA – analiza injiciranega toka (angl. *flow injection analysis*)

FIGO – Mednarodna federacija ginekologije in porodništva

hCG – humani horionski gonadotropin

HE4 – humani protein epididimisa 4

HER2 – humani epidermalni receptor rastnega faktorja 2

HNSCC – ploščatocelični karcinom vratu in glave

HPLC-TQ/MS – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti – masna spektrometrija s trojnim kvadrupolnim analizatorjem (angl. *high performance liquid chromatography – triple quadruple / mass spectrometry*)

HPV – humani papillomavirus

HR-MAS NMR – visoko ločljivostna nuklearna magnetna resonance s spinom čarobnega kot

IARC – Mednarodna agencija za raziskave raka

ITM – indeks telesne mase

LC-MS/MS – tekočinska kromatografija z masno spektrometrijo

LDH – laktatna dehidrogenaza

MCCV – Monte Carlo navkrižno potrjevanje (angl. *Monte Carlo cross validation*)

MS – masna spektrometrija (angl. *mass spectrometry*)

NMR – nuklearna magnetna resonance (angl. *nuclear magnetic resonance*)

OC – rak jajčnikov (angl. *ovarian cancer*)

OOB – napaka izven vreče (angl. *out of bag error*)

PLS-DA – ločevalna analiza delnih najmanjših kvadratov (angl. *partial least square discriminant analysis*)

PP<sub>i</sub> – anorganski pirofosfat

QC – kontrola kakovosti (angl. *quality control*)

RCOO<sup>-</sup> - maščobne kisline z dolgimi verigami

RNK – ribonukleinska kislina

ROC – Graf natančnosti in priklica po spreminjajočem številu N (angl. *receiver operating characteristic*)

ROCA – algoritem za tveganje pojava raka jajčnikov (angl. *risk of ovarian cancer algorithm*)

S1P – sfingozin-1-fosfat

SBS - sekvenčna vzvratna selekcija (angl. *sequential backward selection*)

SK – sfingozin kinaza

SM – sfingomielin

SMaza – sfingomielinaza

SMS – sfingomielin sintaza

SVIT - državni program presejanja in zgodnjega odkrivanja predrakavih sprememb in raka na debelem črevesu in danki

SZO – Svetovna zdravstvena organizacij

TNM – system klasifikacije tumor, bezgavke, zasevki (angl. *tumor – node – metastasis*)

uPA - Urokinazni plazminogen aktivator

UPLC-MS - tekočinska kromatografija z ultra visoko ločljivostjo - masna spektrometrija

VEGF-C – vaskularni endotelijski rastni faktor C (angl. *vascular endothelial growth factor C*)

VIP – pomen spremenljivk PLS analize (angl. *variable importance for a PLS projection*)

ZORA – državni program zgodnjega odkrivanja predrakavih sprememb materničnega vratu

## 1.2 Kazalo grafov

Graf 1: Groba incidenčna stopnja raka jajčnikov za obdobje 1961–2014 <sup>5</sup> .....	22
Graf 2: Umrljivost žensk z rakom jajčnikov v Sloveniji <sup>5</sup> .....	24
Graf 3: Groba incidenčna stopnja raka dojk v Sloveniji <sup>5</sup> .....	34
Graf 4: Umrljivost žensk z rakom dojk v Sloveniji <sup>5</sup> .....	39
Graf 5: Groba incidenčna stopnja raka endometrija v Sloveniji <sup>5</sup> .....	46
Graf 6: Umrljivost žensk z rakom endometrija v Sloveniji <sup>5</sup> .....	48

## 1.3 Kazalo shem

Shema 1: Biologija sistemov.....	53
Shema 2: Potek raziskave.....	75
Shema 3: A - PLS-DA shema prikazuje ločevanje med rakom jajčnikov in kontrolno skupino, temelječe na setu 219 analiziranih označevalcev. B - Prikaz vpliva različnih označevalcev na grupiranje vzorcev raka jajčnikov (metaboliti, ki so bolj oddaljeni od izhodišča, imajo večjo napovedno vrednost). Povzeto po Kozar in sod. (2018).....	79
Shema 4: ROC krivulje in škatle z brki (angl. <i>boxplot</i> ) prikazi univariatne analize za najboljših 5 označevalcev ob primerjavi raka jajčnikov in zdrave kontrolne skupine.....	81
Shema 5: ROC krivulji, ki prikazujeta A: Površino pod krivuljo AUC za set 49 najpomembnejših označevalcev pri razlikovanju med skupino z rakom jajčnikov in zdravo kontrolno skupino in B: AUC za 5 najpomembnejših označevalcev pri razlikovanju med skupino z rakom jajčnikov in zdravo kontrolno skupino. Povzeto po Kozar in sod. (2018)....	82
Shema 6: PLS-DA shema prikazuje ločevanje med rakom dojk in kontrolno skupino, temelječe na setu 219 analiziranih označevalcev. B: Prikaz vpliva različnih označevalcev na grupiranje vzorcev raka jajčnikov (metaboliti, ki so bolj oddaljeni od izhodišča, imajo večjo napovedno vrednost).....	86
Shema 7: ROC krivulje in škatle z brki (angl. <i>boxplot</i> ) prikazi univariatne analize za najpomembnejše 4 označevalce (A–D) ob primerjavi raka dojk in zdrave kontrolne skupine.....	88



Shema 8: ROC krivulja, ki prikazuje površino pod krivuljo »AUC« za set 4 najpomembnejših označevalcev pri razlikovanju med skupino z rakom dojk in zdravo kontrolno skupino. ....	89
Shema 9: A - Shema PLS-DA prikazuje ločevanje med rakom endometrija in kontrolno skupino, temelječe na setu 219 analiziranih označevalcev. B - Prikaz vpliva različnih označevalcev na grupiranje vzorcev raka endometrija (metaboliti, ki so bolj oddaljeni od izhodišča, imajo večjo napovedno vrednost).....	93
Shema 10: Krivulje ROC in škatle z brki, ki prikazujejo univariatno analizo za najpomembnejše 4 označevalce (A–D) ob primerjavi raka endometrija in zdrave kontrolne skupine.....	95
Shema 11: Krivulja ROC, ki prikazuje površino pod krivuljo AUC za set 4 najpomembnejših označevalcev pri razlikovanju med skupino z rakom endometrija in zdravo kontrolno skupino. ....	96
Shema 12: Metabolna pot sfingolipidov.....	101
Shema 13: Od karnitina odvisen transport maščobnih kislin. Povzeto po Bremer (1983) <sup>190</sup> .	104

## 1.4 Kazalo tabel

Tabela 1: GLOBOCAN 2012 predvidena incidenca raka jajčnikov <sup>6</sup> .....	21
Tabela 2: 5-letno preživetje pacientk z rakom jajčnikov glede na FIGO stadij bolezni <sup>17</sup> .....	23
Tabela 3: GLOBOCAN 2012 Umrljivost žensk z rakom jajčnikov <sup>16</sup> .....	24
Tabela 4: GLOBOCAN 2012 predvidena incidenca raka dojk <sup>16</sup> .....	33
Tabela 5: TNM klasifikacija raka dojk, uporabljena v raziskavi.....	36
Tabela 6: FIGO stadij glede na TNM klasifikacijo s pripadajočimi podatki o 5-letnem preživetju <sup>7</sup> .....	37
Tabela 7: Stopnja umrljivosti žensk z rakom dojk <sup>16</sup> .....	38
Tabela 8: GLOBOCAN 2012 predvidena incidenca raka endometrija <sup>16</sup> .....	46
Tabela 9: 5-letno preživetje pacientk z rakom endometrija glede na FIGO stadij bolezni <sup>17</sup> ....	47
Tabela 10: GLOBOCAN 2012 stopnja umrljivosti žensk z rakom endometrija <sup>16</sup> .....	48
Tabela 11: Metaboliti, identificirani kot potencialni tumorski označevalci pri raku jajčnikov. .....	60
Tabela 12: Metaboliti, identificirani kot potencialni tumorski označevalci pri raku dojk. ....	63
Tabela 13: Metaboliti, identificirani kot potencialni tumorski označevalci pri raku endometrija. .....	65
Tabela 14: Klinično-patološke značilnosti bolnic z rakom jajčnikov.....	77
Tabela 15: Označevalci razvrščeni glede na njihovo diskriminatorno moč po izračunih PLS- DA.....	79
Tabela 16: Diagnostična vrednost posameznih označevalcev glede na izračun univariatne analize.....	80
Tabela 17: Klinično-patološke značilnosti bolnic z rakom dojk.....	84
Tabela 18: Označevalci razvrščeni glede na njihovo diskriminatorno moč po izračunih PLS- DA.....	86
Tabela 19: Diagnostična vrednost posameznih označevalcev glede na izračun univariatne analize.....	87
Tabela 20: Klinično-patološke značilnosti bolnic z rakom endometrija.....	91
Tabela 21: Označevalci razvrščeni glede na njihovo diskriminatorno moč po izračunih PLS- DA.....	93

Tabela 22: Diagnostična vrednost posameznih označevalcev glede na izračun univariatne analize.....	94
----------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## 2. Uvod

### 1.1 Rak

#### 1.1.1 Ozadje raka

Rak predstavlja skupek povezanih bolezni. Skupno jim je to, da pride pri vrsti celic do delitve brez omejitev ter širjenje v okolna tkiva. Rak se lahko prične v praktično vseh tkivih človeškega telesa, ki ga po ocenah sestavlja  $3,72 \times 10^{13}$  celic<sup>1</sup>.

Običajno se celice delijo glede na potrebe organizma in se tako primerno obnavljajo. Ob pojavu raka se poruši razmerje med proliferacijo celic in apoptozo, tako celice preživijo in ob tem dobivajo nenormalne značilnosti, medtem ko na drugi strani nastajajo nove celice, ki jih organizem ne potrebuje<sup>2</sup>.

Bistvene lastnosti raka zajemajo šest bioloških sposobnosti, pridobljenih tekom razvoja tumorjev v več ločenih korakih. Te lastnosti zajemajo vztrajajočo proliferativno signalizacijo, izogibanje zaviranju rasti, upiranje celični smrti, omogočanje delitvene nesmrtnosti, spodbujanje angiogeneze ter aktivacijo invazije in zasevanja. Za temi lastnostmi je izjemnega pomena nestabilnost genoma, ki vodi v gensko raznolikost, ta pa le še pospešuje pridobivanje novih lastnosti rakavih celic. Poleg genske nestabilnosti so dolgo opisovali še vnetje kot pomemben dejavnik v razvoju raka<sup>3</sup>.

V zadnjem desetletju se pojavljata še dve bistveni lastnosti raka, in sicer reprogramiranje energetskega metabolizma in izogibanje uničenju s strani imunskega odziva. Poleg rakastih celic imajo tumorji še dodatno dimenzijo kompleksnosti, saj vsebujejo poleg rakasto spremenjenih celic še nabor praviloma normalnih celic, ki ustvarjajo tumorsko mikrookolje in s tem pripomorejo k ustreznim pogojem za rast tumorja<sup>4</sup>.

#### 2.1.2 Breme raka

Breme raka lahko izrazimo na način incidence, prevalence in smrtnosti. Incidenca pomeni število novih primerov v danem obdobju, običajno znotraj omejene populacije. Incidenco izrazimo kot število novih primerov na 100.000 prebivalcev letno. Podobno kot za incidenco tudi za smrtnost raka uporabljamo enaka izražanja, in sicer število umrlih na 100.000

prebivalcev znotraj populacije v obdobju enega leta. Za razliko od omenjenih, prevalenca pomeni absolutno število obolelih znotraj določenega obdobja. Obstajajo tudi druga merila za breme raka, kot so izgubljena leta življenja, ter leta življenja, izgubljena z invalidnostjo.

Omenjena merila so pomembna za spremljanje in obvladovanje rakavih obolenj ter predstavljajo pomemben vir informacij o potrebah prebivalstva po ustrezni zdravstveni in paliativni oskrbi.

Incidenca raka se nanaša na tveganje za pojav raka v populaciji. Nanjo pomembno vplivajo preventivni ukrepi, ki temeljijo na uravnavanju izpostavljenosti populacij dejavnikom tveganja, kot je na primer zmanjšanje uživanja alkohola in tobaka, cepljenja proti humanim papilomavirusom (HPV), izboljšanje telesne kondicije, prehranske navade populacij, zgodnje odkrivanje predrakavih sprememb, kot so pri nas programi DORA, ZORA in SVIT<sup>5, 6</sup>.

Večina držav vodi lastne registre raka, kjer spremljajo omenjene osnovne kazalce, ki opisujejo breme raka v populaciji. Pri nas imamo register raka Republike Slovenije, ki velja za enega najpopolnejših registrov raka v svetovnem merilu. Register vodi podatke za slovensko populacijo in za bolnike s stalnim bivališčem na območju Republike Sloveniji, ne glede na to, kje so bili zdravljeni oziroma kje so umrli. Register raka RS je bil ustanovljen leta 1950. Podatke redno posreduje Mednarodni agenciji za raziskave raka (IARC), ki deluje pod okriljem Svetovne zdravstveni organizaciji (SZO), ki podoben register vodi na svetovnem nivoju in zajema podatke 225 registrov raka iz 60 držav. V sklopu IARC obstaja program GLOBOCAN, ki pripravlja sodobne ocene o incidenci, prevalenci in smrtnosti raka, podatki iz registrov namreč zamujajo več let, zato je potrebno za sodobnejše rezultate uporabiti ocene.

## 2.2 Rak jajčnikov

Rak jajčnikov je bolezen s slabim preživetjem, predvsem zaradi običajno poznega odkrivanja bolezni v višjih stadijih. Predstavlja vodilni vzrok smrti med ginekološkimi malignimi obolenji. Ena izmed 75 žensk bo tekom življenja zbolela za rakom jajčnikov in ena izmed 100 bo zaradi tega umrla<sup>7</sup>. 75 % žensk z rakom jajčnikov odkrijemo v stadijih, višjih od I, pri čemer trenutno nimamo učinkovite strategije presejanja, ki bi lahko zanesljivo zaznala bolezen v zgodnejših stadijih<sup>6-8</sup>.

### 2.2.1 Etiologija in dejavniki tveganja

Rak jajčnikov se smatra kot ena sama bolezen, vendar obstaja vedno več podatkov, da gre pri raku jajčnikov za raznolike tumorje, ki se razlikujejo tako po morfologiji kot prognozi, etiologiji in molekularnih lastnostih.

Rak jajčnikov delimo na štiri histološke podtipe, seroznega, ki je tudi najpogostejši, endometrioidnega, mucinoznega in svetloceličnega. Pri vsakem podtipu ločimo nizko ali visoko stopnjo diferenciacije, (angl. *low-high grade*). Veliko večino diagnostiranih rakov jajčnikov predstavlja serozni karcinom visoke stopnje diferenciacije. Pri omenjenem najpogosteje najdemo mutacijo gena TP53, približno 50 % tumorjev predstavlja nepravilno homologno rekombinacijo, kot posledico mutacij BRCA, epigenetske inaktivacije genov BRCA ali nepravilnosti v genih za popravilo DNA. V opisanih tumorjih najdemo spremenjeno število somatskih kopij genov, nekateri izmed njih pomembno vplivajo na prognozo bolezni. Med temi so pogoste mutacije NOTCH, RAS/MEK, PI3K in FOXM1. Drugi histološki podtipi so povezani z drugim spektrom mutacij. Serozni karcinom nizkega gradusa ima pogostejše mutacije BRAF in RAS, mucinozni karcinomi pa imajo mutacije ARID1A, PIK3CA, PTEN, CTNNB1 in RAS. Veliko raziskav je bilo usmerjeno v matične celice jajčnikov, glede na prisotne nekatere označevalce, kot so CD133, CD44, CD117, CD24, LY6A in ALDH1. Rakaste celice jajčnikov imajo prirojeno plastičnost, kar pojasnjuje, zakaj najdemo v tumorju običajno več kot samo eno celično subpopulacijo, kar je lahko tudi povod za nastanek rakavega obolenja<sup>9</sup>.

Poznavanje populacije z visokim tveganjem je v zadnjih letih izpostavilo distalni del jajcevoda kot glavni vir pojava tako zgodnjega seroznega raka jajčnikov, kot tudi jajcevodov in peritoneja. Pod termin epitelijski karcinom jajčnikov sodi široka paleta različnih, vendar med seboj podobnih rakov. Prva skupina karcinomov zajema naslednje histološke tipe: endometrioidni, mucinozni, svetlocelični, borderline in serozni karcinom nizke stopnje diferenciacije. Za endometrioidni in svetlocelični karcinom obstaja prepričanje, da morda izvirata iz endometrioze jajčnikov. Jajcevodi, maternica, maternični vrat in zgornji del nožnice embrionalno izvirajo iz Müllerjevih vodov (paramezonefričnih), medtem ko jajčniki izvirajo iz primordialnih zarodnih celic in okolnjega povrhnjega epitelijskega. Kot vir karcinoma sumijo tudi Müllerjeve vključke v skorji jajčnikov, obstajajo namreč morfološki dokazi o postopnih spremembah v jajčnikih, ki gredo od vključkov v skorji do cistadenofibromov, do mejno malignih tumorjev in nato v serozne karcinome nizkega gradusa. Primarne neoplazme Müllerjevih struktur verjetno nastanejo iz celic, pridobljenih tekom reproduktivnega obdobja z možnostjo prehoda epitelijskih celic iz jajcevodov ali endometrija<sup>10,11</sup>.

### 2.2.2 Rak jajčnikov kot diagnostični izziv

V diagnostiki raka jajčnikov poleg klinične in slikovne obravnave uporabljamo še serumske koncentracije tumorskega antigena CA 125, ki predstavlja najpogosteje uporabljan tumorski označevalec za rak jajčnikov<sup>6-8</sup>. CA 125 ni specifičen za rak jajčnikov. Medtem ko povišane koncentracije CA 125 niso prisotne pri vseh ženskah z rakom jajčnikov, lahko najdemo povišane vrednosti tako pri drugih malignih obolenjih (rak trebušne slinavke, rak dojke, rak mehurja, rak jeter in pljučni rak), kot tudi pri benignih obolenjih, kot so miomi, benigne ciste jajčnikov in endometrioza<sup>12</sup>. Drug pogosto uporabljan tumorski označevalec je HE4, ki se je izkazal za bolj občutljivega, še posebej v kombinaciji s CA 125, vendar tudi omenjena kombinacija ni dovolj občutljiva in specifična za zanesljivo postavitev diagnoze v zgodnjem stadiju<sup>13,14</sup>.

Trenutno se raziskuje širok spekter bioloških tumorskih označevalcev. Eno izmed pomembnih interesnih sfer je ravno področje metabolomike, za katerega raziskovalci verjamejo, da predstavlja odlično možnost za odkrivanje fenotipskih značilnosti, povezanih z biološko funkcijo, še posebej tam, kjer gre za komaj zaznavne spremembe<sup>15</sup>.

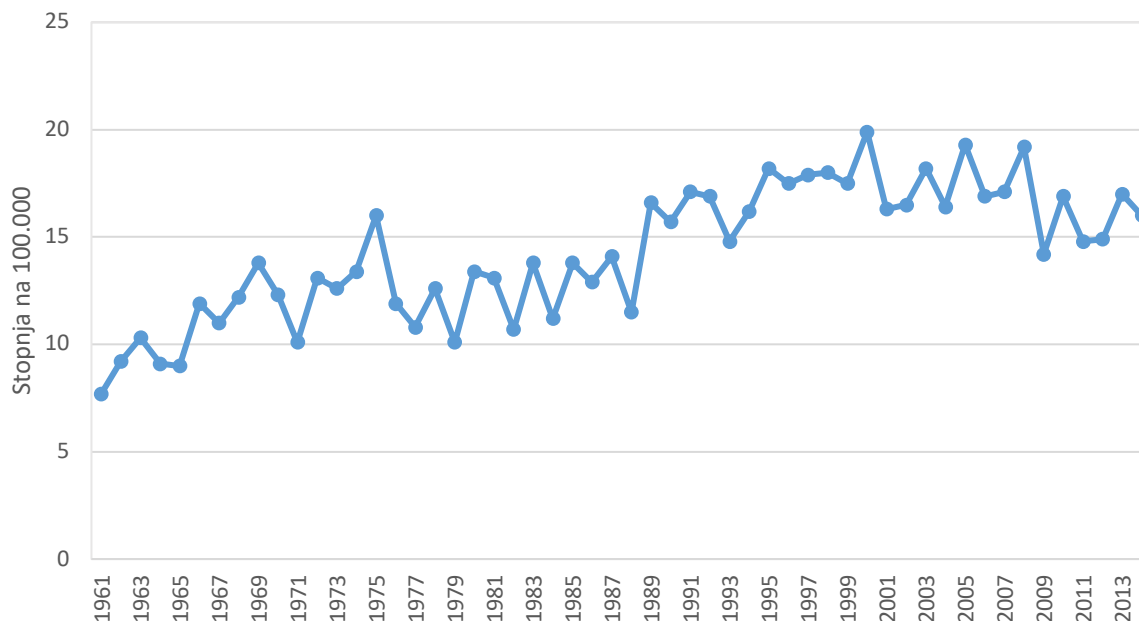
### 2.2.3 Breme raka jajčnikov

Rak jajčnikov ne velja za najbolj pogost rak, vendar je kljub temu povezan z visoko smrtnostjo. Leta 2012 je po ocenah IARC (angl. *International agency for research on cancer*) globalno za rakom jajčnikov zbolelo 238.719 žensk, kar pomeni 6,8 novih primerov na 100.000 prebivalk. Incidenca raka jajčnikov se močno razlikuje glede na geografsko regijo in populacijo. V afriški regiji je tako ocenjena incidenca 3,0 na 100.000 prebivalk, medtem ko znaša ta številka v Ameriki (Severni in Južni) 8,6 na 100.000 prebivalk, v Evropi pa kar 15,1 na 100.000 prebivalk (tabela 1)<sup>6</sup>. Slovenski podatki kažejo na incidenco 16,0 na 100.000 prebivalk, kar je primerljivo z incidencami v drugih razvitih državah (graf 1)<sup>5</sup>.

POPULACIJA	ŠTEVILO	GROBA STOPNJA	STAROSTNO STANDARDIZIRANA STOPNJA
Svet	238.719	6,8	6,1
Razvite regije	99.752	15,6	9,1
Nerazvite regije	138.967	4,9	5,0
Zelo visok indeks človekovega razvoja	84.723	14,5	8,5
Visok indeks človekovega razvoja	45.263	8,5	7,3
Srednji indeks človekovega razvoja	87.421	5,0	4,7
Nizek indeks človekovega razvoja	21.203	3,3	4,7
WHO afriška regija	13.034	3,0	4,5
WHO ameriška regija	41.450	8,6	6,8
WHO vzhodno Sredozemlje	12.354	4,1	5,3
WHO evropska regija	70.320	15,1	9,4
WHO jugovzhodna azijska regija	46.636	5,1	5,5
Svet	54.888	6,1	4,8
Razvite regije	117.325	9,0	7,0
Nerazvite regije	10.276	4,7	5,5
Zelo visok indeks človekovega razvoja	17.755	3,3	4,8
Visok indeks človekovega razvoja	12.705	2,9	4,5
Srednji indeks človekovega razvoja	5.907	3,3	5,5

Tabela 1: GLOBOCAN 2012 predvidena incidenca raka jajčnikov<sup>6</sup>.





Graf 1: Groba incidenčna stopnja raka jajčnikov v Sloveniji za obdobje 1961–2014<sup>5</sup>.

Več kot 90 % raka jajčnikov je epiteljskega izvora, sledijo stromalni tumorji s 5–6 % in germinalni tumorji z 2–3 %, kar velja za razvite države, medtem ko v manj razvitih delih sveta delež germinalnih tumorjev naraste do 10–15 %.

Rak jajčnikov ima zelo slabo prognozo, kar je, kot že omenjeno, predvsem posledica poznega odkrivanja bolezni v višjih stadijih. Celokupno 5-letno preživetje je manj kot 50 %. Po zadnjih podatkih registra raka Republike Slovenije je bilo leta 2010 ocenjeno 5-letno preživetje žensk z rakom jajčnikov 44,3 %, kar se je le nekoliko spremenilo od leta 1991, ko je znašalo 40,2 %<sup>5</sup>. Umrljivost žensk z rakom jajčnikov v Sloveniji je prikazana na grafu 2, medtem ko tabela 3 prikazuje umrljivost žensk z rakom jajčnikov po različnih regijah<sup>5, 16</sup>.

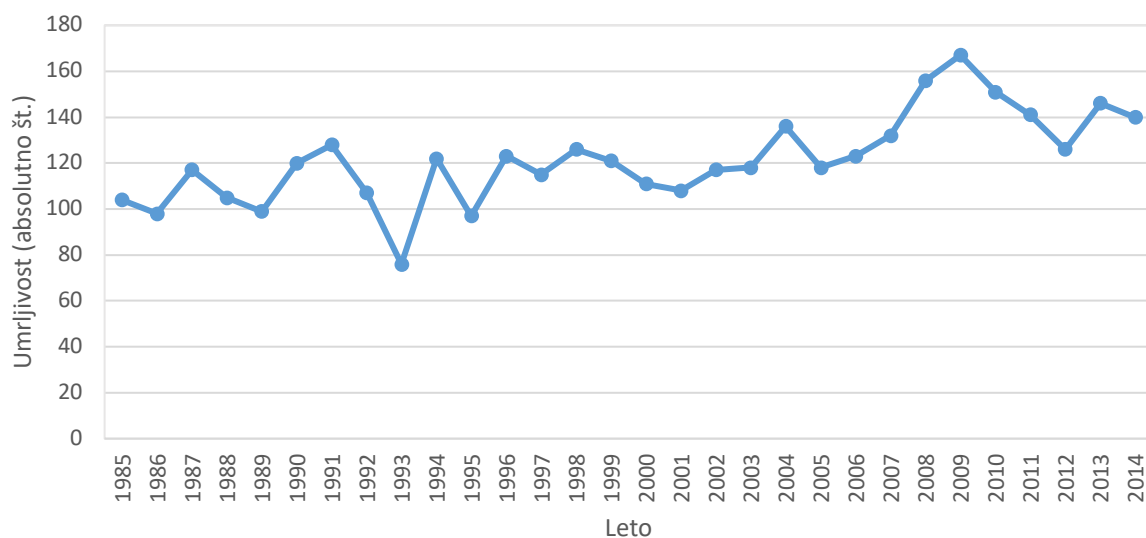
Visoka umrljivost žensk z rakom jajčnikov je predvsem posledica slabe prognoze osnovne bolezni v primerjavi z drugimi ginekološkimi raki.

Preživetje se sicer močno razlikuje glede na stadij v katerem rak odkrijemo. 5-letno preživetje znaša pri stadiju I 90 %, pri stadiju II 70 %, pri stadiju III 39 % in le 17 % v primeru oddaljenih zasevkov. 75 % raka jajčnikov se odkrije v stadijih, višjih od I in II, kot je prikazano v tabeli 2<sup>8, 16</sup>. Umrljivost žensk z rakom jajčnikom v Sloveniji je prikazana na grafu 2<sup>5</sup>.

PRIMARNI TUMOR	FIGO	RAZŠIRJENOST BOLEZNI	5-LETNO PREŽIVETJE
----------------	------	----------------------	--------------------

<b>T0</b>		Brez znakov bolezni	/
<b>T1</b>	I	Tumor omejen na jajčnike (en ali oba)	85–94 %
<b>T1A</b>	IA	Tumor omejen na en jajčnik, kapsula intaktna, brez tumorja na površini jajčnika, brez malignih celic v ascitesu oziroma izpirku	94 %
<b>T1B</b>	IB	Tumor omejen na oba jajčnika, kapsula intaktna, brez tumorja na površini jajčnika, brez malignih celic v ascitesu oziroma izpirku	92 %
<b>T1C</b>	IC	Tumor omejen na enega ali oba jajčnika z eno izmed naslednjih lastnosti: ruptura kapsule, tumor na površini jajčnika, maligne celice v ascitesu oziroma izpirku	85 %
<b>T2</b>	II	Tumor zajema en ali oba jajčnika in se širi v malo medenico	69–78 %
<b>T2A</b>	IIA	Širitev tumorja v maternico in ali jajcevod(a); brez malignih celic v ascitesu oziroma izpirku	78 %
<b>T2B</b>	IIB	Širitev tumorja v druga tkiva male medenice; brez malignih celic v ascitesu oziroma izpirku	73 %
<b>T2C</b>	IIC	Širitev tumorja in/ali implanti (T2a ali T2b) z malignimi celicami v ascitesu oziroma izpirku	69 %
<b>T3</b>	III	Tumor vključuje en ali oba jajčnika z mikroskopskimi zasevki peritoneja zunaj male medenice	17–59 %
<b>T3A</b>	IIIA	Mikroskopski zasevki na peritoneju izven male medenice	59 %
<b>T3B</b>	IIIB	Makroskopski zasevki na peritoneju 2 cm ali večje	39 %
<b>T3C</b>	IIIC	Makroskopski zasevki na peritoneju 2 cm ali večje in/ali zasevki v področnih bezgavkah	17 %
<b>T4</b>	IV	Maligne celice v pleuralnem izlivu, parenhimski zasevki ali zasevki izven abdomna	12 %

Tabela 2: 5-letno preživetje pacientk z rakom jajčnikov glede na FIGO stadij bolezni<sup>17</sup>.



Graf 2: Umrlijivost žensk z rakom jajčnikov v Sloveniji<sup>5</sup>.

POPULACIJA	ŠTEVILO	GROBA STOPNJA	STAROSTNO STANDARDIZIRANA STOPNJA
Svet	151.917	4,3	3,7
Razvite regije	65.904	10,3	5,0
Nerazvite regije	86.013	3,0	3,1
Zelo visok indeks človekovega razvoja	56.491	9,7	4,6
Visok indeks človekovega razvoja	27.944	5,3	4,3
Srednji indeks človekovega razvoja	51.422	3,0	2,8
Nizek indeks človekovega razvoja	15.987	2,5	3,9
Who afriška regija	9.758	2,2	3,6
Who ameriška regija	28.466	5,9	4,3
Who vzhodno sredozemlje	8.708	2,9	4,0
Who evropska regija	45.945	9,9	5,2
Who jugovzhodna azijska regija	32.854	3,6	4,0
Svet	26.163	2,9	2,1
Razvite regije	79.876	6,1	4,4
Nerazvite regije	7.034	3,2	3,9
Zelo visok indeks človekovega razvoja	13.085	2,4	3,8
Visok indeks človekovega razvoja	9.576	2,2	3,7
Srednji indeks človekovega razvoja	4.462	2,5	4,4

Tabela 3: GLOBOCAN 2012 Umrlijivost žensk z rakom jajčnikov<sup>16</sup>.

#### 2.2.4 Presejanje raka jajčnikov

Poskusi presejanja asimptomatske, zgodnje oblike bolezni v primeru raka jajčnikov so bili v veliki meri vezani na trenutno razumevanje karcinogeneze tega raka.

Obstajata dve populaciji žensk, pri katerih gre za povečano tveganje za razvoj raka jajčnikov, na podlagi česa so bili opravljeni poskusi presejanja z namenom odkrivanja zgodnjih rakavih sprememb (Nezhat 2015, Menon 2014, Lowry 2017)<sup>18-20</sup>:

1. Splošna populacija – ženske, stare več kot 50 let brez obremenilne družinske anamneze
2. Populacija z visokim tveganjem – ženske, stare več kot 35 let z družinsko anamnezo raka dojk ali jajčnikov.

Ženske, pri katerih je sorodnica v prvem kolenu obolela za rakom dojk ali jajčnikov, imajo celokupno 10 % povišano tveganje za razvoj raka jajčnikov. Večji del tega tveganja lahko pojasnimo z znanimi mutacijami BRCA1 in BRCA2. Mutacija BRCA1 predstavlja celokupno tveganje za pojav bolezni 40–50 %, medtem ko mutacija BRCA2 pomeni 11–26 % tveganje za pojav raka jajčnikov tekom življenja. Trenutne strategije za presejanje raka jajčnikov vključujejo uporabo tumorskih označevalcev ter transvaginalnega ultrazvoka.

Znano je, da presejanje lahko odkrije rak jajčnikov v zgodnjih stadijih, vendar še ni dovolj podatkov, ki bi nakazovali na zmanjšanje smrtnosti oziroma izboljšanje kakovosti življenja<sup>18-20</sup>.

#### 2.2.5 Tumorski označevalci

Tumorski označevalci so molekule, ki jih je mogoče kvantitativno meriti in lahko z določeno stopnjo zanesljivosti nakazujejo na prisotnost tumorja. V praksi gre za antigene, citokine, hormone, encime in rastne dejavnike. Označevalci se lahko pojavljajo tako v tkivu, kot v serumu, plazmi in drugih tkivih, kar je s kliničnega stališča običajno še bolj uporabno. V klinični praksi se uporabljajo v diagnostične namene, kot tudi za spremljanje odgovora na zdravljenje. Za tumorske označevalce je izjemnega pomena lahka dostopnost do biološkega materiala, kot tudi visoka senzitivnost in specifičnost.

## 2.2.6 Tumorski označevalci pri raku jajčnikov

Trenutno so v ginekološki onkologiji pri raku jajčnikov prisotni naslednji tumorski označevalci:

### 2.2.6.1 CA 125

V ginekologiji velja CA 125 za enega najpomembnejših tumorskih označevalcev. Gre za protein, znan tudi pod imenom mucin 16 ali MUC16, ki ga kodira gen MUC16<sup>21</sup>. MUC16 se nahaja v roženici in veznici, v respiratornem traktu in epiteliju ženskih spolnih organov. Opravlja funkcijo lubrikanta in bariere proti tujim delcem<sup>22</sup>.

Klinično lahko povišane vrednosti CA 125 zaznamo v primeru endometrijskega karcinoma, karcinoma jajcevodov, karcinoma materničnega vratu ter pri ne-ginekoloških rakih, kot je pljučni rak, limfom in rak dojk. Povišane vrednosti CA 125 lahko najdemo tudi pri benignih ginekoloških obolenjih, kot je pelvična vnetna bolezen, miomi maternice in endometrijoza<sup>12</sup>.

CA 125 je zelo koristen in uporabljan v predoperativni diagnostiki adneksalnih tumorjev, kot tudi v spremljanju po zdravljenju bolnic z rakom jajčnikov. Podatki kažejo, da je CA 125 povišan pri približno 50 % epiteljskih karcinomih jajčnikov v stadiju I in v 90 % pri napredovalem raku, ko je uporabljena mejna vrednost 35 IE/L<sup>23</sup>.

Občutljivost CA 125 za rak jajčnikov znaša 88,2 %, medtem ko je opisana specifičnost 67,4 %. Opisane vrednosti veljajo za pomenopavzne ženske<sup>24</sup>. Nizka specifičnost je posledica že omenjenega povišanja CA 125 pri benignih ginekoloških obolenjih.

V zadnjem desetletju je bilo veliko poskusov interpretacije označevalca CA 125 v kontekstu presejanja, kjer so poskušali upoštevati tako starost, kot spremembo nivoja CA 125 s časom<sup>25</sup>. Primer poskusa izboljšanja občutljivosti CA 125 je ROCA (angl. *Risk of Ovarian Cancer Algorithm*), ki je pokazal, da je specifičnost naraščajočega označevalca CA 125 višja kljub splošno nizkim koncentracijam, kot je specifičnost statične visoke koncentracije CA 125<sup>26</sup>.

V raziskavah so omenjeni tudi drugi tumorski označevalci za rak jajčnikov, vendar se do sedaj še noben ni dosegel specifičnosti in občutljivosti CA 125. V raziskavi, ki je proučevala učinkovitost serije 35 tumorskih označevalcev v vzorcih raka prostate, pljuč, debelega črevesa

in jajčnikov, je bil najuspešnejši CA 125, nato so mu sledili HE4, transtiretin, CA 15-3 in CA 72-4<sup>27</sup>.

#### 2.2.6.2 Karcinoembrionalni antigen (CEA)

CEA je onkofetalni glikoprotein, ki ga najdemo v povišanih koncentracijah v primeru epiteljskega raka jajčnikov, kot tudi pri kolorektalnem raku. Kot tumorski označevalec ima stopnjo zaznavanja 25 % in pozitivno napovedno vrednost 14 % za rak jajčnikov. CEA se uporablja predvsem kot dodatek k CA 125 in pomaga tam, kjer je slednji v normalnih koncentracijah, po drugi strani pa pripomore k izboljšani diagnostični učinkovitosti, kadar se uporablja v kombinaciji s CA 125<sup>28, 29</sup>.

#### 2.2.6.3 CA 19-9

CA 19-9 je intracelularna adhezijska molekula, ki se lahko kaže v povišanih serumskih koncentracijah predvsem v primerih raka trebušne slinavke in biliarnega sistema. Ima sicer visoko občutljivost pri odkrivanju mucinoznega epiteljskega karcinoma jajčnikov<sup>30</sup>. Raziskava Kyunga (2014) je pokazala, da je CA 19-9 v primerih borderline oziroma malignih tumorjev povišan v 57,9 %, medtem ko je bil pri benignih tumorjih povišan le v 16,7 % primerov<sup>31</sup>.

#### 2.2.6.4 CA 15-3

CA 15-3 je antigen iz ogljikovih hidratov, ki se v povišanih serumskih koncentracijah pojavlja predvsem pri raku dojk, lahko pa tudi pri raku jajčnikov. Občutljivost CA 15-3 za odkrivanje zgodnjega raka jajčnikov znaša 38 % ob 95 % specifičnosti<sup>32</sup>. CA 15-3 se prav tako ni izkazal pri pomembnem izboljšanju diagnostične učinkovitosti v kombinacijah z drugimi tumorskimi označevalci<sup>33</sup>.

#### 2.2.6.5 CA 72-4

CA 72-4 je glikoproteinski antigen z visoko molekulske maso in se lahko pojavlja v povišanih serumskih koncentracijah pri adenokarcinomih, kot je kolorektalni karcinom, adenokarcinom želodca, trebušne slinavke, endometrijskem karcinomu ali adenokarcinomu jajčnikov. Ob 95 % specifičnosti ima občutljivost 68 %, kar je že blizu označevalcu CA 125<sup>32</sup>. CA 72-4 v kombinaciji s CA 125 ni prispeval k pomembnemu izboljšanju diagnostične učinkovitosti<sup>33</sup>.

#### 2.2.6.6 CYFRA 21-1

CYFRA 21-1 sodi med citokeratine, natančneje, gre za delec citokeratina 19, ki je topen v serumu in se lahko uporabi kot tumorski označevalec<sup>34</sup>. Sicer ne gre za pogosto uporabljen tumorski označevalec pri raku jajčnikov. Raziskave so pokazale slabo diagnostično in prognostično napovedno vrednost<sup>33</sup>.

#### 2.2.6.7 Humani kalikrein

Humani kalikreinski sistem je znan po povezavah s številnimi, z rakom povezanimi procesi, kot je uravnavanje celične rasti, angiogeneza, invazija in zasevanje. Nekatere raziskave nakazujejo, da ga je mogoče uporabiti kot tumorski označevalec pri epitelijem raku jajčnikov. Ocenjena senzitivnost kalikreina ob 96 % specifičnosti je znašala 60 %<sup>35</sup>. Poleg diagnostične vrednosti je opisana tudi potencialna vrednost kalikreina kot napovednega dejavnika pri napredovalem raku jajčnikov<sup>36</sup>.

#### 2.2.6.8 Vaskularni endotelijski rastni faktor (VEGF-C)

VEGF-C velja za najbolj učinkovit dejavnik v uravnavanju limfangiogeneze. Ob tem so raziskave pokazale pomembno povišano serumsko koncentracijo VEGF-C pri bolnicah z epitelijem raku jajčnikov v primerjavi s tistimi z benignimi ginekološkimi obolenji, kot tudi povezavo s koncentracijo VEGF-C in preživetjem<sup>37</sup>.

#### 2.2.6.9 D-dimer

Nivoji D-dimerja so povišani pri številnih rakih, vključno z epiteljskim rakom jajčnikov. Kljub številnim raziskavam je razumevanje prognostične vrednosti D-dimerja še vedno pomanjkljivo, vendar velja prepričanje, da so višje koncentracije povezane s slabšim preživetjem, kar je lahko tudi posledica povezave D-dimerja in trombemboličnih zapletov<sup>38</sup>.

#### 2.2.6.10 Alfa fetoprotein (AFP)

Alfa fetoprotein je protein fetalnega izvora, ki se lahko poviša pri ne-ginekoloških oblikah raka, kot je hepatocelularni karcinom, kot tudi pri ginekoloških rakih, kot je tumor endodermalnega sinusa, embrionalni karcinom ali nezrel teratom. Izkazal se je za izjemno uporabnega v diagnostiki in sledenju tumorjev endodermalnega sinusa<sup>39</sup>.

#### 2.2.6.11 Laktatna dehidrogenaza (LDH)

Glikolitični encim laktatna dehidrogenaza se nahaja v praktično vseh živih celicah. Katalizira pretvorbo laktata v piruvat in nazaj, kot tudi nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) iz oksidirane v reducirano obliko (NADH). LDH je lahko povišan pri germinalnih tumorjih jajčnikov, še posebej pri disgerminomu jajčnikov, in se lahko popolnoma normalizira po končanem primarnem zdravljenju<sup>40</sup>.

LDH ima pomembno prognostično napovedno vrednost pri številnih rakih, še posebej pri karcinomu ledvic, melanomu, karcinomu želodca, prostate, nazofarinksa in pri pljučnem raku. Višje vrednosti LDH pomenijo slabše celokupno preživetje<sup>41</sup>.



#### 2.2.6.12 Humani horionski gonadotropin (hCG)

Dobro poznano beta podenoto hCG v glavnem proizvaja trofoblastno tkivo in je tako v prvi vrsti biološki označevalec v diagnostiki gestacijske trofoblastne bolezni in pomemben v spremljanju odziva na zdravljenje<sup>42</sup>.

#### 2.2.6.13 HE4

HE4 (humani protein epididimisa 4) je eden izmed novejših tumorskih označevalcev v diagnostiki raka jajčnikov, ki se odlikuje predvsem pri razlikovanju malignih sprememb jajčnikov od benignih. Občutljivost označevalcev za HE4 in CA 125 znaša 78 % in 63 % ob 95 % specifičnosti ter 88 % za ROMA index (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm). HE4 in ROMA indeks sta se izkazala kot bistveno učinkovitejša od samega CA 125 pri razlikovanju med malignimi in benignimi obolenji jajčnikov<sup>43, 44</sup>.

## 2.3 Rak dojk

Rak dojk je ob neupoštevanju nemelanomskega raka kože prepričljivo najpogostejši rak pri ženskah in prizadane kar 11,9 % odraslih žensk. Leta 2012 je bilo po ocenah obolelih skoraj poldrugi milijon žensk, kar je povzročilo približno pol milijona smrti<sup>16</sup>. Za razliko od nekaterih drugih rakov pri raku dojk obstajajo številne možnosti zgodnjega odkrivanja ter zdravljenja bolezni, kar je skozi leta vodilo v pomembno izboljšanje preživetja bolnic<sup>45, 46</sup>.

Rak dojk je zelo heterogena bolezen, kar predstavlja poseben izziv tako za diagnostiko, kot zdravljenje, zato je a dobre rezultate pomembno natančno poznavanje bolezni, kot tudi multidisciplinarni pristop<sup>47</sup>.

### 2.3.1 Etiologija in dejavniki tveganja

Rak dojk se v večini primerov pojavi kot maligni tumor v izvodilih ali lobulih, ki sodelujejo v proizvodnji mleka. Vzrok raka dojk ni natančno pojasnjen, vendar so znani številni dejavniki tveganja, ki vključujejo družinsko obremenjenost, naraščajočo starost, debelost, uporabo alkohola ter izpostavljenost estrogenom. Še posebej pomemben dejavnik tveganja je znana mutacija genov BRCA1 in BRCA2<sup>48</sup>. Slednja sta velika tumor zavirajoča gena, ki se nahajata na kromosomih 17 in 13. Dedujeta se avtosomno dominantno in imata visoko stopnjo penetrance, kar pomeni pomembno zvišanje incidence z BRCA povezanimi raki pri družinah, ki so nosilci genov<sup>49</sup>.

Podatki metaanalize kažejo, da imajo ženske s prisotno mutacijo BRCA1 kar 65 % verjetnost, da zbolijo za rakom dojk še pred starostjo 70 let, tiste z mutacijo BRCA2 pa 45 % verjetnost<sup>50</sup>.

Večina raka dojk je epiteljskega izvora, torej karcinomov. Kljub temu, da se rak dojk smatra kot ena bolezen, ima več podtipov, ki se bistveno razlikujejo tako po mikroskopski, kot tudi klinični sliki. Najpogostejša raka sta duktalni karcinom in lobularni karcinom, ki se delita še naprej na karcinom *in situ* ter infiltrativni karcinom.

Duktalni karcinom *in situ* (DCIS) sestavljajo maligne epiteljske celice, ki se nahajajo znotraj izvodil v dojki. Za DCIS je značilna specifična rast in celične značilnosti, ne pa anatomsko

lokacija v dojki. Za razliko od infiltrativnega duktalnega karcinoma so pri DCIS celice omejene z bazalno membrano izvodil. Za DCIS je torej značilno, da se rakave celice niso razširile preko bazalne membrane. Takšen tip karcinoma ima po dogovoru stadij 0<sup>51</sup>.

Najpogostejša oblika raka dojk je invazivni duktalni karcinom, ki predstavlja okoli 80 % vseh primerov<sup>52</sup>. Invazivni duktalni karcinom lahko za razliko od karcinoma *in situ* vrašča v druga tkiva dojke, krvne in limfne žile in se tako širi v regionalne bezgavke ali celo naprej po celotnem telesu. Tumorje delimo še glede na stopnjo diferenciacije tumorskega tkiva. To pri raku dojk pomeni semikvantitativno ocenjevanje morfoloških značilnosti in predstavlja cenovno ugodno ter učinkovito metodo, ki velja za pomemben napovedni dejavnik za potek bolezni. Stopnja diferenciacije oziroma gradus se ocenjuje glede na stopnjo tvorbe tubulov oziroma žlez, celični pleomorfizem in število mitoz<sup>53</sup>.

Pri dveh tretjinah primerov invazivnega duktalnega karcinoma so prisotni estrogenski ali progesteronski receptorji, kar pomeni njihovo odzivnost na dotične hormone, kar s pridom izkoriščamo tudi pri zdravljenju<sup>54</sup>.

Med 15 % in 20 % raka dojk izraža receptor tirozin protein kinaze erbB-2 oziroma krajše HER2, kar izvira iz angleškega imena *human epidermal growth factor receptor 2* ki se nahaja na kromosomu 17q12. HER2 vpliva na celično proliferacijo in preživetje. Pomnožitev gena HER2 vodi v povečano ekspresijo receptorja in je pomemben dejavnik v razvoju ter napredovanju raka dojk. Predstavlja pomembno terapevtsko tarčo in nudi dodatne možnosti zdravljenja, zato se v številnih smernicah priporoča določitev HER2 statusa v okviru primarne diagnostike ob odkritju raka<sup>55</sup>.

Drugi najpogostejši tip raka dojk predstavlja invazivni lobularni karcinom, ki ima v primerjavi z duktalnim karcinomom večjo tendenco bilateralnega in multicentričnega pojavljanja. Običajno se pojavlja pri starejših ženskah, ima pozitivne estrogenske receptorje in je pogosteje višjega gradusa kot duktalni karcinom. Pri 55 % do 100 % lobularnih karcinomov vidimo odsotnost izražanja E-kadherina. Mutacija CDH1/E-kadherin je zaznavna pri 12 % do 83 % primerov tega podtipa raka. Pri patogenezi lobularnega karcinoma so bile opisane mutacije PIK3CA, TP53, FOXA1, FGFR1, ZNF703 in BCAR4<sup>56</sup>.

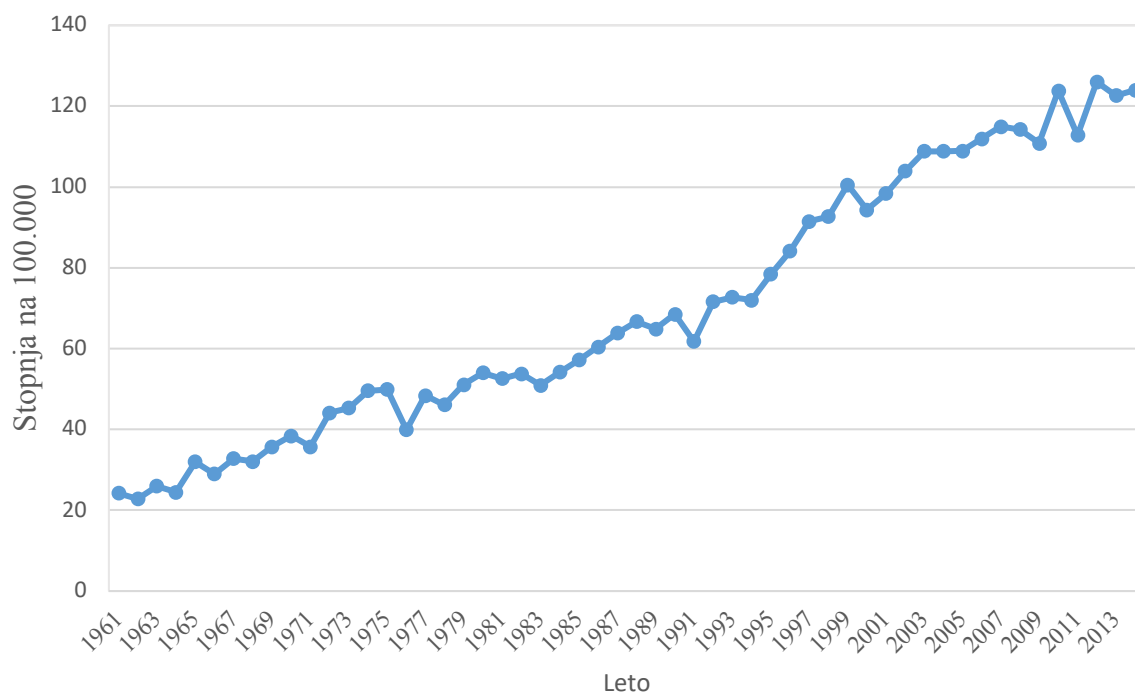
Poleg opisanih najpogostejših podtipov raka dojk obstajajo še številni drugi, kot je tubularni karcinom, invazivni mikropapilarni karcinom, metaplastični karcinom, adenoidni cistični karcinom, mucinozni karcinom in medularni karcinom, ki se pojavljajo bistveno redkeje<sup>57</sup>.

### 2.3.2 Breme raka dojk

Rak dojk je drugi najpogostejši rak v globalnem merilu in najpogostejši rak pri ženskah z ocenjeno incidenčno stopnjo 1,67 milijonov novih primerov v letu 2012, kar predstavlja eno četrtno vseh rakov<sup>16</sup>. Je najpogostejši rak pri ženskah tako v razvitem svetu (788.200), kot v nerazvitih regijah (882.949), incidenca je prikazana v tabeli 4<sup>16</sup>. V Sloveniji smo leta 2014 zabeležili 124 novih primerov raka dojk na 100.000 prebivalk, medtem ko je bilo za primerjavo leta 1994 72 novih primerov na 100.000 prebivalk. Groba incidenčna stopnja raka dojk v Sloveniji je predstavljena v grafu 3<sup>5</sup>.

	<b>POPULACIJA</b>	<b>ŠTEVILO</b>	<b>GROBA STOPNJA</b>	<b>STAROSTNO STANDARDIZIRANA STOPNJA</b>
<b>Svet</b>	1.671.149	47,8	43,1	
<b>Razvite regije</b>	788.200	123,2	73,4	
<b>Nerazvite regije</b>	882.949	30,9	31,3	
<b>Zelo visok indeks človekovega razvoja</b>	747.203	128,0	78,2	
<b>Visok indeks človekovega razvoja</b>	281.687	53,2	45,2	
<b>Srednji indeks človekovega razvoja</b>	493.807	28,5	26,5	
<b>Nizek indeks človekovega razvoja</b>	147.415	22,7	32,6	
<b>WHO afriška regija</b>	99.760	22,7	34,5	
<b>WHO ameriška regija</b>	408.281	84,6	67,6	
<b>WHO vzhodno Sredozemlje</b>	99.284	32,6	41,9	
<b>WHO evropska regija</b>	494.076	106,2	66,5	
<b>WHO jugovzhodna azijska regija</b>	239.612	26,4	27,8	
<b>WO zahodno-pacifiška regija</b>	329.762	36,8	28,6	
<b>IARC članice (24 držav)</b>	934.832	71,9	56,9	
<b>Bližnji Vzhod in Severna Afrika</b>	81.997	37,3	43,0	
<b>Afrika</b>	133.890	25,0	36,2	
<b>Podsaharska Afrika</b>	94.378	21,8	33,8	

Tabela 4: GLOBOCAN 2012 predvidena incidenca raka dojk<sup>16</sup>.



Graf 3: Groba incidenčna stopnja raka dojk v Sloveniji<sup>5</sup>.

Rak dojk je peti najpogostejši vzrok smrti med vsemi raki in po oceni za leto 2012 zahteva 522.000 življenj. Medtem ko predstavlja najpogostejši vzrok smrti zaradi raka pri ženskah v državah v razvoju (324.000 smrti letno, 14,3 % vseh smrti zaradi raka), je trenutno drugi vzrok smrti po pogostnosti v razvitem svetu (198.000 smrti letno, 15,4 %), takoj za pljučnim rakom<sup>16</sup>. V Sloveniji smo leta 2014 beležili 379 smrti zaradi raka dojk, primerjalno jih je bilo leta 1994 370<sup>5</sup>.

Preživetje bolnic z rakom dojk se močno razlikuje glede na stadij bolezni. Za določanje stadija smo v raziskavi uporabili TNM klasifikacijo tumorjev in nato določitev stadija po sistemu FIGO (tabela 5 in 6). Umrljivost bolnic za rakom dojk globalno in v Sloveniji je prikazana v tabeli 7 in na grafu 4.

<b>PRIMARNI TUMOR (T)</b>	
<b>TX</b>	Primarnega tumorja ni mogoče oceniti
<b>T0</b>	Brez znakov za primarni tumor
<b>TIS</b>	Karcinom <i>in situ</i>
<b>TIS (DCIS)</b>	Duktalni karcinom <i>in situ</i>
<b>TIS (LCIS)</b>	Lobularni karcinom <i>in situ</i> .
<b>TIS (PAGET)</b>	Pagetova bolezen bradavice, ki ni povezana z invazivnim karcinomom.
<b>T1</b>	Tumor v največjem premeru meri $\leq 20$ mm.
<b>T1MI</b>	Tumor največjem premeru meri $\leq 1$ mm.
<b>T1A</b>	Tumor v največjem premeru meri med 1 in 5 mm.
<b>T1B</b>	Tumor v največjem premeru meri med 5 in 10 mm.
<b>T1C</b>	Tumor $> 10$ mm in $\leq 20$ mm največjem premeru.
<b>T2</b>	Tumor v največjem premeru meri med 20 in 50 mm.
<b>T3</b>	Tumor v največjem premeru meri več kot 50 mm.
<b>T4</b>	Tumor katerekoli velikosti z direktnim širjenjem v steno prsnega koša in/ali v kožo.
<b>T4A</b>	Širjenje v steno prsnega koša preko prsne mišice.
<b>T4B</b>	Ulceracije in/ali ipsilateralni satelitni vozlički in/ali oteklina kože, ki ne izpolnjuje kriterijev za vnetni karcinom.
<b>T4C</b>	T4a in T4b.
<b>T4D</b>	Vnetni karcinom.
<b>REGIONALNE BEZGAVKE (N)</b>	
<b>NX</b>	Regionalnih bezgavk ni mogoče oceniti (npr. predhodno odstranjene).
<b>N0</b>	Brez zasevkov v regionalnih bezgavkah.
<b>N1</b>	Zasevki v premičnih bezgavkah iste strani I. in II. nivoja.
<b>N2</b>	Zasevki v bezgavkah iste strani I. in II. nivoja, ki so nepremične, oziroma zasevki v internih mamarnih bezgavkah iste strani brez prizadetosti pazdušnih bezgavk.

<b>N2A</b>	Zasevki v pazdušnih bezgavkah iste strani I. in II. nivoja, ki so fiksirane.
<b>N2B</b>	Zasevki v internih mamarnih bezgavkah iste strani brez prizadetih pazdušnih bezgavk I. in II. nivoja.
<b>N3</b>	Zasevki in infraklavikularni regiji iste strani (nivo III pazdušnih bezgavk) z ali brez prizadetosti drugih bezgavk.
<b>N3A</b>	Zasevki v infraklavikularni regiji iste strani.
<b>N3B</b>	Zasevki v internih mamarnih bezgavkah in pazdušnih bezgavkah iste strani.
<b>N3C</b>	Zasevki v supravlavikularni regiji iste strani.
<b>ODDALJENI ZASEVKI</b>	
<b>(M)</b>	
<b>M0</b>	Brez znakov za oddaljene zasevke.
<b>CM0(I+)</b>	Brez kliničnih ali radioloških znakov za oddaljene zasevke, vendar z znaki tumorskih celic v krvi, kostnem mozgu ali depoziti v drugih tkivih, ki so večji od 0,2 mm pri bolnicah brez simptomov in znakov za zasevke.
<b>M1</b>	Oddaljeni zasevki, ugotovljeni radiološko ali histološko, ki so večji od 0,2 mm.

Tabela 5: TNM klasifikacija raka dojke, uporabljena v raziskavi.

Za opredeljevanje stadija bolezni je široko uporabljan sistem TNM, (angl. *tumor-node-metastasis*), ki za določitev stadija upošteva velikost primarnega tumorja, stanje bezgavk in morebitne oddaljene zasevke. Sočasno ob TNM se za ginekološke rake uporablja še sistem FIGO določanja stadijev, ki jih deli na osnovne I-IV stadije, nato pa le-te deli še v natančneje definirane podskupine. Sistema FIGO in TNM sta odlični primer standardizacije, saj so zaradi tovrstne klasifikacije podatki z vseh koncev sveta popolnoma primerljivi.

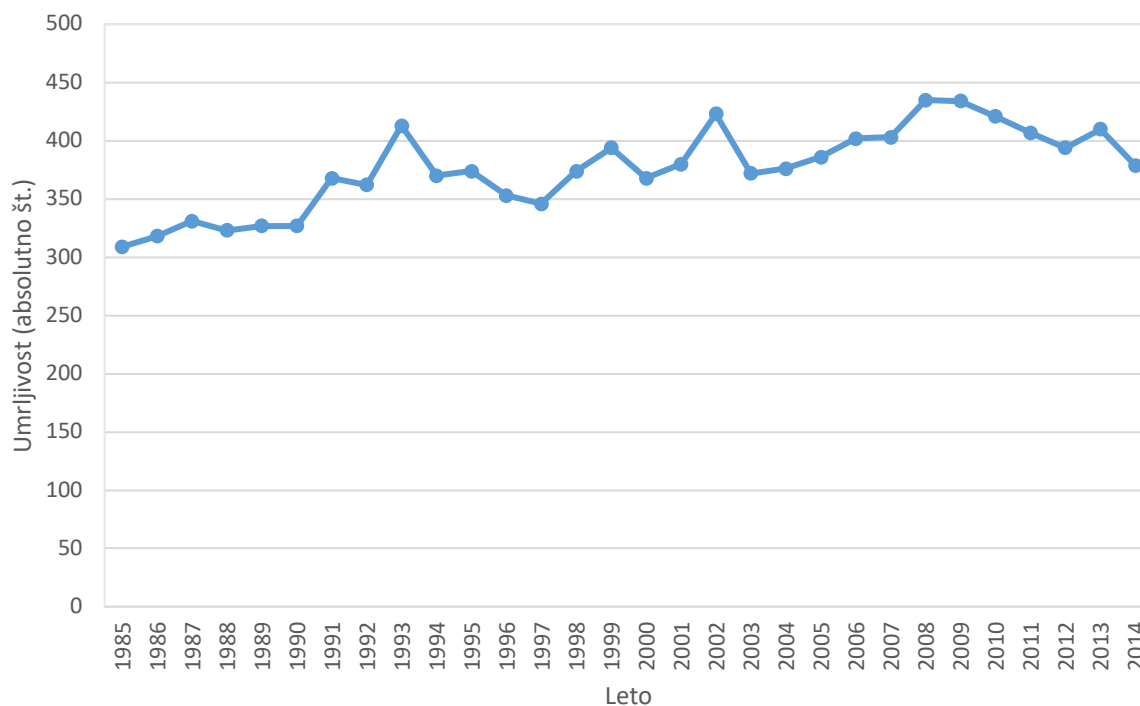
<b>FIGO STADIJ</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>5-LETNO PREŽIVETJE</b>
<b>0</b>	Tis	N0	M0	/
<b>IA</b>	T1	N0	M0	98,6 %
<b>IB</b>	T0	N1mi	M0	
	T1	N1mi	M0	
<b>IIA</b>	T0	N1	M0	84,9 %
	T1	N1	M0	
	T2	N0	M0	
<b>IIB</b>	T2	N1	M0	
	T3	N0	M0	
<b>IIIA</b>	T0	N2	M0	60 %
	T1	N2	M0	
	T2	N2	M0	
	T3	N1	M0	
	T3	N2	M0	
<b>IIIB</b>	T4	N0	M0	
	T4	N1	M0	
	T4	N2	M0	
<b>IIIC</b>	Vsi T	N3	M0	
<b>IV</b>	Vsi T	Vsi N	M1	25,9 %

Tabela 6: FIGO stadij glede na TNM klasifikacijo s pripadajočimi podatki o 5-letnem preživetju<sup>7</sup>.



<b>POPULACIJA</b>	<b>ŠTEVILO</b>	<b>GROBA STOPNJA</b>	<b>STAROSTNO STANDARDIZIRANA STOPNJA</b>
Svet	1.671.149	47,8	43,1
Razvite regije	788.200	123,2	73,4
Nerazvite regije	882.949	30,9	31,3
Zelo visok indeks človekovega razvoja	747.203	128,0	78,2
Visok indeks človekovega razvoja	281.687	53,2	45,2
Srednji indeks človekovega razvoja	493.807	28,5	26,5
Nizek indeks človekovega razvoja	147.415	22,7	32,6
WHO afriška regija	99.760	22,7	34,5
WHO ameriška regija	408.281	84,6	67,6
WHO vzhodno Sredozemlje	99.284	32,6	41,9
WHO evropska regija	494.076	106,2	66,5
WHO jugovzhodna azijska regija	239.612	26,4	27,8
WHO zahodno-pacifiška regija	329.762	36,8	28,6
IARC članice (24 držav)	934.832	71,9	56,9
Bližnji Vzhod in Severna Afrika	81.997	37,3	43,0
Afrika	133.890	25,0	36,2
Podsaharska Afrika	94.378	21,8	33,8
Svet	33.472	18,9	30,4

Tabela 7: Stopnja umrljivosti žensk z rakom dojke<sup>16</sup>.



Graf 4: Umrlijivost žensk z rakom dojk v Sloveniji<sup>5</sup>.

### 2.3.3 Presejanje raka dojk

Pri raku dojk je, kot tudi pri večini drugih rakov, za dobro prognozo izredno pomembno odkrivanje bolezni v zgodnjih stadijih. Kot je že opisano v tabeli stadijev, 5-letno preživetje drastično upade ob napredovali bolezni, s prvotnih 98,6 % za bolezen, omejeno na dojko, na 25,9 % v primeru napredovale bolezni<sup>58</sup>. Zaradi velike pogostnosti raka dojk in bistvene razlike v preživetju glede na stadij bolezni, so že v sredini 20. stoletja pričeli s prvimi poskusi presejanja s pomočjo rentgenskih žarkov oziroma mamografije, ki so pokazali tendenco zniževanja umrljivosti bolnic<sup>59</sup>. Od zgodnjih 80. let so se presejalni programi pričeli naglo širiti po Severni Ameriki in Evropi, nato pa kmalu še po drugih delih sveta, kjer je bila mamografska diagnostika dosegljiva. Poleg samega mamografskega presejanja je bilo veliko truda vloženega še v osveščanje žensk o rednem mesečnem samopregledovanju dojk.

### 2.3.4 Presejanje z mamografijo

Sodobno presejanje raka dojk se opravlja s sodobnimi mamografskimi napravami, namenjenimi izključno dojkam, ki so sposobne ustvariti podrobno rentgensko sliko dojke z minimalno količino prejetega obsevanja. V zadnjih letih se je mamografsko slikanje na rentgenski papir v veliki meri že preselilo na digitalne naprave, ki ustvarjajo le elektronske slike, ob tem pa nudijo primerljivo ali celo boljšo diagnostično učinkovitost<sup>60</sup>. Presejalni programi običajno vključujejo ženske med 50. in 70. letom starosti in jih obravnavajo na dve leti, medtem ko nekateri zajemajo že ženske od 40. leta naprej s krajšimi intervali (12-18 mesecev), starejše ženske pa z daljšimi intervali (4–36 mesecev)<sup>61–64</sup>. V zadnjih letih se v presejalne namene uporablja še magnetna resonanca in ultrazvočne metode, sploh pri ženskah, nosilkah genskih mutacij (npr. BRCA1 in BRCA2) z visokim tveganjem za razvoj bolezni ali pri tistih, kjer zaradi gostote dojke mamografija ni dovolj učinkovita<sup>65</sup>.

### 2.3.5 Učinkovitost presejanja z mamografijo

Učinkovitost presejanja raka dojk z mamografijo je podkrepljena s številnimi randomiziranimi raziskavami, ki kažejo, da lahko presejalni programi zmanjšajo umrljivost za vsaj 20 %. Do sedaj je bilo izvedenih in opravljenih 8 kontroliranih, randomiziranih raziskav v Združenih državah Amerike, Švedski in Veliki Britaniji. Prva tovrstna raziskava je bila raziskava HIP (Health Insurance Plan) v zvezni državi New York, ki je vključevala 62.000 žensk, starih od 40 do 64 let; polovica teh je opravljala redne letne preglede z mamografijo. Umrljivost zaradi raka dojk se je v tej skupini zmanjšala za 22 %<sup>66</sup>.

Leta 2016 objavljena metaanaliza je obravnavala podatke o učinkovitosti presejanja za rak dojk pri ženskah z zmernim tveganjem za pojav bolezni in pri tem potrdila zmanjšano umrljivost, pri čemer so bile razlike glede na starost udeleženk<sup>67</sup>. Podatki so bili uporabljeni za izračun zmanjšanja smrtnosti na 10.000 žensk, pregledanih letno v obdobju 10 let. Zmanjšanje umrljivosti glede na starostno obdobje je bilo naslednje:

- 39–49 let: 2,8 smrti / 10.000
- 50–59 let: 7,7 smrti / 10.000
- 60–69 let: 21,3 smrti / 10.000
- 70–74 let: 12,5 smrti / 10.000

Skupno zmanjšanje umrljivosti za starostno skupino 50–69 let je znašalo 12,5 smrti / 10.000. Rezultat za starostno skupino 39–49 let se ni statistično pomembno razlikoval od kontrolne skupine, kar pomeni, da ni bilo zmanjšanja umrljivosti v tej skupini žensk.

Od uvedbe presejalnih programov za zgodnje odkrivanje raka dojk se je povečala incidenca raka dojk in sorazmerno znižala incidenca razširjene bolezni s slabšo prognozo, vendar se ob tem opaža pogosto odkrivanje majhnih tumorjev, ki sicer ne bi vodili v napredovalo bolezen in gre tako sicer za ustrezno diagnosticirano bolezen, ki pa ne prinaša klinične koristi<sup>68</sup>.

### 2.3.6 Državni program presejanja raka dojk DORA

V Republiki Sloveniji imamo uveljavljen državni program za presejanje raka dojk DORA, ki se na Onkološkem inštitutu v Ljubljani izvaja od leta 2008. Sprva je bila v okviru programa aktivna ena sama stacionarna enota na Onkološkem inštitutu, nato so leta 2010 aktivirali dve mobilni enoti za preostalo Slovenijo. Od leta 2013 program deluje še v Univerzitetnem kliničnem centru v Mariboru, nato so leta 2014 odprli še enoti v Zdravstvenem domu Ljubljana (Metelkova) in Zdravstvenem domu Adolfa Drolca v Mariboru.

Program DORA trenutno vabi ženske v starosti med 50 in 69 let. Od svojih začetkov (21. aprila 2008) je bilo v program povabljenih 102.500 žensk, povabilu se jih je odzvalo 78 %, nekatere že večkrat, skupaj je bilo opravljenih 118.017 mamografij in odkritih 805 primerov raka dojk.

### 2.3.7 Tumorski označevalci pri raku dojk

Pri raku dojk so sicer opisani številni tumorski označevalci, ki pa imajo zelo slabo občutljivost in specifičnost, zato nimajo pomembnega mesta v presejanju ali diagnostiki. V nasprotju z diagnostiko pa imajo nekateri tumorski označevalci pomembno napovedno vrednost za napredovanje bolezni in so s tega stališča klinično zelo uporabni za pomoč pri izbiri ustreznega zdravljenja<sup>69</sup>.

#### 2.3.7.1 CA 15-3 in CEA

Tumorski označevalec CA 15-3 je najpogosteje uporabljan označevalec v obravnavi raka dojk. Gre za mucinozni antigen, ki je molekula glikoproteinov z veliko molekularno maso. Njegovo drugo ime je MUC1. Njegova vloga naj bi bila v celični adheziji in povišane vrednosti so običajno povezane s prisotnostjo zasevkov<sup>70</sup>.

CA 15-3 se ne priporoča za uporabo v presejalne namene. Uporablja se zgolj kot dopolnilo k drugim kliničnim metodam za zgodnje odkrivanje raka dojk. V raziskavi je Molina s sodelavci pokazal, da je CA 15-3 skupaj s CEA povišan v 40 % primerih bolnic z rakom dojk v času diagnoze<sup>71</sup>.

Oba označevalca sta se izkazala za uspešnejša v odkrivanju metastatske bolezni. Kombinacija CA 15-3 in CEA je tako pokazala 64 % občutljivost za ponovitev raka dojk z že prisotnimi zasevki<sup>71</sup>.

#### 2.3.7.2 Hormonski receptorji

Progesteronski in estrogenski receptorji sodijo med tkivne označevalce s pomembno prognostično vrednostjo. Zaradi njihove napovedne vrednosti in posledičnih terapevtskih možnosti, se po številnih svetovnih smernicah rutinsko določajo pri vseh bolnicah z rakom dojk; tiste s pozitivnimi hormonskimi receptorji namreč lahko prejmejo hormonsko zdravljenje, ki se je izkazalo za zelo učinkovito<sup>54</sup>.

#### 2.3.7.3 HER2

Onkogen za humani epidermalni rastni faktor (angl. HER2) kodira receptor za epidermalni rastni faktor. HER2 predstavlja pomemben prognostični dejavnik, ki bi se naj rutinsko določal pri vseh odkritih rakah dojk. Za HER2 pozitivne ženske obstaja učinkovito zdravilo trastuzumab, monoklonalno protitelo, ki se veže na HER2 receptor in s tem zavira celično rast, migracijo in diferenciacijo. Testiranje onkogenega HER2 je pomembno za odkrivanje podskupine bolnic, pri katerih bi lahko bilo uspešno zdravljenje s trastuzumabom<sup>55, 72, 73</sup>.

#### 2.3.7.4 Urokinazni plazminogen aktivator (uPA)

Urokinazni plazminogen aktivator (uPA) in urokinazni plazminogen aktivator inhibitor 1 (PAI-1) se lahko uporabljata za identifikacijo bolnic, pri katerih se bolezen še ni razširila na bezgavke, in tako pri njih kemoterapija ne bi imela pozitivnega učinka. Bolnice z boleznijo brez zajetih bezgavk, z nizkimi vrednostmi uPA in PAI-1, imajo nizko tveganje za ponovitev bolezni<sup>74, 75</sup>.

#### 2.3.7.5 p53

p53 je dobro znan tumor zaviralni gen, katerega produkt je eden izmed glavnih mehanizmov v uravnavanju rasti celic ter preprečevanju razvoja raka. Inaktivacija tega gena vodi v prekomerno izražanje proteina p53. Povišane vrednosti p53 so pogosto prisotne pri raku dojk, vendar podobne vrednosti opazamo tudi pri številnih drugih rakih, kar močno omejuje klinično vrednost p53 tako v diagnostične, kot v prognostične namene<sup>76</sup>.

## 2.4 Rak endometrija

Rak endometrija je najpogostejši ginekološki rak pri ženskah v razvitih državah (če med ginekološke rake ne štejemo rak dojk), prav tako pa četrti najpogostejši rak pri ženskah in peti najpogostejši rak globalno s približno 287.100 primerov letno<sup>58, 77</sup>.

### 2.4.1 Etiologija in dejavniki tveganja

90 % raka endometrija (tip I) je endometrijskih adenokarcinomov, medtem ko preostale ne-endometrioidne rake (tip II) sestavljajo papilarni serozni karcinom, svetlocelični karcinom, papilarni endometrijski karcinom in mucinozni karcinom<sup>78</sup>. Tip raka pomembno vpliva na sam potek bolezni. Velika večina karcinomov tipa I (80 %) je ob odkritju omejena na maternico, medtem ko ta delež pade na 50 % v primeru svetloceličnega in na 37 % v primeru seroznega karcinoma<sup>79, 80</sup>.

Podobne razlike so tudi v 5-letnem preživetju. Ta pri tipu I znaša okoli 90 %, pri tipu II pade na 36–46 %<sup>80</sup>.

Delitev raka endometrija na tip I in tip II obsega tudi različne molekularne spremembe, ki so povezane z različnimi patogenezi. Pri endometrioidnem karcinomu je najpogostejša genska napaka inaktivacija tumor supresorskega gena PTEN in je prisotna pri 55 % primerov raka tipa I<sup>81</sup>.

Inaktivacija tumor supresorskega gena PTEN se običajno zgodi v zgodnji karcinogenezi endometrijskega karcinoma in nudi prednost pri proliferaciji v estrogeno bogatem okolju. V nasprotju pa progesteron deluje zaviralno na PTEN mutirane celice<sup>82, 83</sup>.

Drug možen dogodek v zgodnji karcinogenezi endometrijskega karcinoma je inaktivacija mehanizma popravljanja neujemanja, (angl. *mismatch repair*), ki se pojavi pri 20–35 % sporadičnih endometrijskih karcinomov in je glavni etiološki dejavnik hereditarnega endometrijskega karcinoma<sup>84</sup>. Znani mehanizmi pri nastanku tipa I endometrijskega karcinoma so še K-ras, gena  $\beta 1$ -katenin in mutacije p53, medtem ko pri tipu II endometrijskega karcinoma prevladuje mutacija p53 in mutacija HER2/neu<sup>85</sup>.

Vzroki za povečano incidenco raka endometrija so povezani z uporabo estrogenov brez progestagenov, zgodnja menarha, pozna menopavza, nizko število rojstev, daljša obdobja anovulacije in debelost ter so lahko povezani z dolgotrajno estrogensko stimulacijo, kar vodi v proliferacijo in neoplastično transformacijo endometrijskih celic. Podobno vidimo pri ženskah, ki dalj časa prejemajo tamoksifen, ki ima v nekaterih tkivih znan učinek kot agonist estrogenov<sup>86, 87</sup>.

Podobno so z višjo incidenco povezali sedeči način življenja, sladkorno bolezen in arterijsko hipertenzijo. Vedno več je dokazov, ki sedeči način življenja povezuje z rakom endometrija, medtem ko pripisujejo zaščitne učinke večjemu številu nosečnosti, višji starosti pri zadnji nosečnosti, daljši uporabi kombinirane hormonske kontracepcije in fizični aktivnosti<sup>88</sup>.

Pojav endometrijskega karcinoma le redko opazimo pri premenopavznih oziroma perimenopavznih ženskah<sup>89</sup>.

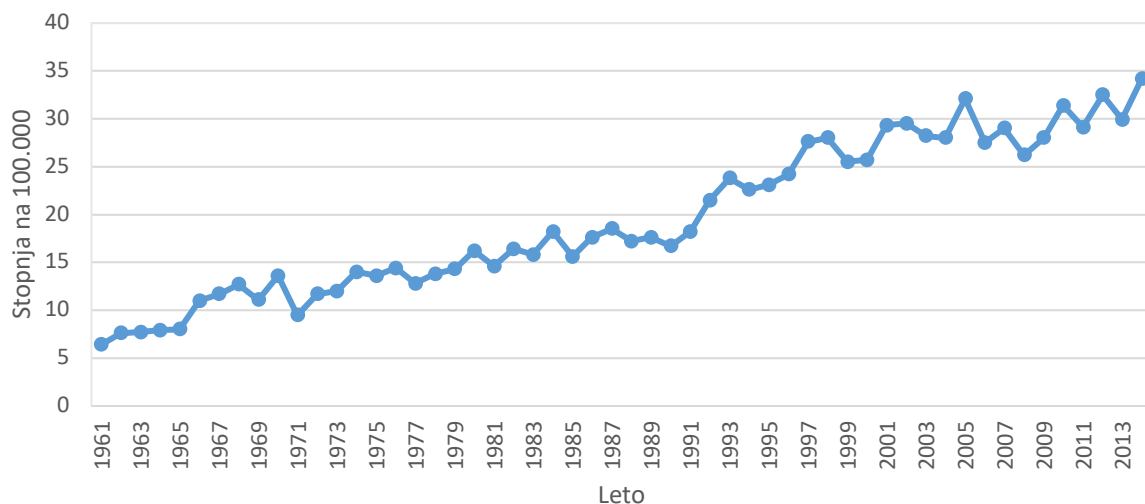
#### 2.4.2 Breme raka endometrija

Pri raku endometrija obstaja ogromna razlika v incidenci med različnimi državami. V Evropi imamo grobo incidenčno stopnjo 23,1 na 100.000 prebivalk, medtem ko je groba incidenčna stopnja v Afriki le 2,0 na 100.000 prebivalk, kar je razvidno v tabeli 8<sup>16</sup>. V Sloveniji smo leta 2014 beležili incidenčno stopnjo 34,2 na 100.000 prebivalk, medtem ko je ta stopnja leta 1994 znašala 22,6 na 100.000 prebivalk (graf 5)<sup>5</sup>.



POPULACIJA	ŠTEVILO	GROBA STOPNJA	STAROSTNO STANDARDIZIRAN A STOPNJA
Svet	319.605	9,1	8,2
Razvite regije	167.859	26,2	14,7
Nerazvite regije	151.746	5,3	5,5
Zelo visok indeks človekovega razvoja	141.290	24,2	13,8
Visok indeks človekovega razvoja	57.977	10,9	9,2
Srednji indeks človekovega razvoja	108.314	6,3	5,9
Nizek indeks človekovega razvoja	11.826	1,8	3,0
WHO afriška regija	8.730	2,0	3,5
WHO ameriška regija	74.294	15,4	12,3
WHO vzhodno Sredozemlje	7.609	2,5	3,5
WHO evropska regija	107.496	23,1	13,6
WHO jugovzhodna azijska regija	23.300	2,6	2,8
WO zahodno-pacifiška regija	98.140	10,9	8,5
IARC članice (24 držav)	163.507	12,6	9,6
Bližnji Vzhod in Severna Afrika	9.717	4,4	5,5
Afrika	11.359	2,1	3,5
Podsaharska Afrika	8.763	2,0	3,7

Tabela 8: GLOBOCAN 2012 predvidena incidenca raka endometrija<sup>16</sup>.



Graf 5: Groba incidenčna stopnja raka endometrija v Sloveniji<sup>5</sup>.

Rak endometrija ima v primerjavi z rakom jajčnikov ali materničnega vratu zelo ugodno prognozo s 5-letnim preživetjem nad 80 % v razvitih državah in 60 % v državah v razvoju<sup>5, 16</sup>. Preživetje se bistveno razlikuje glede na stadij bolezni, kar je prikazano v tabeli 9, poleg tega

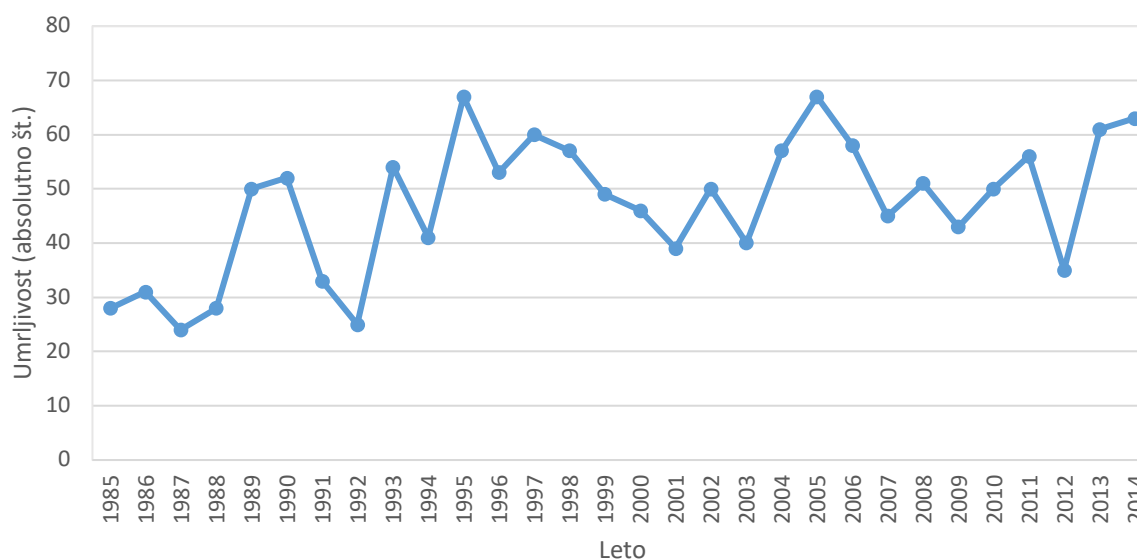
obstajajo tudi razlike v umrljivosti med geografskimi lokacijami (tabela 10). Umrljivostna stopnja po letih v Sloveniji je prikazana na grafu 6.

<b>PRIMARNI TUMOR</b>	<b>FIGO</b>	<b>RAZŠIRJENOST BOLEZNI</b>	<b>5-LETNO PREŽIVETJE</b>
<b>T0</b>		Brez znakov bolezni	/
<b>T1</b>	<b>I</b>	Tumor omejen na telo maternice	75-88%
<b>T1A</b>	<b>IA</b>	Tumor omejen na endometrij ali invazija obsega manj kot polovico miometrija	88%
<b>T1B</b>	<b>IB</b>	Invazija tumorja obsega več kot polovico miometrija	75%
<b>T2</b>	<b>II</b>	Tumor se širi v stromalno vezivno tkivo materničnega vratu, vendar se ne širi dalje od maternice	69%
<b>T3</b>	<b>III</b>	Tumor se širi na organe male medenice	47-58%
<b>T3A</b>	<b>IIIA</b>	Tumor zajema serozo in/ali adneксе	50%
<b>T3B</b>	<b>IIIB</b>	Tumor zajema nožnico ali parametrije	39%
<b>T3C</b>	<b>IIIC</b>	Prisotne so pelvične in/ali paraaortne metastaze	47%
<b>T4</b>	<b>IV</b>	Prisotni so oddaljeni zasevki	15-17%
<b>T4A</b>	<b>IVA</b>	Tumor zajema mukozo mehurja in/ali črevesja	15%

Tabela 9: 5-letno preživetje pacientk z rakom endometrija glede na FIGO stadij bolezni<sup>17</sup>.

POPULACIJA	ŠTEVILO	GROBA STOPNJA	STAROSTNO STANDARDIZIRANA STOPNJA
Svet	76.160	2,2	1,8
Razvite regije	34.720	5,4	2,3
Nerazvite regije	41.440	1,5	1,5
Zelo visok indeks človekovega razvoja	27.362	4,7	2,0
Visok indeks človekovega razvoja	15.324	2,9	2,2
Srednji indeks človekovega razvoja	28.776	1,7	1,6
Nizek indeks človekovega razvoja	4.658	0,7	1,2
WHO afriška regija	3.216	0,7	1,3
WHO ameriška regija	13.590	2,8	2,0
WHO vzhodno Sredozemlje	2.440	0,8	1,2
WHO evropska regija	25.878	5,6	2,6
WHO jugovzhodna azijska regija	8.255	0,9	1,0
WO zahodno-pacifiška regija	22.776	2,5	1,8
IARC članice (24 držav)	35.469	2,7	1,8
Bližnji Vzhod in Severna Afrika	2.538	1,2	1,4
Afrika	4.030	0,8	1,3
Podsaharska Afrika	3.257	0,8	1,4

Tabela 10: GLOBOCAN 2012 stopnja umrljivosti žensk z rakom endometrija<sup>16</sup>.



Graf 6: Umrlijivost žensk z rakom endometrija v Sloveniji<sup>5</sup>.

### 2.4.3 Presejanje raka endometrija

Rak endometrija je predvsem bolezen žensk v pomenopavzalnem obdobju, pri čemer v reproduktivnem obdobju vidimo le 7 % vseh primerov bolezni. Slednje so tesno povezane z družinsko obremenjenostjo, debelostjo in sindromom policističnih jajčnikov (PCOS)<sup>90, 91</sup>.

Večina primerov raka endometrija se odkrije v zgodnji fazi pri simptomatskih ženskah. Dolgo je veljalo prepričanje, da presejanje raka endometrija pri asimptomatskih ženskah brez izraženih dejavnikov tveganja ni smiselno<sup>92</sup>.

Na temo presejanja žensk za rak endometrija je bila opravljena večja raziskava UKCTOCS, ki je vključevala 48.230 žensk, pri katerih so opazovali diagnostično vrednost transvaginalnega ultrazvočnega merjenja debeline endometrija pri pomenopavzalnih ženskah. Pri določeni mejni vrednosti 5,15 mm je znašala občutljivost 80,5 % in specifičnost 86,2 %. V primeru asimptomatskih žensk je ob mejni debelini endometrija 5 mm občutljivost znašala 77,1 % ob specifičnosti 85,8 %. Zaključek raziskave je bil, da je zaradi številnih lažno pozitivnih rezultatov breme tovrstnega presejanja celotne populacije preveliko in ga je mogoče zmanjšati s ciljanim presejanjem le bolj ogroženih skupin<sup>93</sup>.

Ena izmed ogroženih skupin za pojav raka endometrija so bolnice s sindromom Lynch, ki ga povzroča mutacija enega izmed gena DNK MMR (angl. *missmatch repair*). Ženske z omenjenim sindromom z mutacijo MLH1 ali MSH2 imajo verjetnost za pojav raka endometrija približno 40 % z mediano starostjo 49 let, medtem ko imajo ženske z mutacijo MSH6 enako verjetnost pojava raka ob sicer višji starosti<sup>94</sup>.

Številni različni pristopi so bili preizkušeni v presejanju žensk s sindromom Lynch, vendar ob majhnem številu raziskav uspešnost presejanja ostaja vprašljiva. Primeri raka se pojavljajo kljub presejanju, ob tem ni jasnih podatkov, koliko tovrstna presejanja vplivajo na obolevnost in umrljivost<sup>94</sup>. Ameriške smernice tako ne predvidevajo rednih presejalnih programov ženske z nizkim do srednjim tveganjem za razvoj raka endometrija, pač pa priporočajo izobraževanje žensk o možnih simptomih raka ter o čimprejšnjem ukrepanju v primeru pojava le-teh. Za razliko od žensk z nizkim do srednjim tveganjem pa tistim z visokim tveganjem, kot je na primer sindrom Lynch, priporočajo redne letne biopsije endometrija za histološko opredelitev, kar še vedno predstavlja standard za opredelitev statusa endometrija<sup>95</sup>.

#### 2.4.4 Tumorski označevalci pri raku endometrija

#### 2.4.4.1 CA 125

Povišane serumske nivoje CA 125 lahko zasledimo pri raku endometrija, vendar ne v tolikšni meri, kot pri raku jajčnikov. Rezultati raziskave, opravljene na 238 bolnicah z rakom endometrija (219 s stadiji I/II in 29 s stadiji III/IV), so pokazale občutljivost 49,1 % ob specifičnosti 83,1 % z upoštevano mejno vrednostjo 18,7 IE/L, kar se sicer razlikuje od običajnih 35 IE/L<sup>96,97</sup>.

Predoperativne vrednosti CA 125 se pomembno razlikujejo med posameznimi stadiji bolezni. Pri stadiju I je bil CA 125 povišan nad mejno vrednostjo v 15,2 % primerov, pri stadiju II v 33,3 % primerov, stadiju III v 61,5 primerov ter v 100 % pri bolezni v stadiju IV<sup>33</sup>.

Poleg uporabe CA 125 v diagnostične namene ima pomembno vlogo tudi kot prognostični dejavnik. Ugotovljena je bila povezava med povišanim nivojem CA 125 in prisotnostjo zasevkov v regionalnih bezgavkah<sup>98</sup>. CA 125 se lahko uporablja tudi v spremljanju po zdravljenju, saj korelira s ponovitvijo bolezni. Vrednosti, višje od mejne vrednosti 35 IE/L so našli pri 5,1 % bolnic brez ponovitve bolezni ter pri 50 % bolnic z dokazano ponovitvijo<sup>99</sup>.

#### 2.4.4.2 CA 15-3

CA 15-3 je mogoče uporabljati v diagnostične namene tudi pri raku endometrija, vendar ne dosega učinkovitosti že opisanega CA 125. Raziskave so pokazale povišane nivoje CA 15-3 pri 24 % bolnic z rakom endometrija. Ob tem je bil CA 15-3 povišan nad mejno vrednost 30 IE/L v 47 % primerov raka endometrija stadija III, medtem ko je ta delež znašal le 18 % v primeru stadijev I in II<sup>100</sup>.

CA 15-3 se je sicer izkazal za učinkovit prognostični dejavnik po kirurškem zdravljenju raka endometrija, pri čemer so pri normalnih vrednostih opisovali 5-letno celokupno preživetje 89,4 %, pri povišanih vrednostih (nad 25 IE/mL) pa le 65,9 %<sup>101</sup>.

#### 2.4.4.3 CA 19-9

CA 19-9, oziroma karbohidratni antigen 19-9, lahko najdemo povišan v nekaterih primerih raka endometrija. Opisana občutljivost znaša 22,3 %, medtem ko označevalca ni bilo mogoče uporabiti za razlikovanje med začetno in razširjeno boleznijo<sup>99</sup>.

Druga raziskava je sicer pokazala, da je CA 19-9 povezan z globoko invazijo v miometrij, razširjenost bolezni na maternični vrat in s potrebo po dopolnilnem zdravljenju, vendar je raziskava zaključila, da je uporabna vrednost tega označevalca zelo omejena<sup>102</sup>.

#### 2.4.4.4 CEA

CEA oziroma karcinoembrionalni antigen je, podobno kot pri raku jajčnikov, delno uporaben tudi pri raku endometrija. Opisana občutljivost je bila 22,3 %<sup>103</sup>. Druga raziskava je potrdila povezavo med nivojem CEA in histološkim tipom ter globino invazije v miometrij, vendar niso uspeli potrditi povezave s stadijem bolezni<sup>104</sup>. Poleg tega so v drugi raziskavi ugotovili še povezavo med povišanimi nivoji CEA in ponovitvijo bolezni, vendar trenutno prevladuje mnenje, da je označevalec CEA uporaben le v nekaterih primerih za spremljanje odziva na zdravljenje<sup>105</sup>.

## 2.5 Metabolomika

### 2.5.1 Metabolomika kot znanost

V literaturi je mogoče vedno pogosteje zaslediti izraze, kot so genomika, proteomika, transkriptomika, lipidomika in metabolomika. Skupna končnica vseh besed ni le semantično sredstvo, pač pa nosi točno določen pomen in predstavlja karakterizacijo in kvantifikacijo skupka bioloških molekul, ki se prevajajo v strukturo, funkcijo in dinamiko organizma<sup>106</sup>. Končnica »om« v biologiji pomeni celoto, torej zajema vse enote posameznega področja, ki so medsebojno prepletene, vendar delujejo kot celota in se kot takšne tudi obravnavajo. Genom torej pomeni kompletni genski material organizma z vsemi pripadajočimi strukturami in funkcijami, genomika pa je veda, ki le-te poveže v funkcionalno celoto. Metabolomika se je v zadnjih letih razvila kot veda, ki obravnava v celoti vse metabolite, torej molekule z majhno molekularno maso posameznega organizma, meri njihove koncentracije in razmerja, predvsem pa vzorce v okviru posameznih procesov.

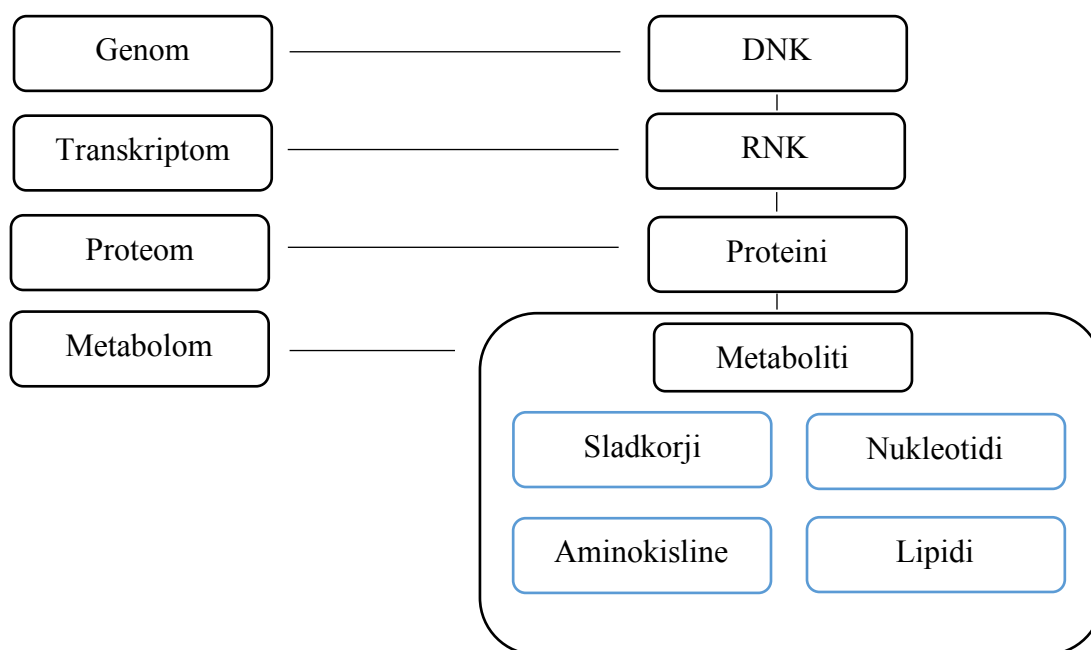
V raziskavah raka se že desetletja proučujejo molekule, ki se razlikujejo med rakavimi in zdravimi celicami z namenom odkrivanja bioloških označevalcev, značilnih za rakavo obolenje ter tarče za morebitno zdravljenje. To je vodilo v odkritje mnogih molekularnih značilnosti, vključenih v celično funkcijo in signalizacijo, celično staranje ter druge pomembne lastnosti rakavih celic. Kljub dejstvu, da je biološki sistem celice sestavljen iz genoma, transkriptoma, proteoma ter metaboloma, velja prepričanje, da je slednji najbolj poveden za opis funkcije celic. Raziskovanje celičnega metaboloma je lahko odličen način za odkrivanje fenotipskih sprememb, povezanih z biološko funkcijo, še posebej v primerih, ko je mogoče zaslediti minimalne spremembe v koncentracijah metabolitov.

### 2.5.2 Biologija sistemov

Biologija sistemov deluje v smeri ustvarjanja matematičnih modelov, torej računalniških rekonstrukcij bioloških sistemov in procesov, kar vodi v popolnoma nov nivo razumevanja osnov zasnove principov v biološko molekularnih sistemih. Biologija sistemov premika biologijo, ki temelji na fenomenih, v znanost predvidevanja. Matematično modeliranje bioloških omrežij in procesov je že bistveno pripomoglo k našemu razumevanju številnih celičnih procesov. Glede na izjemno količino kvalitativnih in kvantitativnih podatkov, ki se jih

trenutno ustvara na področju medicine in število odprtih vprašanj, je biologija sistemov na področju medicine še vedno v zgodnji fazi<sup>107</sup>.

Uporaba biologije sistemov pomeni matematično modeliran pristop do celotnega človeškega telesa, vseh molekul, celic, tkiv in organov. Značilno za sistemsko biologijo je vključevanje številnih »omik« tehnologij in znanosti. Pristop biologije sistemov temelji na hipotezah, globalnem, kvantitavnem, integrativnem in dinamičnem delu. Začne se z zbiranjem globalnega znanja iz kar največ različnih hierarhičnih nivojev, kot so zaporedja DNK, zaporedja RNK, ekspresije določenih genov, količine proteinov, lipidov, metabolitov in podobno, nato sledi ustvarjanje natančnih grafičnih in matematičnih modelov, ki jih nato predelujemo skozi ponovitve ob procesu, temelječem na hipotezah (shema 1)<sup>108</sup>. Metabolomika v sistemski biologiji predstavlja pomemben člen, saj izpolnjuje vrzeli in neznanke, ki nastajajo pri razlagah bioloških procesov na nivoju genomike in proteomike.



Shema 1: Biologija sistemov.

### 2.5.3 Metabolomika v biologiji sistemov



Metabolomika je zadnja v vrsti sodobnih »omik« znanosti, ki zajema analize majhnih molekul oziroma metabolitov organizma in tako omogoča vpogled v stanje celice in opisuje dejansko zdravstveno stanje organizma. Velja za mlado področje, še posebej v onkoloških raziskavah, kljub dejstvu, da je centralni metabolizem rakavih celic že dolgo predmet zanimanja. Najbolje raziskano področje celičnega metabolizma rakavih celic je centralni metabolizem ogljika, torej glikolize, cikla trikarboksilne kisline ali Krebsovega cikla ter oksidativne fosforilacije. Že dolgo znana hipoteza pravi, da rakave celice prednostno pretvarjajo piruvat v laktat namesto poganjanja Krebsovega cikla v aerobnih pogojih<sup>109, 110</sup>. Novejše raziskave sicer kažejo, da omenjena lastnost ni značilna izključno za rakave celice, vendar ostaja prepričanje, da je v rakavih celicah povečana glikolitična aktivnost ob zmanjšani aktivnosti Krebsovega cikla in oksidativne fosforilacije<sup>111</sup>. Ta lastnost se imenuje Warburgov efekt po znanstveniku Ottu Warburgu (1883–1970) iz leta 1956. Warburgov efekt predpostavlja dve fazi v prehodu zdravih celic v rakave: nepovratna poškodba respiratornega sistema celice, ki mu sledi nadomeščanje energije skozi fermentacijo<sup>109, 112</sup>. Posledično Warburgov efekt izpostavlja povečano potrebo po glukozi s strani rakavih celic.

Z metodami metabolomike je mogoče zaznati izjemno širok spekter metabolitov z eno samo preiskavo<sup>113</sup>. Na ta način je mogoče še podrobneje proučevati centralni metabolizem ogljika, istočasno pa je mogoče odkriti tudi druge biokemijske poti, ki prispevajo k funkciji rakavih celic. Metabolom je sestavljen tako iz endogenih kot eksogenih komponent. Prve se katabolizirajo ali anabolizirajo v biološkem sistemu, medtem ko slednje izvirajo zunaj organizma ali pa se nahajajo v zunajceličnih prostorih. Metaboliti, prisotni v biološkem sistemu, zajemajo tako metabolno aktivnost, potrebno za rast, vzdrževanje in funkcijo celice, kot tudi metabolite, ki jih celica vnese iz zunanjega okolja<sup>114</sup>.

Metabolomiko je mogoče proučevati na široki paleti bioloških vzorcev, ki vključujejo tkiva, celice ali telesne tekočine, kot so serum, plazma, urin in slina<sup>115</sup>. V zadnjem času so odkrili, da je mogoče mnoge metabolite zaznati tudi v izdihanem zraku kot posledico hlapljivih organskih snovi. Obstaja veliko različnih načinov priprave vzorcev ter analitičnih pristopov. Na koncu sledi analiza, ki običajno vključuje univariatno, multivariatno analizo, ter metode strojnega učenja, kjer se odkrivajo razlike v koncentraciji posameznega metabolita med testnimi in kontrolnimi skupinami ali pa se iščejo razlike v razmerju več metabolitov. Razvitih je že nekaj programskih rešitev za sistemske analize na področju metabolomike, ki zajemajo različne metodologije procesiranja podatkov in analiz<sup>116</sup>.

#### 2.5.4 Analitične metode, uporabljene v metabolomiki

Ključne poti, ki razlikujejo normalne celice od rakavih, vključujejo glikolizo, pentoza fosfatno pot, sintezo nukleotidov in proteinov, preobrat lipidov in fosfolipidov, Krebsov cikel in procese dihalne verige. Nobena metoda sama po sebi ni zmožna zaznati vseh molekul, ki so spremenjene v rakavih celicah. Raziskovanja v metabolomiki vključujejo različne analitične metode, od katerih se razlikujejo po spektrih zaznanih metabolitov, vendar je osnovni princip pri vseh enak. Metabolomika običajno uporablja nuklearno magnetno resonanco (NMR) ali masno spektrometrijo (MS). Slednjo je mogoče kombinirati z metodami separacije, kot so plinska kromatografija, tekočinska kromatografija ali kapilarna elektroforeza<sup>117-121</sup>.

##### 2.5.4.1 Nuklearna magnetna resonanca (NMR)

Med posameznimi analiznimi metodami obstajajo pomembne razlike, tako v smislu prednosti, kot slabosti. NMR kot ena izmed dveh ključnih metod velja kot ponovljiva metoda in nudi možnost natančnega odkrivanja molekul v kompleksnih zmesih zaradi direktne povezave med vrhom spektra in koncentracijo posameznega jedra. S pomočjo NMR je mogoče tudi sklepati o strukturi neznane molekule. NMR lahko analizira vzorce v njihovem prvotnem stanju, brez predpriprave in spreminjanja, kar omogoča tudi analizo *in vivo*. Glavna omejitev magnetne resonance je predvsem občutljivost, saj je zmožnost zaznavanja manjših koncentracij molekul kar za nekaj redov nižja, kot na primer pri masni spektrometriji<sup>121, 122</sup>.

#### 2.5.4.2 Masna spektrometrija (MS)

Masna spektrometrija, združena s plinsko ali tekočinsko kromatografijo, je verjetno najpomembnejša metoda v metabolomiki raka. Uporablja se v analizi nizkomolekularnih metabolitov, predvsem med 650 in 1000 daltoni. Pred analizo se v večini primerov opravi kemijska derivatizacija, pri čemer se olajša ločevanje kemikalij, zmanjša polarizacija funkcionalnih skupin ter poveča hlapljivost in termična stabilnost pred postopkom ločevanja s kromatografijo<sup>123,124</sup>. Hidroksilne, karboksilne in amino funkcionalne skupine reagirajo z derivatizacijskimi reagenti in povečajo hlapljivost, ki je pomemben dejavnik za uspešno kromatografijo. V procesu plinske kromatografije se kemijske snovi frakcionirajo glede na interakcijo med stacionarno in mobilno fazo. Vzorec se v kolono vbrizga pod visokim pritiskom ob visoki temperaturi, kar privede do uparjenja vzorca. Plin vodi vzorec skozi kolono, kjer prihaja do odlaganja vzorca na stacionarno fazo. Različne snovi potujejo preko stacionarne faze z različno hitrostjo, kar loči snovi med seboj. Ob izhodu iz kolone se posamezne snovi običajno ionizirajo z elektronsko ionizacijo, preden napredujejo v masni spektrometer. V slednjem se snovi zaznavajo v obliki molekulske mase, kar ustvari vrh v spektrogramu za vsako posamezno snov, ki je vstopila v spektrometer iz kromatografske kolone. Tovrstna masna spektrometrija ob pomoči plinske kromatografije predstavlja izjemno občutljivo metodo, ki je prav tako kvantitativna in dobro ponovljiva, kar je postavilo masno spektrometrijo na pomembno mesto med metodami v metabolomiki<sup>125, 126</sup>.

#### 2.5.4.3 Priprava vzorcev v metabolomiki

Kot je že opisano, v praksi uporabljamo množico analitičnih metod, ki najbolj ustrezajo posameznim tipom vzorcev z ozirom na želeno informacijo o metabolitih, ki jo želimo pridobiti iz vzorca. Poleg same izbire analitične metode je zelo pomembna tudi priprava vzorcev glede na izbrano analitično metodo in lastnosti samih vzorcev. Telesne tekočine, kot so urin, serum ali plazma, se lahko v sistemu analize uporabijo direktno, ali pa gredo skozi predpripravo z metodami, kot so tekočinska ekstrakcija, ekstrakcija s solidno fazo ali z obarjanjem proteinov. Metode predpriprave izboljšajo in olajšajo kasnejše zaznavanje metabolitov. V primeru analize metabolitov celic *in vitro* je postopek običajno naslednji: celice speremo in fiksiramo v ledeno hladnem metanolu. Adherentne celice se odstranijo iz medija z uporabo tripsina ali mehanskega

strgala. Pridobljena raztopina gre nato skozi serijo zamrzovanj in odtajanj, kjer se metaboliti sprostitjo iz celic. Z uporabo centrifuge se loči celični drobir od supernatanta, ki se uporabi za analize. Podoben postopek se lahko uporabi tudi za ekstrakcijo metabolitov iz tkiv<sup>127, 128</sup>.

### 2.5.5 Primeri uporabe metabolomike

Analiza metabolitov zajema kvantitativno opredelitev posameznih metabolitov ali skupine metabolitov, povezanih z določenim vprašanjem.

Metabolizem je mogoče opredeliti kot spremembo v koncentraciji metabolitov in tokov, pri čemer prevladuje prepričanje, da je določanje fenotipa mogoče le ob poznavanju znotrajceličnih tokov metabolitov, ki so urejeni preko delovanja encimov. Eden izmed načinov za oceno metabolizma je analiza toka metabolitov, torej meritev premikanja atomov, običajno ogljika ali dušika skozi ključne metabolne poti, ki predstavljajo funkcijo biološkega sistema. Celice lahko izpostavimo glukozi, označeni z izotopom ogljika  $^{13}\text{C}$ . Na ta način je mogoče slediti označenim atomom ogljika skozi vse korake metabolnega procesa. Tovrstni način testiranja se uporablja za preiskovanje metabolizma raka v *in vitro* pogojih ob natančno poznanih vmesnih metabolnih produktih, označenih z izotopom, ki so homogeno porazdeljeni v celičnem prostoru. Stehiometrija posameznih reakcij mora biti poznana, sicer velja prepričanje, da izotopi v molekulah ne vplivajo na spremembo encimske funkcije. Po meritvah koncentracij označenih metabolitov in tokov se opravi matematično modeliranje za oceno samih reakcij. Na podlagi meritev je mogoče pridobiti informacije o deležu glikolize in pentoza fosfatne poti pri sintezi piruvata, delež oksidativne in neoksidativne sinteze riboze, primerjavi hitrosti konverzije med pentoza-5-fosfati in pentoza-6-fosfati ter informacije o sintezi, podaljševanju in desaturaciji maščobnih kislin<sup>129</sup>.

Profili metabolitov ter tako imenovana analiza prstnega odtisa, (angl. *fingerprinting*), kar pomeni preiskovanje le določenih znanih segmentov metaboloma, sta pogosti metodi v metabolomiki. V literaturi je mogoče zaslediti množico primerov uporabe v odkrivanju bioloških označevalcev za rakava obolenja. Obe metodi, tako profiliranje kot analiza prstnega odtisa pogosto zajemata presejanje širokega spektra metabolitov, kot so na primer aminokisliline, ali pa globalno presejanje vseh metabolitov, ki jih je mogoče zaznati z uporabljenimi analiznimi metodami. Tovrstna neselektivna analiza je lahko uporabna v množici primerov od izčrpane

analize vseh metabolitov v biološkem sistemu, do vpliva posameznih eksogenih metabolitov na celoten biološki sistem. Običajno se metode ne štejejo za kvantitativne, vendar kljub temu kvantifikacija omogoča primerjavo med biološkimi sistemi. Prisotnost, pomanjkanje ali relativno razliko v koncentraciji metabolitov je mogoče primerjati med eksperimentalnimi vzorci.

## 2.6 Metabolomika in rak jajčnikov

Na področju raka jajčnikov so prisotni številni poskusi odkrivanja novih diagnostičnih metod, še posebej zaradi narave bolezni, ki zaradi poznega pojava simptomov vodi v odkrivanje bolezni v poznih stadijih in temu primerno slabo prognozo. Pri raku jajčnikov je opisana velika množica tumorskih označevalcev, ki pa se z izjemo HE4 in CA125 niso izkazali za učinkovite v diagnostiki zgodnje bolezni.

Na področju metabolomike se pojavljajo številne raziskave, ki nudijo široko paleto raznolikih tumorskih označevalcev, ki imajo opisano veliko boljše občutljivost in specifičnost od trenutno uporabljenih tumorskih označevalcev.

Na področju odkrivanja raka jajčnikov v zgodnjih stadijih je pomembna raziskava, ki jo je opravil Garcia s sodelavci (2011). Uporabili so NMR za odkrivanje v odstopenju metabolitov v serumu bolnic z rakom jajčnikov stadijev I in II, kjer so opazili visoko stopnjo diagnostične učinkovitosti izoliranih metabolitov z AUC 0,949. Raziskava je bila opravljena na 50 primerih raka jajčnikov v primerjavi s 50 zdravimi ženskami. Opravljena je bila tudi potrditev dobljenih rezultatov z neodvisno skupino vzorcev, prav tako so diagnostično vrednost metabolitov preverili še na skupini bolnic z ledvičnim rakom, kjer so opisali dobro ločevanje raka jajčnikov od ledvičnega raka ter s tem potrdili visoko specifičnost metode<sup>130</sup>.

Naslednjo pomembno raziskavo je opravil Ke s sodelavci (2015), ki je testiral večjo skupino bolnic z rakom jajčnikov (N = 140), pri čemer je vključil še bolnice z mejno malignim tumorjem jajčnikov (N = 158) in miomi maternice (N = 150). Opazil je visoko stopnjo ločevanja raka od mejno malignih tumorjev z AUC 0,910, ter ločevanje raka od primerov bolnic z miomi maternice z AUC 0,942. V nadaljevanju je Ke opazil še možnost razlikovanja stadija I od višjih stadijev bolezni z isto metodologijo. Med izpostavljenimi označevalci so izstopali fosfolipidi<sup>131</sup>.

Do podobnih rezultatov je prišel tudi Zhang s sodelavci (2013), ki je opisal 9 potencialnih tumorskih označevalcev, ki so se pomembno razlikovali med boleznimi v zgodnjem stadiju ter napredovalih stadijih z AUC 0,828<sup>132</sup>.

V rezultatih raziskav raka jajčnikov s pomočjo metabolomike so opisani tumorski označevalci, ki sodijo v štiri različne skupine. Prva zajema metabolizem ogljikovih hidratov, kjer so zajeti metaboliti, povezani z glikolizo, Krebsovim ciklom in anaerobnim dihanjem. Rezultati metabolitov iz omenjene skupine se med raziskavami precej razlikujejo, tako po izbiri, kot tudi po funkciji; nekateri so si med seboj tudi nasprotujoči<sup>133</sup>.

V drugo skupino sodi metabolizem lipidov, kjer se pojavljajo proste maščobne kisline in metaboliti, povezani z oksidacijo maščobnih kislin. Omenjene metabolite je opisal Buas s sodelavci, ki je kot najpomembnejše označevalce opredelil glicerolipide in glicerofosfolipide<sup>134</sup>, ter številni drugi (Fan in sod., Shender in sod. Fong in sod.), ki so podobno opisovali diagnostični pomen sfingolipidov in maščobnih kislin, vključno s palmitatom, oleatom, miristatom in linoleatom<sup>135–137</sup>.

V naslednjo pomembno skupino uvrščamo metabolite aminokislin, ki se pogosto pojavljajo v raziskavah metabolomike pri raku jajčnikov. Med drugim so tako opisali spremenjene nivoje valina, alanina, glutamina, glutamata in drugih, kot je opisano v tabeli 11.

Vzorec	Biološki označevalec	Vir
Serum	alanin, serin, cistein, treonin, glicin, metaboliti histamina	Zhou in sod. (2010) <sup>138</sup>
Tkivo	karnitin, acetilkarnitin, butilkarnitin, fenilpiruvat, fenilacetat, 2-aminobutirat, tokoferoli	Fong in sod. (2011) <sup>136</sup>
Urin	1-metiladenozin, 3-etiluridin 4-androsten-3,17-dion	Woo in sod. (2009) <sup>119</sup>
Serum	3,5-tetradekadienkarnitin, cis-5-tetradecenoilkarnitin, dodekanoilkarnitin, kinourenin	Ke in sod. (2015) <sup>131</sup>
Serum	alanin, valin, glukoza, 3-hidroksibutirat	Odunsi in sod. (2005) <sup>139</sup>
Serum	acetoacetat, aceton, 3-hidroksibutirat, alanin, fosfolipidi	Garcia in sod. (2011) <sup>130</sup>
Plazma	L-triptofan, LysoPC(18:3), LysoPC(14:0), 2-piperidon	Zhang in sod. (2012) <sup>140</sup>
Serum	3,4-dihidroksibutirična kislina, 3-hidroksibutirična kislina, acetoacetična kislina	Hilvo in sod (2016). <sup>141</sup>
Urin	kreatinin, acetat, sukcinat, levoglukozan, laktat, piroglutamat in drugi	Slupsky in sod. (2010) <sup>142</sup>

Tabela 11: Metaboliti, identificirani kot potencialni tumorski označevalci pri raku jajčnikov.

## 2.7 Metabolomika in rak dojk

Rak dojk je najboljše raziskan izmed vseh rakov, kar je verjetno posledica njegove visoke incidence v primerjavi z drugimi rakavimi obolenji. Literatura opisuje množico bioloških označevalcev, odkritih s pomočjo profiliranja. Sprva so raziskave potekale na tkivnih vzorcih raka dojk in zdravega tkiva. Prvi rezultati datirajo že v leto 1993, ko je Gribbestad s sodelavci ugotovil povišane nivoje laktata, sukcinilholina, fosfatidilholino ter znižane nivoje glukoze in inozitola v rakastem tkivu<sup>143</sup>. Med prvimi opisanimi označevalci za rak dojk je bil lipidom<sup>144, 145</sup>. Predpostavili so, da je povečana koncentracija več skupin lipidov, vključujoč fostaftidilinozitole, fosfatidiletanolamine, fosfatidilholine in lizofosfatidilholine značilna za rak dojk. Pojavile so se tudi raziskave, ki so predpostavile možnost za zmanjšanje tveganja za pojav raka s pomočjo dietnega režima<sup>146</sup>.

Vzorci za klinično rabo običajno zajemajo vensko kri in občasno urin, predvsem zaradi lahke dostopnosti tovrstnega materiala. Ključnega pomena je, ali se lahko metabolne spremembe, ki so posledica rakavega tkiva, izražajo v krvi ali urinu, glede na podatek, da običajno rakasto tkivo bolni v zgodnjem stadiju obsega maso nekaj gramov in s tem le 0,01–0,1 % celotne mase telesa. Metabolne spremembe, ki so jih opisale številne raziskave so lahko posledica direktnega izločanja iz rakastega tkiva, ali pa odgovor oziroma produkt celotnega telesa glede na spremenjeno stanje, ki je morda ne samo posledica ampak tudi vzrok rakavega obolenja<sup>147</sup>. Sprva je med analiznimi metodami prevladovala HR-MAS NMR visoko ločljivostna nuklearna magnetna resonanca z vrtenjem magičnega kota (angl. *high resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance*), ki temelji na rotaciji vzorca s pomočjo mehanizma zračne turbine, kar omogoči ožanje vrhov v spektru in s tem izboljšano resolucijo metode. HR-MAS NMR se je večinoma opravljala na nespremenjenih vzorcih, kar je omogočalo ohranitev vzorca, medtem ko se v zadnjem času pogosteje opravljajo ekstrakcije vzorcev, kar omogoča večjo občutljivost in boljšo resolucijo. Zaradi omenjenega je rezultate preteklih raziskav težko primerjati z novejšimi, ki temeljijo večinoma na kromatografiji, povezani z masno spektrometrijo.

Po prvotnih raziskavah tkivnih vzorcev so se pričele kasneje opravljati še številne raziskave metabolitov v krvi in urinu. V nadaljnjih analizah metaboloma so odkrili številne potencialne označevalce. Asiago s sodelavci je leta 2010 opisal 11 potencialnih označevalcev v serumu



bolnic z rakom dojk. Med njimi so bile nekatere aminokisljine, formiat, laktat ter nekatere druge snovi<sup>148</sup>.

Obstaja obsežni načrt metabolnih poti, odkritih s pomočjo plinske kromatografije in masne spektrometrije<sup>149</sup>. Med serumskimi metaboliti sta Tenori in Jobard s sodelavci (2012, 2014) izpostavila povišane vrednosti histidina, alanina in betaina, končne produkte  $\beta$ -oksidacije (Acac in 3-HB) ter glicerol kot končni produkt razgradnje lipidov, N-acetilglukoproteine, piruvat, fenilalanine in glutamat ter manozo<sup>150, 151</sup>.

Med pomembnimi metaboliti, analiziranimi v urinu bolnic z rakom dojk so opisani še homovanilat, 4-hidroksifenilacetat, 5-hidroksiindolacetat, urea, aminokisljine, organske kisline in nukleozidi<sup>152</sup>. Poleg omenjenih so kot pomembne urinske označevalce izpostavili še 5-hidroksimetil-2-deoksiuridine in 8-hidroksi-2-deoksigvanozin ter S-adenozilhomocistein<sup>119, 153</sup>. Tabela 12 zajema do sedaj opisane metabolite s potencialnim diagnostičnim ali prognostičnim potencialom.

Vzorec	BIOLOŠKI OZNAČEVALEC	VIR
Serum	formiat, histidin, prolin, holin, tirozin, 3-HB, laktat, glutamin, N-acetilglicin, 3-hidroksi-2-metilbutanojska kislina, nonanediojska kislina	Asiago in sod. (2010) <sup>148</sup>
Urin	S-adenosilhomocistedin, metilirani nukleozidi	Henneges in sod. (2009) <sup>153</sup>
Tkivo	citidin-5-monofosfat pentadekanojska kislina Sn-glicerol-3-fosfat	Brockmöller in sod. (2012) <sup>154</sup>
Tkivo	taurin, holin	Li in sod. (2011) <sup>155</sup>
Urin	5-hidroksimetil-2-deoksiuridin 8-hidroksi-2-deoksigvanozin	Woo in sod. (2009) <sup>119</sup>
Serum	proste maščobne kisline, palmitinska kislina, linoleinska kislina	Lv in sod. (2012) <sup>156</sup>
Celice	lizofosfolipidi, nasičene maščobne kisline, fosfatidilinozitol	Luisa Doria in sod. (2012) <sup>157</sup>
Urin	aminokisline, organske kisline, nukleozidi, triptofan	Chen in sod. (2009) <sup>158</sup>
Urin	homovanilat 4-hidroksifenilacetat 5 hidroksiindolacetat urea	Nam in sod. (2009) <sup>152</sup>
Urin	5 neidentificiranih označevalcev	Kim in sod. (2010) <sup>159</sup>
Urin	metaboliti Krebsovega cikla, aminokisline	Slupsky in sod. (2010) <sup>142</sup>
Urin	glicin, cistein, histidin, triptofan	Yu in sod. (2013) <sup>160</sup>

Tabela 12: Metaboliti, identificirani kot potencialni tumorski označevalci pri raku dojk.

## 2.8 Metabolomika in rak endometrija

Pri raku endometrija poznamo dejavnike tveganja, med katerimi pomembno vlogo igra debelost. Ta povzroča motnje v številnih metabolnih poteh, vključno s povišanimi nivoji steroidnih spolnih hormonov, inzulina, vnetnih mediatorjev in zmanjša nivoje adiponektina. Sicer podobno kot pri raku endometrija, tudi pri debelih ženskah najdemo metabolne spremembe samo pri deležu te skupine, medtem ko lahko omenjene metabolne spremembe najdemo tudi pri ženskah z normalno telesno težo<sup>161</sup>. V raziskavi, kjer so primerjali 73 debelih in 67 suhih posameznikov, so odkrili povišane nivoje razvejanih aminokislin, ki so bile povezane z debelostjo in prav tako inzulinsko rezistenco pri posameznikih z normalno telesno težo<sup>162</sup>. Kasnejše raziskave so pokazale še napovedno vrednost razvejanih aminokislin za pojav sladkorne bolezni tipa II<sup>163</sup>. Označevalci, ki nudijo vpogled v opisane metabolne spremembe, bi se lahko izkazali za uspešne v zgodnjem odkrivanju raka endometrija ter pri napovedi tveganja.

Za razliko od raka dojke in raka jajčnikov je bilo do sedaj na področju raka endometrija primerjalno opravljenih bistveno manj raziskav. Kljub temu so opravljene raziskave ponudile številne potencialne označevalce, ki izvirajo iz istih skupin kot tisti, identificirani pri raku jajčnikov (tabela 13).

Vzorec	Biološki označevalec	Vir
Urin	N-acetilserin, urokanična kislina, izobutirilglicin, porfobilinogen, acetilcistein	Shao in sod. (2008) <sup>164</sup>
Serum	izovalerat, adipat, gama-glutamil-2- aminobutirat, 1-metilnikotinamid, trans- urokanat, cistationin, izoursodeoksiholat, maltoza, glicilvalin, spermin	Audet-Delage in sod. (2018) <sup>165</sup>
Tkivo	valin, leucin, alanin, prolin, tirozin, fosfatidilholin, glutation, sciloinozitol, mioinozitol, inozin, adenzin	Trousil in sod. (2014) <sup>166</sup>
Serum	laktatna kislina, homocistein, 3-hidroksibutirična kislina, progesteron, linoleinska kislina, stearinska kislina, treonin, valin	Troisi in sod. (2018) <sup>167</sup>
Serum	2-hidroksibutirat, 3-hidroksibutirična kislina, aceton, glutamat, sfingomielini, asparagin, C3, histidin, hidroksiprolin, kinourenin, l- metionin	Bahado-Singh in sod. (2018) <sup>168</sup>
Serum	C5-acilkarnitini, oktenoilkarnitin, dekatrienoilkarnitin, linoleinska kislina, stearinska kislina	Gaudet in sod. (2012) <sup>169</sup>

Tabela 13: Metaboliti, identificirani kot potencialni tumorski označevalci pri raku endometrija.

### 3. Namen in hipoteza doktorske naloge

V ginekološki onkologiji, kot tudi pri drugih malignih obolenjih, prevladuje mnenje, da je potrebno bolezen odkriti v zgodnji fazi, saj so tako možnosti zdravljenja, kot tudi sama prognoza, bistveno ugodnejši.

Zgodnje odkrivanje rakavih obolenj predstavlja še posebno težavo, saj se velik del specifičnih simptomov pojavi šele ob napredovali bolezni. Rak dojk je sicer mogoče odkriti relativno hitro, saj se tipna zatrdlina lahko pojavi že v zgodnjih stadijih, je pa slika popolnoma drugačna v primeru netipnih rakov. Na drugi strani je rak jajčnikov, ki v zgodnji fazi razvoja bolezni ne kaže značilne klinične slike in pri katerem so bolnice praviloma dolgo časa asimptomatske. Specifični simptomi se pri tovrstnih bolnicah pojavijo šele pri razširjeni bolezni (stadija III in IV), zaradi tega kar 70 % primerov raka jajčnikov odkrijemo v pozni obliki. Rak endometrija predstavlja vmesno situacijo, kjer se sicer rak pogosto pokaže v obliki pomenopavzne krvavitve v zgodnji fazi razvoja bolezni, še vedno pa srečujemo veliko primerov, ko bolezen diagnosticiramo šele v napredovalih stadijih.

V ginekološki onkologiji obstajajo številni tumorski označevalci, vendar njihova specifičnost in občutljivost nista zadostna, da bi jih lahko uporabljali kot samostojno diagnostično metodo, kvečjemu se lahko uporabljajo kot dodatna pomoč v diagnostiki.

Namen raziskave je raziskati novo področje metabolomike, raziskati, katera orodja so trenutno na voljo v diagnostiki ginekoloških malignomov ter poskušati identificirati nove tumorske označevalce, ki bi lahko bili uporabni v diagnostiki ginekoloških malignih obolenj.

Cilj je zbrati vzorce seruma bolnic z rakom dojk, endometrija in jajčnikov, zdravih žensk in tistih z benignimi ginekološkimi obolenji, vzorce analizirati s pomočjo kromatografskih metod v kombinaciji z masno spektrometrijo ter nato prepoznati tiste molekule, ki imajo najboljši diagnostični potencial za vsako izmed opisanih ginekoloških malignih obolenj.

### 3.1 Hipoteza

Teza doktorske disertacije je preveriti hipotezo, ali z orodji metabolomike lahko zaznamo in identificiramo metabolite, s katerimi je mogoče ločiti skupino bolnic z ginekološkimi malignomi od zdravih žensk z učinkovitostjo, primerljivo ali boljšo od trenutno uveljavljenih tumorskih označevalcev za posamezno maligno obolenje.

Učinkovitost posameznih novoodkritih tumorskih označevalcev smo ocenjevali s pomočjo analize ROC krivulje z izračunom optimalne občutljivosti in specifičnosti bodisi posameznega tumorskega označevalca, bodisi njihove kombinacije.

### 3.2 Specifični cilji

Z raziskavo želimo identificirati najpomembnejše metabolite, ki so potencialno uporabni v diagnostiki:

1. raka jajčnikov,
2. raka dojke in
3. raka endometrija.

Sočasno je namen predvidene raziskave ugotoviti:

- Diagnostično učinkovitost posameznih metabolitov za posamezno maligno obolenje.
- Diagnostično učinkovitost najboljših kombinacij metabolitov za posamezno maligno obolenje.
- Odkriti oziroma predvideti izvor najpomembnejših metabolitov za posamezno maligno obolenje.
- Odkriti oziroma predvideti biološko funkcijo najpomembnejših metabolitov za posamezno maligno obolenje.

## 4. Materiali in metode

### 4.1 Bolnice

Delo je bilo zasnovano kot prospektivna raziskava, pri kateri smo vse bolnice s posameznimi malignimi obolenji ter kontrolno skupino in bolnice z benignimi ginekološkimi obolenji vključili tekom njihovega rednega zdravljenja na Kliniki za ginekologijo in perinatologijo Univerzitetnega Kliničnega Centra v Mariboru med leti 2014 in 2017.

Nobena izmed sodelujočih bolnic ni prejela specifičnega onkološkega zdravljenja, kot je operacija, obsevanje, kemoterapija ali drugo tarčno zdravljenje pred odvzemom vzorcev za namen raziskave. Preiskave za zamejitev bolezni so obsegale klinični pregled, laboratorijske preiskave, ultrazvočno diagnostiko, CT slikanje ter rentgensko slikanje prsnega koša. Dodatno je bila opravljena še scintigrafija okostja, CT glave in prsnega koša oziroma magnetna resonanca, glede na indikacije.

Raziskavo je odobrila Nacionalna etična komisija (odobritev št. 37/04/14) pri čemer so bile vse bolnice natančno seznanjene s potekom raziskave in so podpisale ozaveščen pristanek (Priloga št. 9.7).

Vsi klinični in demografski podatki, kot je starost, menopavzni status, pridružene bolezni, sočasna uporaba zdravil, so bili pridobljeni v času zbiranja vzorcev, medtem ko so bili histopatološki izvidi praviloma pridobljeni šele po končanem kirurškem zdravljenju oziroma po opravljeni biopsiji, bolnice pa so bile glede na rezultate razvrščene v ustrezno skupino.

#### 4.1.1 Skupina bolnic z rakom jajčnikov, dojk in endometrija

Skupina je vključevala 15 bolnic z epiteljskim rakom jajčnikov, 15 bolnic z rakom endometrija in 39 bolnic z invazivnim lobularnim oziroma duktalnim rakom dojk. Klinični stadiji in histološka klasifikacija sta v vseh primerih temeljila na kriterijih Mednarodne Federacije za Ginekologijo in Perinatologijo (FIGO) ter Svetovne zdravstvene organizacije (SZO). Histopatološki izvid smo pridobili bodisi z biopsijo suspektnih sprememb, bodisi s histopatološkim pregledom po končanem kirurškem zdravljenju.

##### 4.1.1.1 Vključitveni kriteriji

- Histopatološko potrjena diagnoza epiteljskega raka jajčnikov, tudi mejno maligni karcinom, rak endometrija ali rak dojk (invazivni duktalni ali lobularni karcinom)
- znan stadij bolezni,
- znan histopatološki izvid,
- podpisan osveščen pristanek.

#### 4.1.1.2 Izključitveni kriteriji

- Predhodno specifično onkološko zdravljenje (operacija, kemoterapija, obsevanje, tarčno zdravljenje z zdravili),
- prisotnost drugega malignega obolenja v obdobju zadnjih 5 let.

#### 4.1.1.3 Histopatološki izvid

Ocena histološkega tipa tumorja je bila skladna s kriteriji SZO za rak jajčnikov, dojk oziroma endometrija, in je bila opravljena s strani specialista patologije z Oddelka za patologijo Univerzitetnega kliničnega centra Maribor.

#### 4.1.1.4 Stopnja diferenciacije tumorja

Ocena zrelosti tumorja je bila opravljena s strani patologa na podlagi upoštevanja morfološkega vzorca rasti, značilnosti celic ter prisotnosti regresivnih sprememb. Glede na stopnjo zrelosti se tumorji pojavljajo v treh oblikah: zrela oz. dobro diferencirana oblika, zmerno zrela oz. zmerno diferencirana oblika in nezrela oz. slabo diferencirana oblika (G1–G3).

#### 4.1.2 Kontrolna skupina

Kontrolna skupina je bila sestavljena iz 21 bolnic brez znanih patoloških stanj jajčnikov ali maternice. Ženske, vključene v kontrolno skupino so bile večinoma tiste pacientke, ki so na Kliniki za ginekologijo in perinatologijo Univerzitetnega kliničnega centra Maribor opravljale



diagnostiko v sklopu obravnave neplodnosti, ob tem pa niso prejele še nobenega zdravljenja in z diagnostiko ni bilo odkritih patoloških sprememb rodil.

#### 4.1.3 Skupina z benignimi ginekološkimi obolenji

Poleg kontrolne skupine 21 pacientk brez znane patologije smo vključili še 21 pacientk z benignimi ginekološkimi obolenji, kot je endometrioza oziroma benigne ciste jajčnikov. Vse pacientke iz omenjene skupine so bile obravnavane na isti kliniki kot pacientke z rakom. Dokončen histopatološki izvid je bil pridobljen na podlagi pregledanih vzorcev po končanem kirurškem zdravljenju in s tem izključena maligna patologija.

#### 4.2 Zbiranje vzorcev

Zbiranje vzorcev je potekalo po naslednjem protokolu:

Vsi vzorci so bili odvzeti pred pričetkom specifičnega onkološkega zdravljenja, ki je v večini primerov predstavljalo operativno zdravljenje. V nekaterih primerih so bili vzorci odvzeti še pred postavitvijo dokončne diagnoze, to je predvsem pri kliničnem sumu na rak jajčnikov, kjer ni bilo mogoče pridobiti histološkega izvida pred začetkom zdravljenja. Vsi vzorci krvi so bili odvzeti na tešče, pri čemer je od zadnjega zaužitja hrane in pijače minilo vsaj 8 ur. Vzorce je odvzela diplomirana medicinska sestra Klinike za ginekologijo in perinatologijo, vsi vzorci so bili odvzeti v dve 5mL BD Vacutainer epruveti za krvni serum. Največji sprejemljivi čas od odvzema krvi do zamrzovanja seruma je bil 4 ure. Vzorce smo takoj po odvzemu transportirali na Oddelek za laboratorijsko diagnostiko Univerzitetnega kliničnega centra Maribor, kjer je sledilo centrifugiranje ter pipetiranje seruma v 4 viala volumna 500  $\mu$ L.

#### 4.3 Shranjevanje vzorcev

Vzorce seruma smo zamrznili pri temperaturi  $-80^{\circ}\text{C}$ , kjer smo jih hranili vse do transporta v ustrezne laboratorije. Shranjevanje je potekalo v ustreznih zmrzovalnikih z redno kontrolo in beleženjem temperature.

#### 4.4 Transport vzorcev

Transport so opravili pogodbeni sodelavci podjetja DHL, ki so vzorce prevzeli neposredno v centralnem laboratoriju Univerzitetnega kliničnega centra Maribor in jih transportirali v laboratorije v Seviljo v Španiji na suhem ledu znotraj 12 ur, pri čemer ni prišlo do odtaljevanja vzorcev.

#### 4.5 Analiza in identifikacija metabolitov

232 znanih prehodov metabolitov smo izbrali na podlagi literature in predhodnjih znanj podjetja Universal Dx (Sevilja, Španija). Prehode smo opazovali s pomočjo 4 različnih analitičnih metod. Uporabili smo AB Sciex TQ in QTRAP 4500 masna spektrometra, združena s sistemom tekočinske kromatografije Nexera X2 HPLC (Shimadzu, Kjoto, Japonska) skupaj s črpalko, avtomatskim vzorčenjem, upravljalnikom in grelno enoto. Prazni vzorci in vzorci za kontrolo kakovosti so bili analizirani vsakih 10 minut za zagotavljanje stabilnosti sistema na dolgi rok ter uravnavanje normalizacije vzorcev.

## 4.6 Analiza vzorcev

### 3.6.1 LC-MS/MS

Vzorci za analizo so bili vbrizgani v 4 različne namenske platforme z uporabo Shimadzu 20/30 AD 4500, povezan s Triple Quad/QTRAP (Sciex, Madrid, Španija).

Ločevanje C18 polarnih metabolitov je bilo opravljeno na ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 50 mm, povezanim z VanGuard Acquity UPLC BEH C18 1,7 µm za zaščito kolone. Za mobilno fazo je bila uporabljena vodna raztopina (faza A) in acetonitril (faza B), oboje 0,1 % (v/v) mravljične kisline in gradient 98 % za 1 minuto in nato z 98 % na 2 % v 9 minutah z dodatnimi 4 minutami. Za analizo površine 67 znanih vrhov v kromatogramu je bil uporabljen MultiQuant Software (Sciex, Madrid, Španija).

Analiza lipidov je bila opravljena na napravi ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 100 mm, povezanim z VanGuard Acquity UPLC BEH C18 1,7 µm za zaščito kolone. Mobilna faze, uporabljene za analizo lipidov so bile: faza A: 40 % vode, 60 % acetonitrile 10 mM amonijevega formijata in 0,1 % mravljične kisline, faza B je bila sestavljena iz 10 % acetonitrile, 85% isopropanola, 5% vode, 10 mM amonijevega formijata in 0,1% mravljične kisline. Metoda gradienta je bila naslednja: 85 % faze A v 1 minuti, nato je sledilo zmanjšanje faze A na 70 % v 2 minutah, nato na 52 % v 0,5 minute, na 18 % v 8,5 minute, 1% v 0,5 minute, kjer je sledilo še dodatnih 0,5 minute.

Ločevanje amidov je potekalo z uporabo ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 50 mm, povezanim z VanGuard Acquity UPLC BEH C18 1,7 µm za zaščito kolone. Sestava mobilnih faz je bila sledeča: A: 70 % vode, 30 % acetonitrila, 10 mM amonijevega formiata in 0,1 % mravljične kisline, faza B je vsebovala 95 % acetonitrila, 5 % vode, 10 mM amonijevega formiata in 0,1% mravljične kisline. Metoda gradienta je bila 80 % faze A za 2 minuti, nato na 20 % v dveh minutah z dodatnimi 4 minutami.

FIA analiza injiciranega toka (angl. *flow injection analysis*) je bila opravljena z injiciranjem 2 µL s tokom 0,36 mL/min. Za mobilno fazo je bil uporabljen 100 % Isocratic s časom 1 min.

## 4.7 Analiza podatkov

Za tarčno ustvarjanje profilov je bilo opravljena integracija krivulje vrhov na kromatogramu s pomočjo MultiQuant Software (Sciex, Madrid, Španija). Integrale vrhov, torej površine pod krivuljo, so bile uporabljene za nadaljnje analize.

Profili analitov so bili izključeni iz analize v naslednjih primerih:

1. Zaznavni signal je bil odsoten v vsaj 40 % vseh analiziranih vzorcev,
2. koeficient variacije je presegel 30 % med vzorci, namenjenimi za kontrolo kakovosti,
3. koeficient variacije je presegel 20 % pri ponovitvah analiz.

227 izmed 232 testiranih metabolitov je imelo zaznaven signal v več kot 60 % vzorcev in 219 izmed 232 smo obdržali za analizo po testiranju koeficienta variacije. Usmerjene meritve profilov posameznih metabolitov smo normalizirali na povprečno vrednost signala znotraj vzorcev za kontrolo kakovosti znotraj serije za posamezen metabolit.

#### 4.8 Statistična analiza

Ločevalna analiza delnih najmanjših kvadratov, PLS-DA (angl. *Partial least square discriminant analysis*) statistično metodo smo uporabili za iskanje metabolita oziroma označevalca z najboljšo napovedno vrednostjo glede na odvisno spremenljivko X (rezultati vzorca). Pred samim PLS-DA smo serijo normalizirali z deljenjem vsake spremenljivke vsake serije s kvadratnim korenem povprečja kvadratov vseh prvotnih vrednosti serije. Nato smo logaritmizirali množico podatkov in jo rangirali s pomočjo metode Pareto (metoda zmanjša relativen pomen velikih vrednosti ob delnem ohranjanju strukture podatkov).

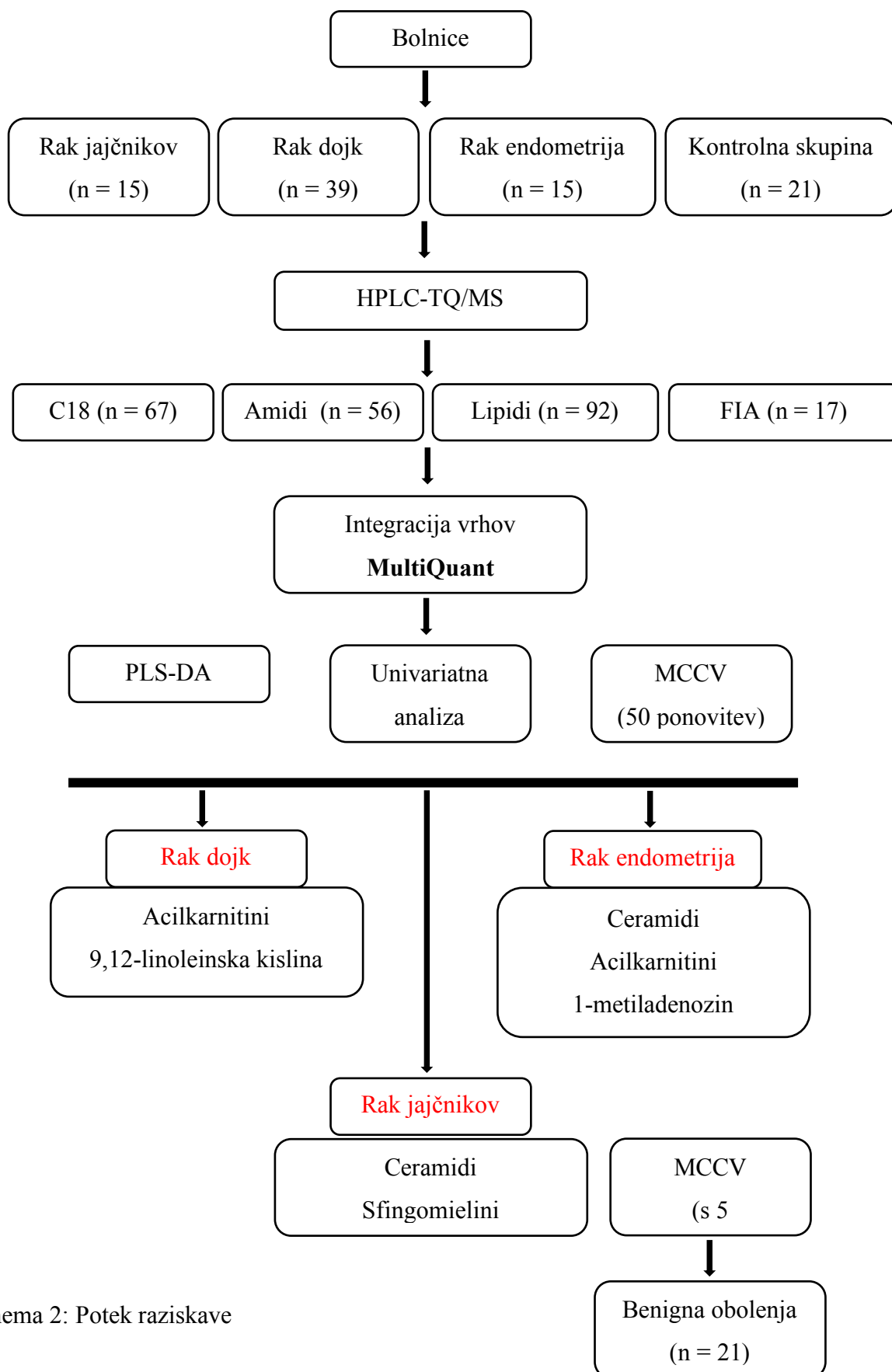
Univariatno analizo ROC krivulje smo uporabili za oceno diagnostične moči vsake posamezne molekule in njihovih razmerjih z uporabo ROCET orodja v programu R. Pred univariatno ROC analizo krivulje smo podatke normalizirali znotraj posamezne serije z deljenjem vsake spremenljivke vsake serije s kvadratnim korenem povprečja kvadratov vseh prvotnih vrednosti serije. Podatke smo logaritmizirali in razvrstili s pomočjo metode Pareto.

Podatkovno analizo smo opravili s pomočjo metode naključnih gozdov, (angl. *random forest*), ki je temeljila na lastnem modificiranem algoritmu. Izbiro pomembnih označevalcev smo

opravili z metodo sekvenčne navzadne izbire, SBS (angl. *sequential backward selection*). SBS temelji na klasifikaciji z algoritmom naključnih gozdov. Z uporabo napake izven vreče, OOB (angl. *out of bag error*) kot kriterijem za minimizacijo odstranjuje spremenljivke iz naključnih gozdov z zaporednim odstranjevanjem glede na najmanj pomembnih spremenljivk (kot so obtežene glede na klasifikacijo naključnih gozdov). Za testiranje uspešnosti spremenljivk smo uporabili navzkrižno preverjanje Monte Carlo, MCCV (angl. *Monte Carlo cross validation*), z lastnimi algoritmi. Za vsako ponovitev MCCV smo naključno razdelili n število vzorcev v dve skupini, v učno množico (angl. *training set*) ( $X_{train}$ ,  $Y_{train}$ ) in testno množico (angl. *testing set*) ( $X_{test}$ ,  $Y_{test}$ ). MCCV postopek smo ponovili N-krat (npr.  $N = 50$ ), nato smo uporabili povprečje in distribucijo napovedne uspešnosti (npr. Površina pod krivuljo z  $Y_{test}$ ).

Sestavljene povprečne krivulje (ROC) smo uporabili za izračun celokupne klasifikacijske učinkovitosti s pomočjo odprtokodne programske opreme R (ROCR).

Celoten shematski prikaz raziskave je prikazan na shemi 2.



Shema 2: Potek raziskave

## 5. Rezultati

### 5.1 Rak jajčnikov

#### 5.1.1 Bolnice

Klinične in demografske značilnosti skupine z rakom jajčnikov ter pripadajoče kontrolne skupine ter skupine z benignimi ginekološkimi obolenji so predstavljene v tabeli 14. Zdrave udeleženske iz raziskave so bile uravnotežene s skupino bolnic z rakom jajčnikov glede na starost in indeks telesne mase, medtem ko menopavzni status ni bil enako porazdeljen med obema skupinama. Polovica skupine z rakom jajčnikov so bili primeri v stadiju I, medtem ko je bil en sam primer v stadiju IV.

ZNAČILNOSTI	RAK JAJČNIKOV	ZDRAVA KONTROLNA SKUPINA	BENIGNA GINEKOLOŠKA OBOLENJA
Št. bolnic	15	21	21
<b>KLINIČNE ZNAČILNOSTI</b>			
<b>Starost</b>	60 ± 11	54 ± 19	51 ± 13
<b>ITM</b>	26 ± 4	25 ± 4	26 ± 5
<b>Kadilka</b>	4/21 (19 %)	1/21 (5 %)	2/21 (10 %)
<b>Bivša kadilka</b>	4/21 (19 %)	6/21 (29 %)	4/21 (19 %)
<b>Pred menopavzo</b>	3/21 (14 %)	15/21 (71 %)	13/21 (62 %)
<b>Po menopavzi</b>	18/21 (86%)	6/21 (29 %)	8/21 (28 %)
<b>FIGO STADIJ</b>			
<b>Stadij I</b>	7 (33 %)	/	/
<b>Stadij II</b>	1 (5 %)	/	/
<b>Stadij III</b>	5 (24 %)	/	/
<b>Stadij IV</b>	1 (5 %)	/	/
<b>HISTOLOŠKI TIP</b>			
<b>Serozni adenokarcinom</b>	5 (24 %)	/	/
<b>Mucinozni adenokarcinom</b>	1 (5 %)	/	/
<b>Endometrioidni adenokarcinom</b>	1 (5 %)	/	/
<b>Svetlocelični karcinom</b>	3 (14 %)	/	/
<b>Mejno maligni tumor jajčnikov</b>	4 (19 %)	/	/
<b>Brennerjev tumor</b>	1 (5 %)	/	/

Tabela 14: Klinično-patološke značilnosti bolnic z rakom jajčnikov.



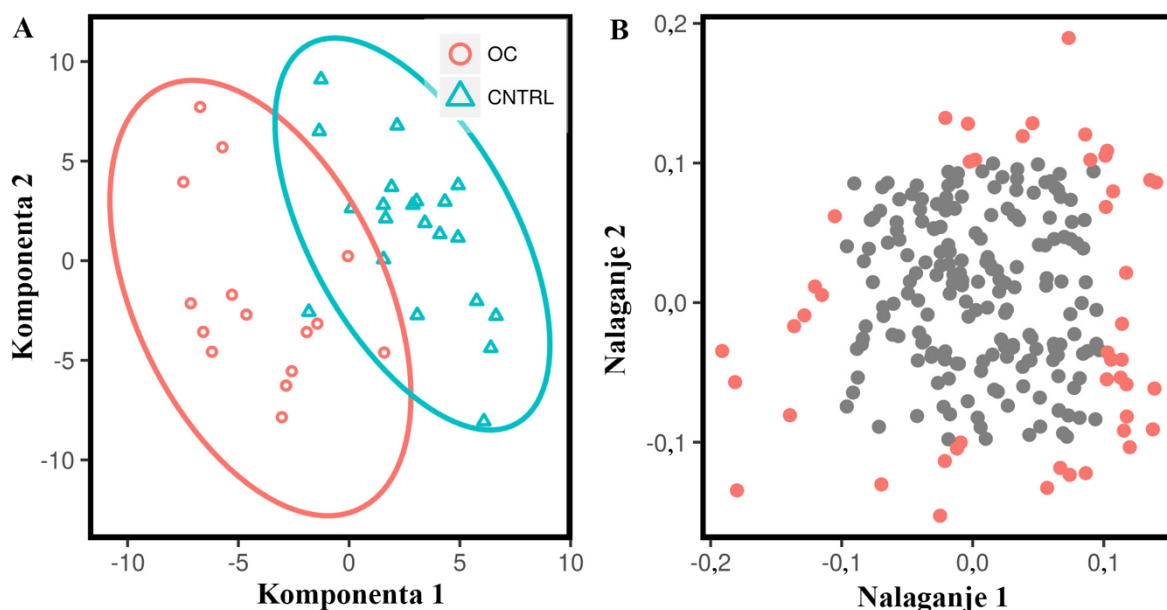
## 5.1.2 Profil metabolitov

### 5.1.2.1 Analiza serumskega profila metabolitov s pomočjo HPLC-TQ/MS

Cilj raziskave je bil poiskati razlike v metabolomu med bolnicami z rakom jajčnikov in ženskami iz kontrolne skupine. S tem namenom smo analizirali relativne koncentracije 232 znanih metabolitov s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti masne spektrometrije s trojnim kvadrupolnim analizatorjem in masno spektrometrijo HPLC-TQ/MS (angl. *high performance liquid chromatography, triple quadruple with mass spectrometry*), kar pomeni tekočinsko kromatografijo, povezano z masno spektrometrijo. Po opravljeni kontroli kakovosti je ostalo 219 metabolitov, primernih za nadaljnjo statistično obdelavo, kjer smo iskali diagnostično vrednost spektra metabolitov v diagnostiki raka jajčnikov.

### 5.1.2.2 Analiza PLS-DA

PLS-DA statistično metodo smo uporabili za odkrivanje splošne opisne moči metabolomike, ki je temeljila na pristopu razlikovanja med bolnicami z rakom jajčnikov in zdravo kontrolno skupino. PLS-DA smo uporabili za primere raka jajčnikov ter čisto kontrolno skupino (15 bolnic z rakom jajčnikov in 21 žensk iz kontrolne skupine, kot je opisano v tabeli 14) z upoštevanjem izmerjenih koncentracij izbranih 219 metabolitov, izmerjenih s pomočjo tekočinske kromatografije in masne spektrometrije (HPLC-TQ/MS). Metoda PLS-DA temelji na iskanju hiper-ravnin z največjo varianco med odvisno in neodvisno spremenljivko, torej preizkuša model linearne regresije s projiciranjem predvidene spremenljivke in opazovanih vrednosti v nov prostor. Ker sta tako odvisna, kot neodvisna spremenljivka projicirani v nove prostore, PLS sodi v skupino metod bilinearnih faktorskih modelov. PLS-DA je sicer metoda izbora le za primere, kjer je odvisna spremenljivka kategorična in išče največjo možno ločnico med skupinami. Rezultati ločevanja bolnic z rakom jajčnikov (OC) in kontrolne skupine (CNTRL) so prikazani na shemi 3A z upoštevanjem vseh 219 analiziranih ter validiranih metabolitov. Rezultat prikazuje jasno ločnico med rakom jajčnikov in kontrolno skupino. Slika 3B prikazuje pomen posameznih komponent modela, kjer je jasno viden prispevek posameznih označevalcev pri ločevanju raka jajčnikov od kontrolne skupine. Komponente, ki so od izhodišča oddaljene dlje, imajo večjo napovedno vrednost. Označevalci z največjo diskriminatorsko vrednostjo glede na PLS-DA so povzeti v tabeli 15.



Shema 3: A - PLS-DA shema prikazuje ločevanje med rakom jajčnikov in kontrolno skupino, temelječe na setu 219 analiziranih označevalcev. B - Prikaz vpliva različnih označevalcev na grupiranje vzorcev raka jajčnikov (metaboliti, ki so bolj oddaljeni od izhodišča, imajo večjo napovedno vrednost). Povzeto po Kozar in sodelavci (2018)<sup>170</sup>

	KOMP 1	KOMP 2	KOMP 3	GLOBALNO
<b>Cer 34:1;2</b>	2,9	2,7	2,5	2,9
<b>Cer 40:1;2</b>	2,8	2,5	2,3	2,8
<b>Cer 42:1;2</b>	2,7	2,6	2,5	2,7
<b>DI-p-hidroksifenilaktična kislina</b>	2,1	2,0	1,9	2,1
<b>Cer 44:1;2</b>	2,1	2,0	1,8	2,1
<b>Pufa 1</b>	2,1	2,0	1,8	2,1
<b>Pufa 4.1</b>	2,1	2,0	1,9	2,1
<b>SM 36:0;2</b>	2,1	1,9	1,8	2,1
<b>Glutamin</b>	2,1	2,0	1,9	2,1
<b>SM 36:1;2</b>	2,0	1,8	1,7	2,0

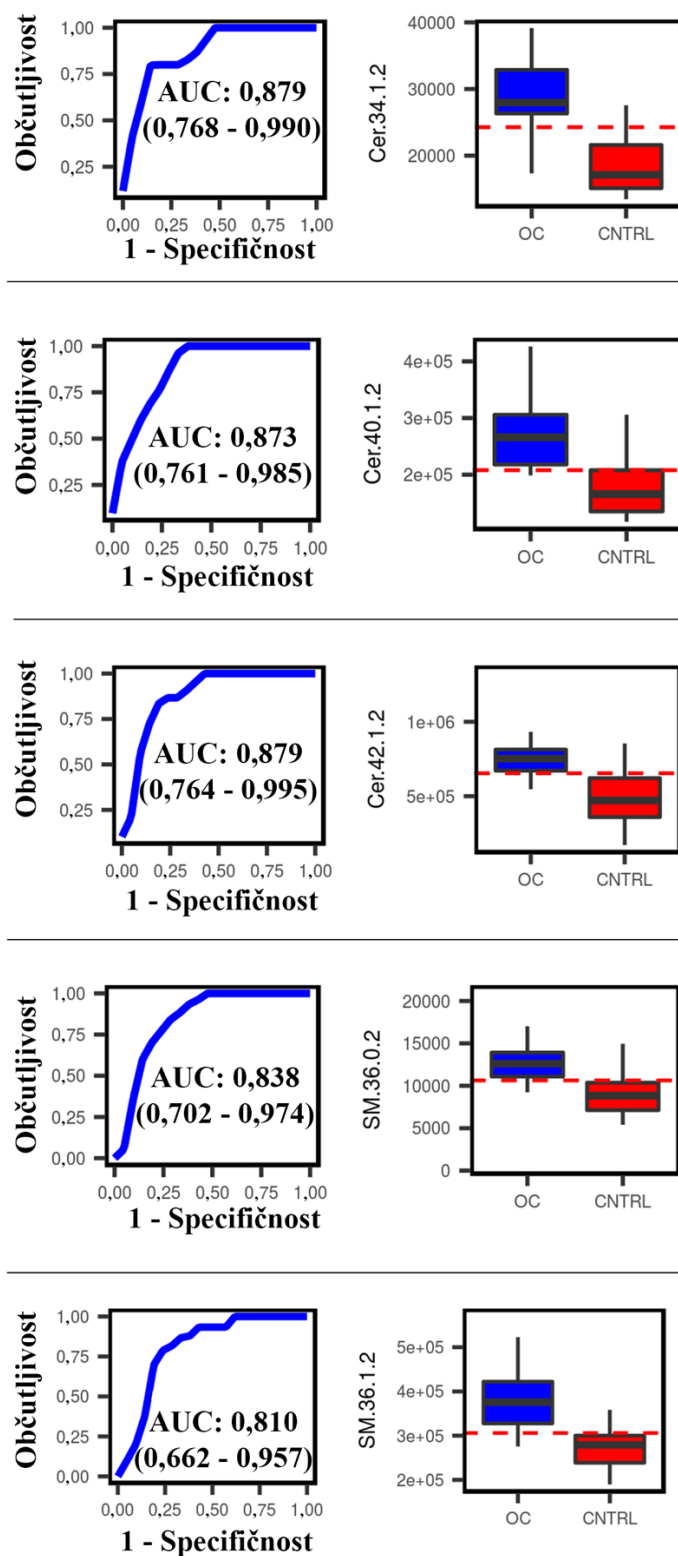
Tabela 15: Označevalci razvrščeni glede na njihovo diskriminatorno moč po izračunih PLS-DA

### 5.1.2.3 Univariatna analiza

Univariatno analizo smo izvedli na podlagi razlike vseh individualnih označevalcev med skupinama raka jajčnikov in kontrolne skupine ter ustvarili posamezne ROC krivulje za vsak označevalec posebej, pri čemer smo iskali tiste z največjo površino pod krivuljo, torej z največjo diagnostično vrednostjo. V tabeli 16 so prikazani označevalci s površino pod krivuljo AUC (angl. *area under the curve*) večjo od 0,8. Takšnih je bilo 8 označevalcev. ROC krivulje ter škatle z brki so prikazane na shemi 4.

OZNAČEVALEC	AUC	OBČUTLJIVOST	SPECIFIČNOST	p
<i>Cer 34:1;2</i>	0,89	0,80	0,86	$1,69 \times 10^{-7}$
<i>Cer 40:1;2</i>	0,89	0,80	0,76	$2,15 \times 10^{-6}$
<i>Cer 42:1;2</i>	0,87	0,80	0,76	$6,28 \times 10^{-5}$
<i>SM 36:0;2</i>	0,84	0,67	0,71	$1,40 \times 10^{-3}$
<i>Holestenoična kislina</i>	0,83	0,73	0,90	$1,09 \times 10^{-6}$
<i>N1,n12-diacetilspermin</i>	0,83	0,67	0,90	$7,74 \times 10^{-6}$
<i>Dl-p-hidroksifenilaktična kislina</i>	0,81	0,73	0,81	$1,43 \times 10^{-4}$
<i>SM 36:1;2</i>	0,81	0,60	0,85	$9,1 \times 10^{-3}$

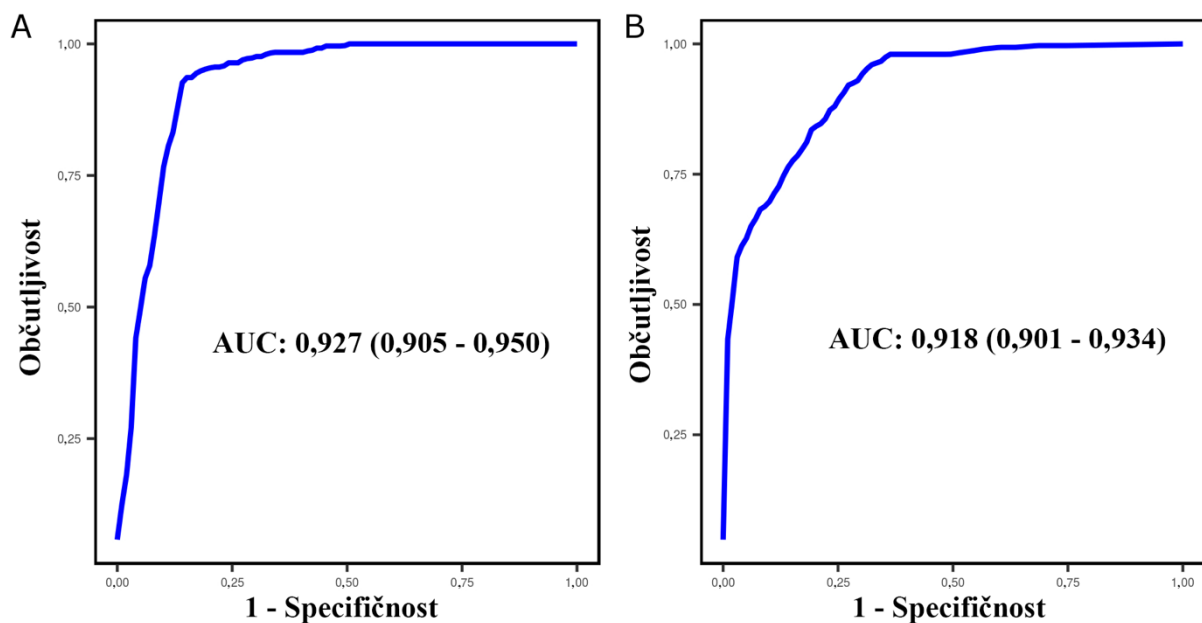
Tabela 16: Diagnostična vrednost posameznih označevalcev glede na izračun univariatne analize



Shema 4: ROC krivulje in škatle z brki (angl. *boxplot*) prikazi univariatne analize za najboljših 5 označevalcev ob primerjavi raka jajčnikov in zdrave kontrolne skupine.

#### 5.1.2.4 Napovedni model

Za ustvarjanje napovednega modela analiziranih metabolitov ter posledično selekcijo najpomembnejših smo uporabili algoritem naključnih gozdov, nato smo testirali napovedno uspešnost modela s pomočjo navzkrižnega testiranja Monte Carlo ob uporabi uravnoveženega vzorčenja in 50 naključnih ponovitev. V vsaki ponovitvi MCCV sta bili dve tretjini naključno izbranih vzorcev uporabljeni za oceno uteži posameznih parametrov. Končni algoritem je bil ustvarjen na podlagi povprečnih vrednosti pomena posameznih označevalcev iz vseh ponovitev in nato testiran na preostali tretjini vzorcev. Na podlagi MCCV validacije smo ustvarili končni klasifikacijski model, temelječ na 49 najpomembnejših označevalcih z močno skupno napovedno vrednostjo in površino pod krivuljo (AUC) 0,927 (CI 0,905–0,950), kot je razvidno na shemi 5A. Ob upoštevanju vseh 49 označevalcev je specifičnost tovrstnega testa 87 % ob 87 % občutljivosti. Shema 5B prikazuje ROC krivuljo za najpomembnejših 5 označevalcev.



Shema 5: ROC krivulji, ki prikazujeta A: Površino pod krivuljo AUC za set 49 najpomembnejših označevalcev pri razlikovanju med skupino z rakom jajčnikov in zdravo kontrolno skupino in B: AUC za 5 najpomembnejših označevalcev pri razlikovanju med skupino z rakom jajčnikov in zdravo kontrolno skupino. Povzeto po Kozar in sod. (2018)

#### 5.1.2.5 Izbor najpomembnejših označevalcev

Med najpomembnejšimi označevalci, ki smo jih določili s pomočjo PLS-DA in multivariatno analizo, izstopajo metaboliti iz skupine ceramidov in sfingomielinov. Med 5 najpomembnejšimi označevalci so Cer 34:1;2 (C16-ceramid), Cer 40:1;2 (C22-ceramid), Cer 42:1;2 (C24-ceramid), SM 36:0;2 (C18 sfingomielin) in SM 36:1;2 (C18:1 sfingomielin).

Za vseh 5 najpomembnejših označevalcev smo testirali individualno diagnostično vrednost s pomočjo univariatne analize. Vsi označevalci so se sicer izkazali za uspešne v diagnostiki, vendar niso dosegli diagnostične učinkovitosti, kot je opisana v primeru sočasne uporabe več označevalcev hkrati.

Glede na opazovano učinkovitost 5 najpomembnejših označevalcev v ločevanju bolnic z rakom jajčnikov in kontrolne skupine, smo učinkovitost preizkusili še na razširjenem vzorcu. Vključili smo 21 bolnic z benignimi ginekološkimi obolenji in jih primerjali z bolnicami z rakom jajčnikov. Ponovno smo analizirali ROC krivulje s pomočjo MCCV pristopa v 50 ponovitvah, vendar tokrat zgolj z upoštevanjem 5 najpomembnejših označevalcev. Povprečna površina pod krivuljo (AUC) za 50 ponovitev je znašala 0,920 (CI = 0,901–0,934) z ocenjeno specifičnostjo 80 % in 83 % občutljivosti. Tvrstni rezultati nakazujejo na potencial ceramidov in sfingomielinov za uporabo v diagnostične namene in sicer tako za razlikovanje zdravih žensk od tistih z rakom jajčnikov, kot tudi tistih z rakom od tistih z benignimi, vendar suspektnimi obolenji.

## 5.2 Rak dojk

### 5.2.1 Bolnice

Klinične in demografske značilnosti skupine z rakom dojk ter pripadajoče kontrolne skupine so predstavljene v tabeli 17. Zdrave udeleženske iz raziskave so bile uravnotežene s skupino bolnic z rakom dojk glede na starost in indeks telesne mase. Kontrolna skupina je enaka kot pri raku jajčnikov.

ZNAČILNOSTI	RAK DOJK	ZDRAVA KONROLNA SKUPINA
Št. bolnic	39	21
<b>KLINIČNE ZNAČILNOSTI</b>		
<b>Starost</b>	61 ± 12	54 ± 19
<b>ITM</b>	27 ± 6	25 ± 4
<b>Kadilka</b>	7/39 (18 %)	1/21 (5 %)
<b>Bivša kadilka</b>	10/39 (26 %)	6/21 (29 %)
<b>Pred menopavzo</b>	9/39 (23 %)	15/21 (71 %)
<b>Po menopavzi</b>	30/39 (77 %)	6/21 (29 %)
<b>FIGO STADIJ</b>		
<b>Stadij IA</b>	0/39 (0 %)	/
<b>Stadij IB</b>	11/39 (28 %)	/
<b>Stadij IC</b>	28/39 (72 %)	/
<b>HISTOLOŠKI TIP</b>		
<b>Invazivni duktalni karcinom</b>	27/39 (69 %)	/
<b>Invazivni lobularni karcinom</b>	5/39 (13 %)	/
<b>Drugi tipi</b>	7/39 (18 %)	/

Tabela 17: Klinično-patološke značilnosti bolnic z rakom dojk.

## 5.2.2 Profil metabolitov

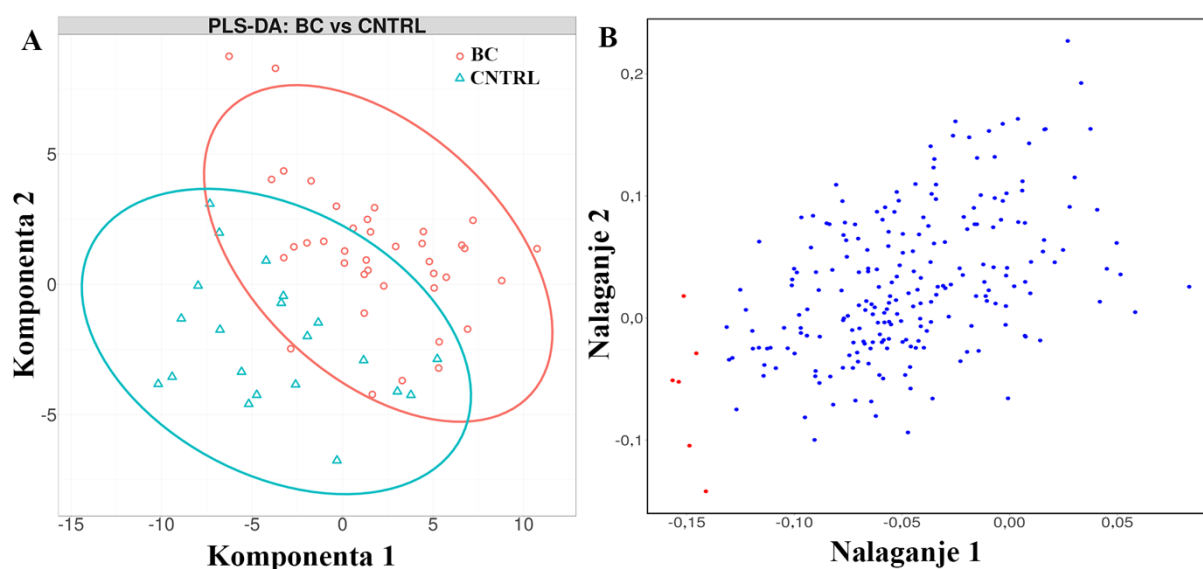
### 5.2.2.1 Analiza serumskega profila metabolitov s pomočjo HPLC-TQ/MS

Pri raku dojk smo, podobno kot pri raku jajčnikov, iskali razlike v kvantitativni sestavi metabolitov v serumu bolnic z rakom dojk in kontrolne skupine. V analizi smo zajeli istih 232 metabolitov kot pri raku jajčnikov. Vse analize smo opravili s pomočjo HPLC-TQ/MS.

### 5.2.2.2 Analiza PLS-DA

Analizo PLS-DA smo opravili na vseh vzorcih, ki so uspešno prestali kontrolo kakovosti (219). PLS-DA smo uporabili za primere raka dojk ter čisto kontrolno skupino (39 bolnic z rakom dojk in 21 žensk iz kontrolne skupine, kot je opisano v tabeli 17) z upoštevanjem izmerjenih koncentracij izbranih 219 metabolitov, izmerjenih s pomočjo HPLC-TQ/MS. Rezultati ločevanja bolnic z rakom dojk BC (angl. *breast cancer*) in kontrolne skupine (CNTRL) so prikazani na shemi 6A z upoštevanjem vseh 219 analiziranih ter validiranih metabolitov. Rezultat prikazuje jasno ločnico med rakom dojk in kontrolno skupino. Shema 6B prikazuje pomen posameznih komponent modela, kjer je jasno viden prispevek posameznih označevalcev pri ločevanju raka dojk od kontrolne skupine. Komponente, ki so od izhodišča oddaljene dlje, imajo večjo napovedno vrednost. Označevalci z največjo diskriminatorno vrednostjo glede na PLS-DA so povzeti v tabeli 18.





Shema 6: PLS-DA shema prikazuje ločevanje med rakom dojk in kontrolno skupino, temelječe na setu 219 analiziranih označevalcev. B: Prikaz vpliva različnih označevalcev na grupiranje vzorcev raka dojk (metaboliti, ki so bolj oddaljeni od izhodišča, imajo večjo napovedno vrednost).

	KOMP 1	KOMP 2	KOMP 3	GLOBALNO
<b>AC 12:0</b>	2,8	1,8	1,7	2,4
<b>AC 14:2</b>	2,3	1,8	1,6	2,3
<b>AC 14:0</b>	2,3	1,7	1,6	2,3
<b>3-(3-hidroksifenil) propionat</b>	2,3	2,0	1,8	2,2
<b>AC 16:2</b>	2,2	1,6	1,5	2,2
<b>Sebacinska kislina</b>	2,1	2,2	2,0	2,1
<b>AC 14:1</b>	2,0	1,4	1,4	2,0
<b>PC O-36:3 (18:1/18:2)</b>	2,0	1,5	1,3	2,0

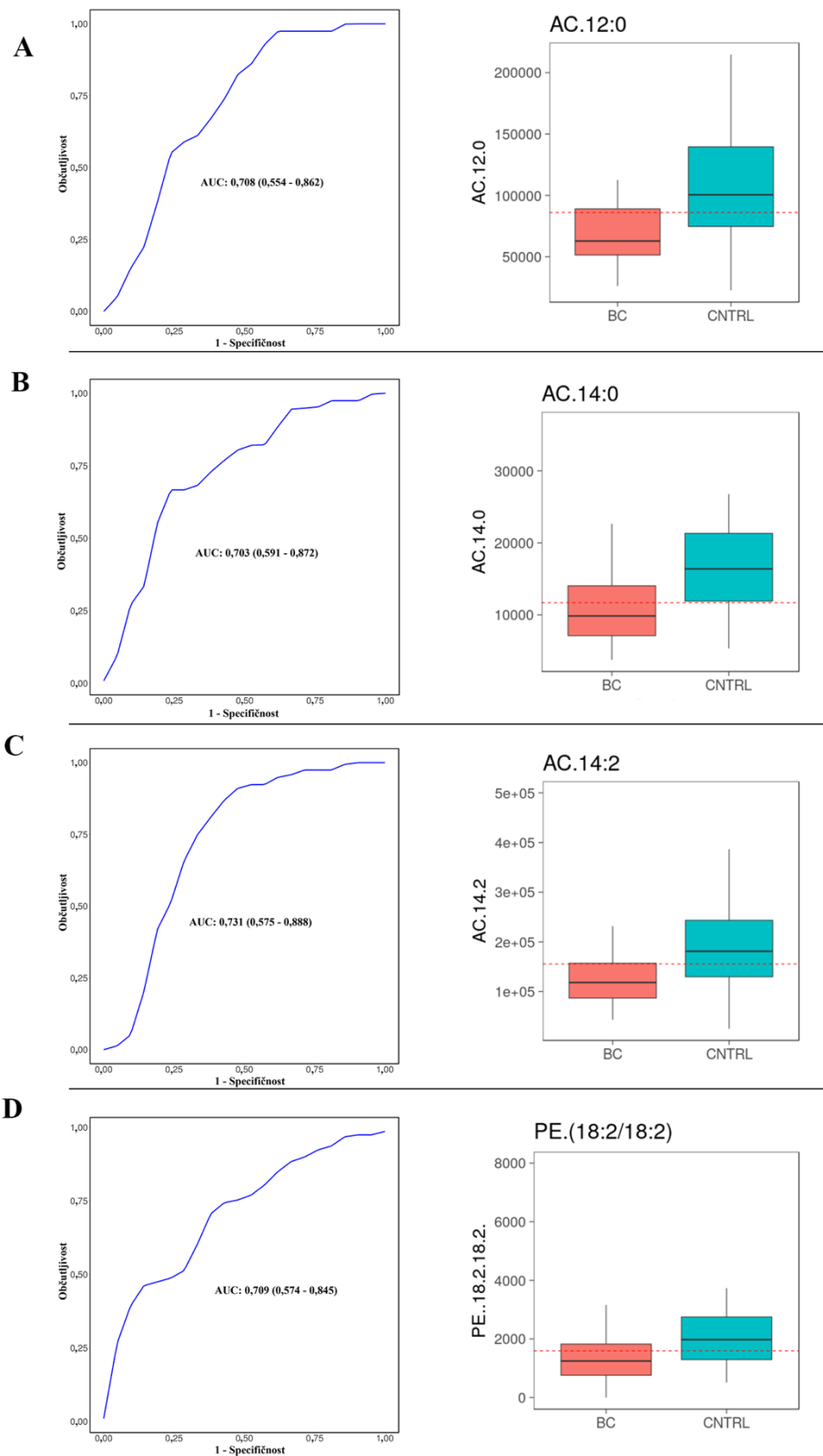
Tabela 18: Označevalci razvrščeni glede na njihovo diskriminatorsko moč po izračunih PLS-DA.

### 5.2.2.3 Univariatna analiza

Univariatno analizo smo izvedli na podlagi individualnih razlik med posameznimi označevalci, pri čemer smo ustvarili ROC krivulje za posamezne označevalce ter jih nato razporedili glede na površino pod krivuljo in s tem povezano diagnostično vrednostjo. V tabeli 19 so prikazani označevalci s površino pod krivuljo večjo od 0,7. Takšni si bili 4 označevalci. ROC krivulje in škatle z brki (angl. *boxplot*) za posamezne označevalce so prikazane na shemi 7.

OZNAČEVALEC	AUC	OBČUTLJIVOST	SPECIFIČNOST	p
<b>AC 14:2</b>	0,73	0,74	0,71	$1,52 \times 10^{-4}$
<b>AC 14:0</b>	0,73	0,67	0,81	$3,05 \times 10^{-5}$
<b>PE (18:2/18:2)</b>	0,71	0,69	0,67	$4,60 \times 10^{-3}$
<b>AC 12:0</b>	0,71	0,72	0,62	$8,55 \times 10^{-3}$

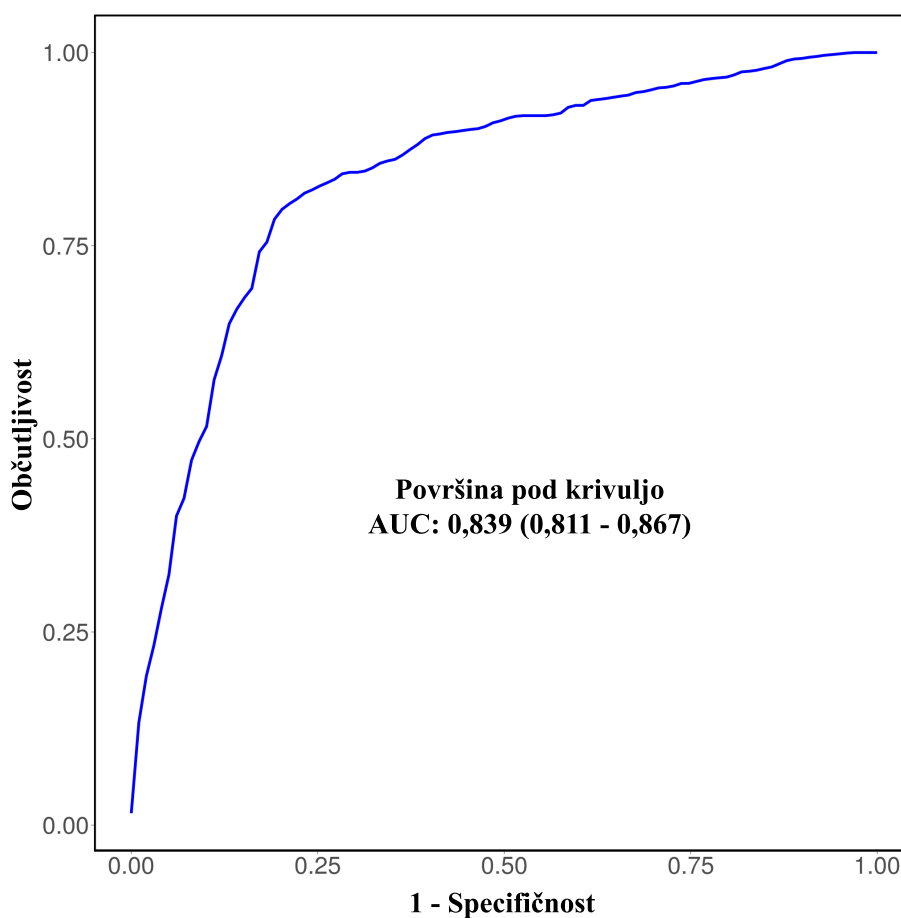
Tabela 19: Diagnostična vrednost posameznih označevalcev glede na izračun univariatne analize



Shema 7: ROC krivulje in škatle z brki (angl. *boxplot*) prikazi univariatne analize za najpomembnejše 4 označevalce (A–D) ob primerjavi raka dojke in zdrave kontrolne skupine.

#### 5.2.2.4 Napovedni model

Za ustvarjanje napovednega modela analiziranih metabolitov ter posledično selekcijo najbolj najpomembnejših smo uporabili algoritem naključnih gozdov (angl. *random forest*), nato smo testirali napovedno uspešnost modela s pomočjo Monte Carlo navzkrižnega testiranja ob uporabi uravnoveženega vzorčenja in 50 naključnih ponovitev. V vsaki ponovitvi MCCV sta bili dve tretjini naključno izbranih vzorcev uporabljeni za oceno uteži posameznih parametrov. Končni algoritem je bil ustvarjen na podlagi povprečnih vrednosti pomena posameznih označevalcev iz vseh ponovitev in nato testiran na preostali tretjini vzorcev. Na podlagi validacije MCCV smo ustvarili končni klasifikacijski model, temelječ na 4 najpomembnejših označevalcih z občutljivostjo 83 % in specifičnostjo 81 % ob površini pod krivuljo (AUC) 0,839 (CI 0,811–0,867), kot je razvidno iz slike 8.



Shema 8: ROC krivulja, ki prikazuje površino pod krivuljo »AUC« za set 4 najpomembnejših označevalcev pri razlikovanju med skupino z rakom dojke in zdravo kontrolno skupino.

#### 5.2.2.5 Izbor najpomembnejših označevalcev

Med najpomembnejšimi označevalci, ki smo jih določili s pomočjo PLS-DA in multivariatno analizo, izstopajo metaboliti iz skupine acilkarnitinov. Med 4 najpomembnejšimi označevalci so AC 14:2 (tetradecenoilkarnitin), AC 14:0 (tetradekanoilkarnitin), PE (18:2/18:2) (9,12-linoleinska kislina) in AC 12:0 (dodekanoilkarnitin).

Za najpomembnejše označevalce smo testirali diagnostično učinkovitost s pomočjo univariatne analize. Kljub uspešnosti posameznih označevalcev še vedno prevlada diagnostična učinkovitost seta več označevalcev.

### 5.3 Rak endometrija

#### 5.3.1 Bolnice

Tabela 20 prikazuje klinične in demografske značilnosti skupine z rakom endometrija ter pripadajoče kontrolne skupine. Zdrave udeleženske iz raziskave so bile uravnotežene s skupino bolnic z rakom endometrija glede na starost in indeks telesne mase, vendar ne glede na menopavzni status. Kontrolna skupina je enaka, kot pri raku dojke in raku jajčnikov.

ZNAČILNOSTI	RAK ENDOMETRIJA	ZDRAVA KONROLNA SKUPINA
Št. bolnic	15	21
<b>KLINIČNE ZNAČILNOSTI</b>		
<b>Starost</b>	64 ± 14	54 ± 19
<b>ITM</b>	29 ± 7	25 ± 4
<b>Kadilka</b>	0/15 (0 %)	1/21 (5 %)
<b>Bivša kadilka</b>	0/15 (0 %)	6/21 (29 %)
<b>Pred menopavzo</b>	3/15 (20 %)	15/21 (71 %)
<b>Po menopavzi</b>	12/15 (80 %)	6/21 (29 %)
<b>FIGO STADIJ</b>		
<b>Stadij I</b>	9/15 (60 %)	/
<b>Stadij II</b>	2/15 (13 %)	/
<b>Stadij III</b>	3/15 (20 %)	/
<b>Stadij IV</b>	1/15 (1 %)	/
<b>HISTOLOŠKI TIP</b>		
<b>Endometrioidni tip</b>	15/15 (100 %)	/

Tabela 20: Klinično-patološke značilnosti bolnic z rakom endometrija.

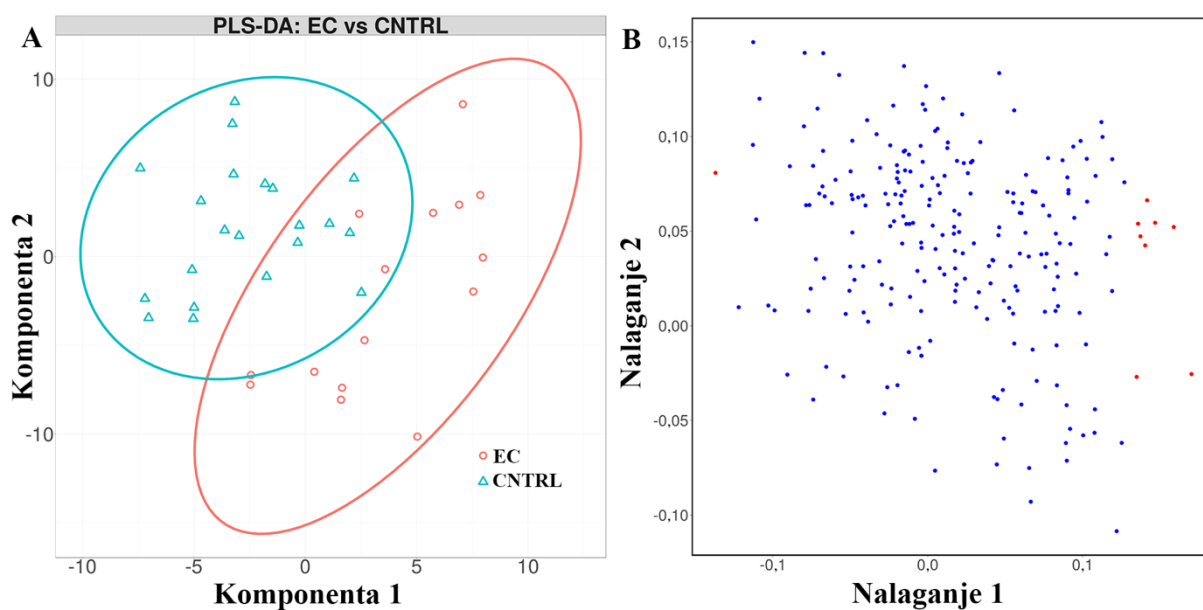
## 5.3.2 Profil metabolitov

### 5.3.2.1 Analiza serumskega profila metabolitov s pomočjo HPLC-TQ/MS

Pri raku endometrija smo, podobno kot pri raku jajčnikov in dojk, iskali razlike v kvantitativni sestavi metabolitov v serumu pacientk z rakom dojk in kontrolne skupine. V analizi smo zajeli enake metabolite kot pri raku jajčnikov in dojk (323 metabolitov, 219 po opravljeni kontroli kakovosti). Vse analize smo opravili s pomočjo HPLC-TQ/MS.

### 5.3.2.2 Analiza PLS-DA

Analizo PLS-DA smo opravili na 219 vzorcih, ki so uspešno prestali kontrolo kakovosti. PLS-DA smo uporabili za primere raka endometrija ter čisto kontrolno skupino (15 bolnic z rakom endometrija in 21 žensk iz kontrolne skupine, kot je razvidno iz tabele 20) z upoštevanjem določenih koncentracij 219 metabolitov, izmerjenih s pomočjo HPLC-TQ/MS. Rezultati ločevanja bolnic z rakom endometrija (angl. *endometrial cancer*) (EC) in kontrolne skupine (CNTRL) so prikazani na shemi 9A z upoštevanjem vseh 219 analiziranih ter validiranih metabolitov. Rezultat prikazuje ločevanje med rakom endometrija in kontrolno skupino. Shema 9B prikazuje vpliv posameznih komponent modela, kjer je možno videti delež posameznih označevalcev pri ločevanju raka endometrija od kontrolne skupine. Najpomembnejši označevalci glede na PLS-DA so povzeti v tabeli 21.



Shema 9: A - Shema PLS-DA prikazuje ločevanje med rakom endometrija in kontrolno skupino, temelječe na setu 219 analiziranih označevalcev. B - Prikaz vpliva različnih označevalcev na grupiranje vzorcev raka endometrija (metaboliti, ki so bolj oddaljeni od izhodišča, imajo večjo napovedno vrednost).

	KOMP 1	KOMP 2	KOMP 3	GLOBALNO
<b>Cer 34:1;2</b>	2,6	2,3	2,0	2,6
<b>AC 16:1-OH</b>	2,4	2,1	1,9	2,4
<b>AC 16:1</b>	2,2	2,0	1,8	2,2
<b>AC 14:1</b>	2,2	2,0	1,7	2,2
<b>Cer 40:1;2</b>	2,1	1,9	1,7	2,1
<b>AC 14:0</b>	2,1	1,8	1,7	2,1

Tabela 21: Označevalci razvrščeni glede na njihovo diskriminatorno moč po izračunih PLS-DA.

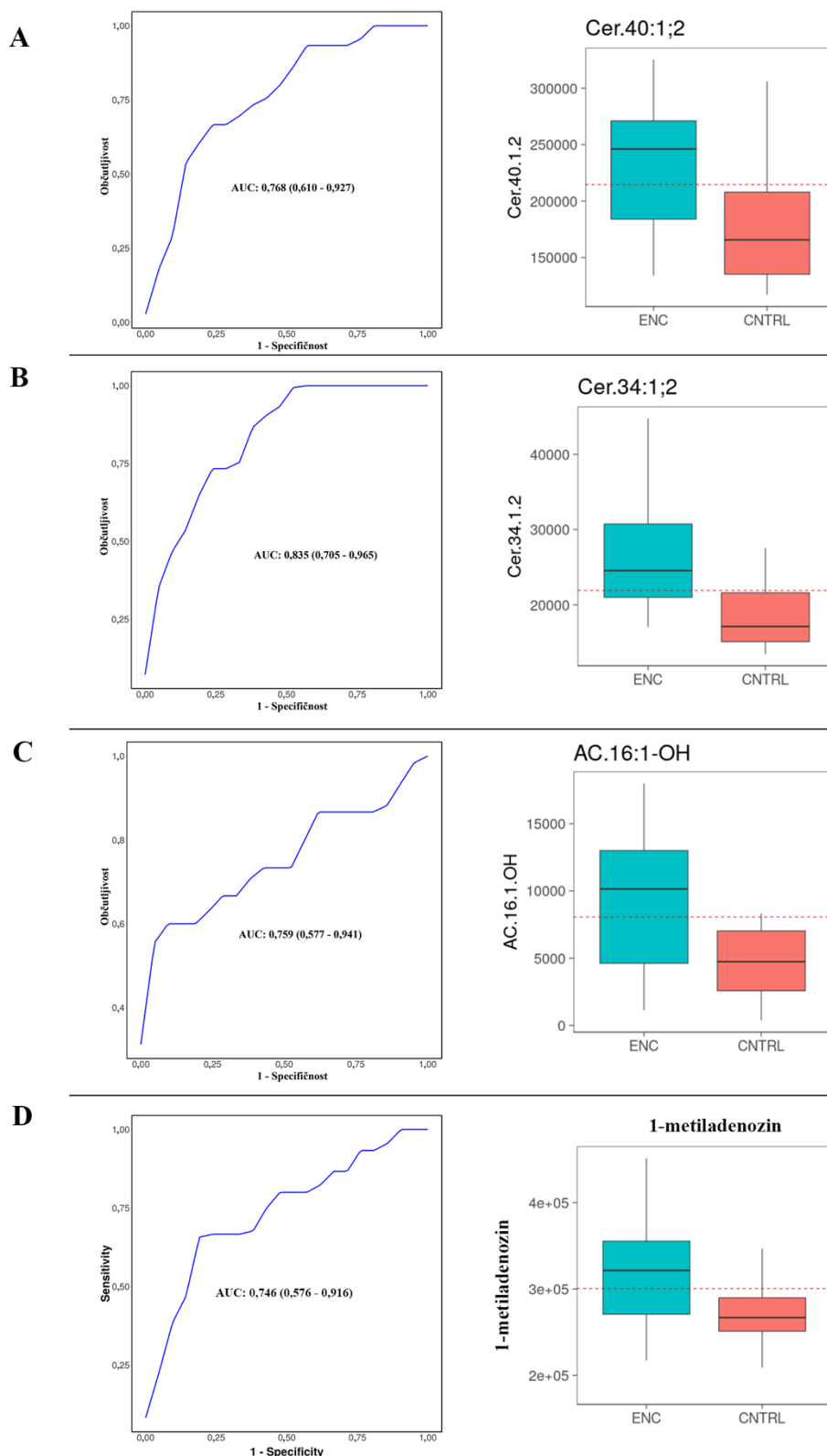


### 5.3.2.3 Univariatna analiza

Na podlagi individualnih razlik med posameznimi označevalci smo opravili univariatno analizo s pomočjo paketa ROCET v programski opremi R, pri čemer smo ustvarili krivulje ROC za posamezne označevalce ter jih nato razporedili glede na padajočo površino pod krivuljo. V tabeli 22 so prikazani označevalci s površino pod krivuljo (AUC) večjo od 0,7. Takšni si bili 4 označevalci. ROC krivulje in škatle z brki so prikazane na shemi 10.

OZNAČEVALEC	AUC	OBČUTLJIVOST	SPECIFIČNOST	p
<b>Cer 34:1;2</b>	0,83	0,73	0,81	$1,0 \times 10^{-4}$
<b>Cer 40:1;2</b>	0,77	0,67	0,81	$1,4 \times 10^{-3}$
<b>AC 16:1-OH</b>	0,76	0,60	0,96	$4,14 \times 10^{-5}$
<b>1-metiladenozin</b>	0,75	0,67	0,81	$1,38 \times 10^{-3}$

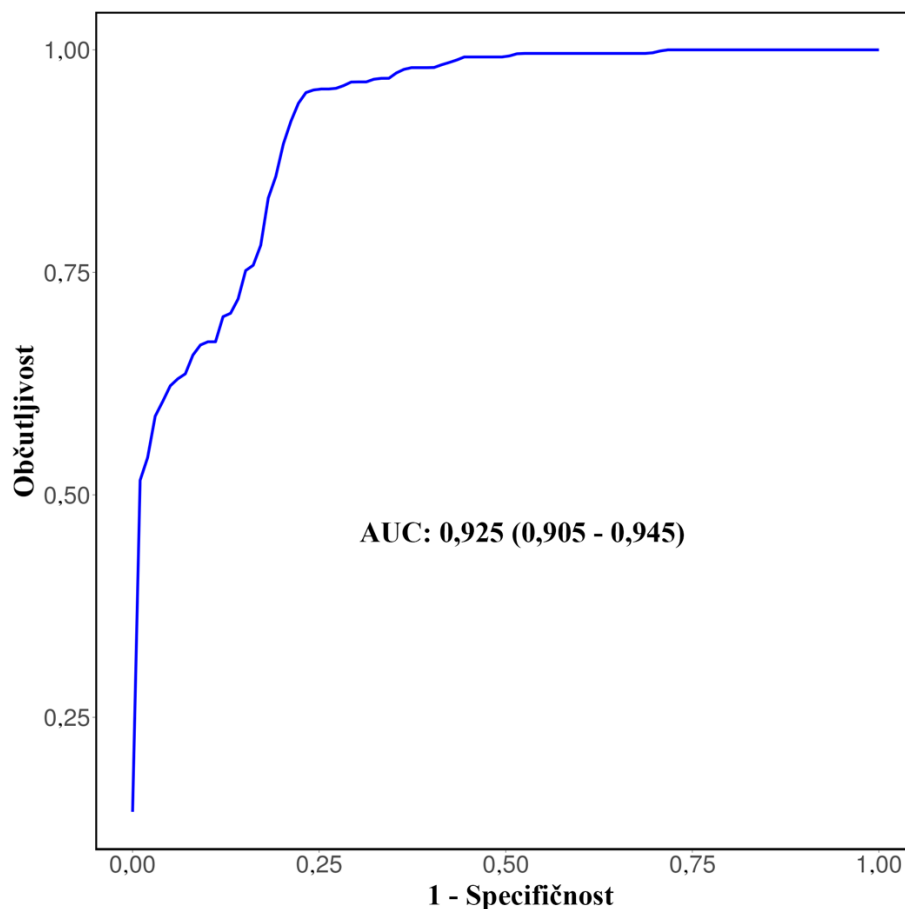
Tabela 22: Diagnostična vrednost posameznih označevalcev glede na izračun univariatne analize



Shema 10: Krivulje ROC in škatle z brki, ki prikazujejo univariatno analizo za najpomembnejše 4 označevalce (A–D) ob primerjavi raka endometrija in zdrave kontrolne skupine.

### 5.3.2.4 Napovedni model

Za ustvarjanje napovednega modela analiziranih metabolitov ter posledično selekcijo najbolj najpomembnejših smo uporabili algoritem naključnih gozdov (angl. *random forest*), nato smo testirali napovedno uspešnost modela s pomočjo MCCV (angl. *Monte Carlo cross validation*) ob uporabi uravnoveženega vzorčenja in 50 naključnih ponovitev. V vsaki ponovitvi MCCV sta bili dve tretjini naključno izbranih vzorcev uporabljeni za oceno uteži posameznih parametrov. Končni algoritem je bil ustvarjen na podlagi povprečnih vrednosti pomena posameznih označevalcev iz vseh ponovitev in nato testiran na preostali tretjini vzorcev. Na podlagi MCCV validacije smo ustvarili končni klasifikacijski model, temelječ na 4 najpomembnejših označevalcih s pomembno skupno napovedno vrednostjo in površino pod krivuljo (AUC) 0,925 (CI 0,905–0,945), kot je razvidno iz slike 11.



Shema 11: Krivulja ROC, ki prikazuje površino pod krivuljo AUC za set 4 najpomembnejših označevalcev pri razlikovanju med skupino z rakom endometrija in zdravo kontrolno skupino.

#### 5.3.2.5 Izbor najpomembnejših označevalcev

Med najpomembnejšimi označevalci, ki smo jih določili s pomočjo PLS-DA in multivariatno analizo, izstopajo metaboliti iz skupine acilkarnitinov. Med 4 najpomembnejšimi označevalci so Cer 34:1;2 (C16-ceramid), Cer 40:1;2 (C22-ceramid), AC 16:1-OH (hidroksiheksadecenoilkarnitin) in 1-metiladenozin.

Za najpomembnejše označevalce smo testirali diagnostično učinkovitost s pomočjo univariatne analize. Kljub uspešnosti posameznih označevalcev še vedno prevlada diagnostična učinkovitost seta večih označevalcev.

## 6. Razprava

### 6.1 Rak jajčnikov

V raziskavi smo pokazali, da je mogoče metode metabolomike zanesljivo uporabiti za razlikovanje bolnic z rakom jajčnikov od zdravih žensk in tistih z benignimi ginekološkimi obolenji s pomočjo HPLC/MS za analizo serumskih metabolitov. Podobni rezultati so že opisani v številnih raziskavah ob uporabi podobne metodologije s kromatografijo in masno spektrometrijo, kjer so uspeli uspešno ločiti bolnice z rakom jajčnikov od zdravih žensk in tistih z benignimi tumorji<sup>135, 140, 141, 171</sup>.

Kljub številnim raziskavam in poskusom identifikacije, raziskovalcem ni uspelo izolirati posameznega metabolita, ki bi se izkazal za dovolj občutljivega in specifičnega za diagnostično uporabo. Rezultati nakazujejo večjo uporabnost kombinacij različnih metabolitov.

Poleg same diagnostične učinkovitosti smo proučili še biološki pomen in vlogo najpomembnejših metabolitov, ki so se najbolj razlikovali med posameznimi skupinami. Vseh 5 metabolitov sodi v metabolizem sfingolipidov, torej so glede na opise v literaturi, vključeni v celično signalizacijo. Metabolizem sfingolipidov je predstavljen na shemi 12.

Spremembe v metabolizmu sfingolipidov so že opisane pri širokem spektru različnih rakov, kot je hepatocelularni karcinom<sup>173</sup>, kolorektalni karcinom<sup>174</sup>, akutna limfoblastna levkemija<sup>175</sup> in ploščatocelični karcinom glave in vratu<sup>176</sup>. Sfingolipidi so znane molekule z biološkimi učinki, ki sodelujejo v celični rasti in proliferaciji, pri čemer ceramidi opravljajo centralno vlogo v inhibiciji celične rasti, avtofagiji, mitofagiji in indukciji apoptoze<sup>177</sup>.

#### 6.1.1 C16-ceramid

V raziskavi smo potrdili pomembno povišanje nivojev C16-ceramida pri bolnicah z epitelijskim rakom jajčnikov v primerjavi s kontrolno skupino. Glede na podatke iz literature so povišane koncentracije ceramidov z dolgimi verigami posledica povečane znotrajcelične sinteze, ki jo opravljajo encimi, imenovani ceramid sintaze. Pri človeku je trenutno opisanih 6 tovrstnih ceramid sintaz, ki tvorijo ceramide z različnimi dolžinami verig<sup>178</sup>. Povišani nivoji C16-ceramida, ki ga tvori ceramid sintaza 6 oziroma CerS6, so povezani z rastjo tumorja, medtem ko v nasprotju znižane vrednosti vodijo v apoptozo. Raziskave, kjer so povzročili povečano

izražanje CerS5 sintaze, so pokazale povišane koncentracije C16-ceramida, kar je bilo povezano s pro-apoptotičnimi učinki v HeLa celičnih linijah<sup>179</sup>. Spremembe nivoja C-16 ceramida so opisali še pri raku dojke in hepatocelularnem karcinomu<sup>173</sup>, kjer so opazili povišane koncentracije<sup>180</sup>.

### 6.1.2 C22 in C24-ceramid

Poleg sprememb ceramida C16 smo ugotovili še pomembne spremembe ceramidov z dolgimi verigami (C22 in C24) pri bolnicah z rakom jajčnikov. Ceramide z dolgimi verigami v veliki večini sintetizirata sintazi CerS2 in CerS4<sup>178</sup>. Znano je, da imajo ceramidi z različnimi dolžinami verig različne funkcije v posameznih tkivih, ki pa so še zmeraj zelo slabo raziskane. Povečano izražanje sintaze CerS2 in posledično povišanih koncentracij C22 in C24 ceramidov je imelo anti-apoptotične učinke v HeLa celičnih linijah, izpostavljenih cisplatinu<sup>179</sup>. Ob primerjavi z drugimi rakavimi obolenji vidimo, da so bili nivoji C24 ceramida opisani še pri raku dojke in ploščatoceličnem karcinomu glave in vratu, medtem ko so bile opisane koncentracije istega ceramida pri hepatocelularnem karcinomu v primerjavi s kontrolno skupino znižane<sup>175, 179, 180</sup>. Trenutno v literaturi še ni podatkov o ceramidih z dolgimi verigami pri raku jajčnikov, kar pomeni, da je naša raziskava prva, ki opisuje spremembe serumske koncentracije C22 in C24-ceramida pri raku jajčnikov.

### 6.1.3 Sfingomielin

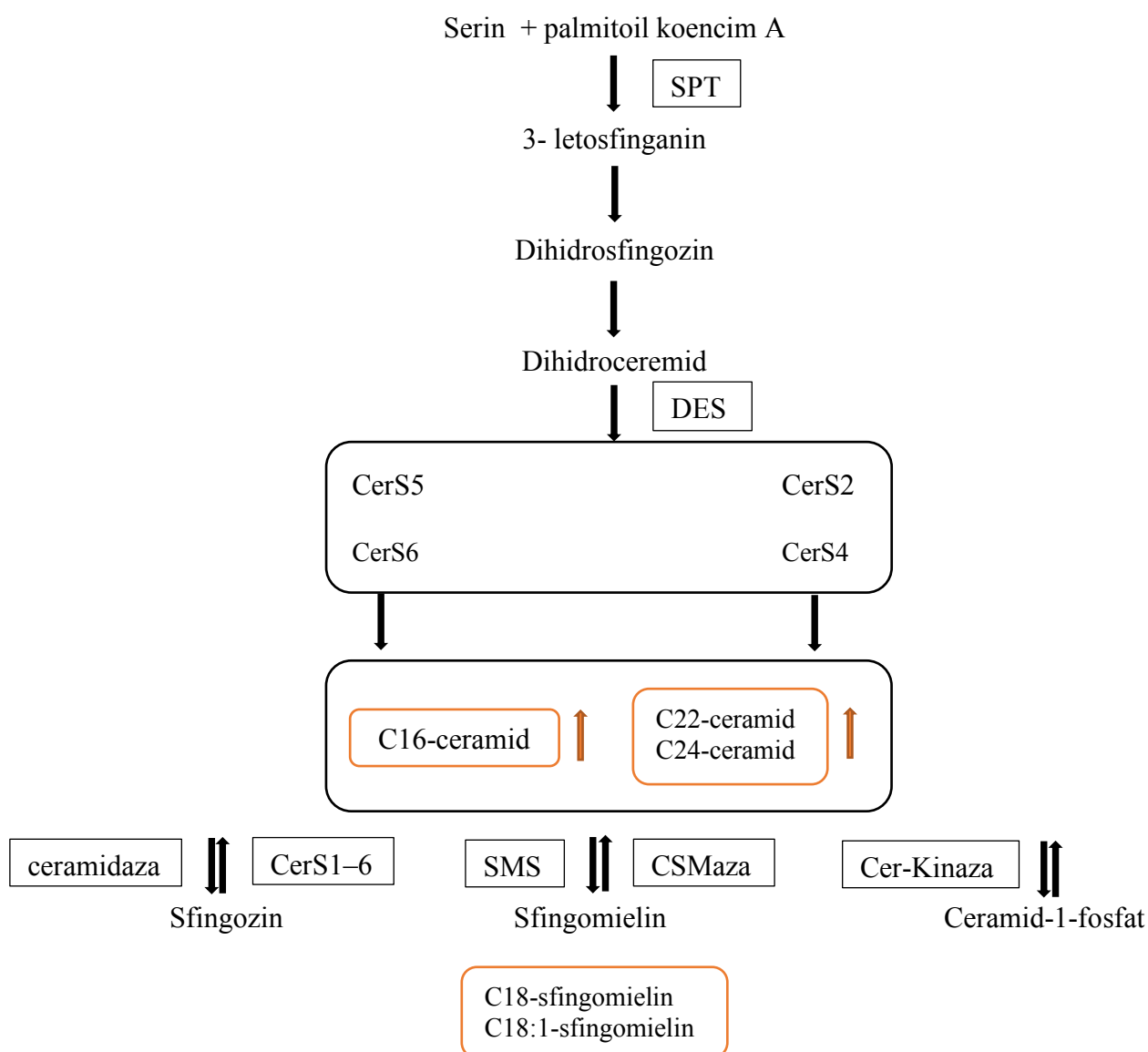
Sfingomielini (SM) so eni najpomembnejših sfingolipidov v celici. Predstavljajo ključno komponento plazemske membrane, poleg tega so vključeni še v številnih celičnih funkcijah. Njihov vir je *de-novo* sinteza s pomočjo SM sintaz (SMSs) iz ceramidov kot prekurzorskih molekul. SM se lahko hidrolizirajo s pomočjo encima sfingomielinaze (SMaza), ki jih razgradi v ceramide. Homeostaza sfingomielinov in ceramidov je tako regulirana z delovanjem encimov SMSs in SMaza<sup>182</sup>.

Naša raziskava prikazuje pomembno povišane koncentracije sfingomielina C18 in C18:1 pri pacientkah z rakom jajčnikov v primerjavi s kontrolno skupino. Zelo malo je trenutno znanega

in opisanega o sfingomielinih pri raku jajčnikov. Obstajajo sicer podatki o celokupno povišnih nivojih sfingomielinov ob sočasno znižanih nivojih ceramidov, heksozilceramidov in laktozilceramidov v celičnih linijah raka jajčnikov<sup>183</sup>.

Poleg celičnih linij raka jajčnikov obstajajo podatki tudi o bolnicah z endometriozo. Pri le-teh so odkrili znižane koncentracije SM C16:1 in SM C18:1 v peritonealni tekočini<sup>184</sup>. V nekaterih primerih kolorektalnega karcinoma je Separović s sodelavci opisal sfingomieline z različnimi verigami maščobnih kislin, ki so bili bodisi povišani (C14, C16, C24:1 in C26:1), bodisi znižani (C18 - C24)<sup>185</sup>.

Metabolizem sfingolipidov je shematsko predstavljen na shemi 12.



Shema 12: Metabolna pot sfingolipidov

*De-novo* sinteza ceramidov se prične s serinom in palmitoil koencimom A, ki se pretvori v dihidrosfingoziin preko 3-ketosfinganina s pomočjo palmitoil koencim A transferaze (SPT). Nato ceramid sintaze (CerS1–6) prenesejo maščobni acil koencim A in s tem tvorijo dihidroceramid, ki se desaturira v ceramid preko encima dihidroceramid desaturaze (DES). Različni encimi ceramid sintaz tvorijo različne ceramide z različnimi dolžinami verig maščobnih kislin. Ceramidi se pretvorijo v sfingoziin in sfingoziin-1-fosfat (S1P) s pomočjo encimov ceramidaz in sfingoziin kinaz 1 in 2 (SK1/2) ali se v obratni smeri tvorijo iz S1P s pomočjo fosfataz in CerS1–6.



#### 6.1.4 Potencial metabolomike pri raku jajčnikov

Trenutno uporabljani tumorski označevalci, kot sta CA 125 in HE4, ne nudijo zadostne diagnostične učinkovitosti, saj imajo preveč lažno pozitivnih rezultatov v primeru benignih tumorjev in preveč lažno negativnih rezultatov v primeru rakov v zgodnjih stadijih. Pri CA 125 in HE4 je opisana površina pod krivuljo (AUC) 0,89 za posamezen označevalec<sup>24</sup>, kar pomeni primerljivo učinkovitost, kot jo imajo posamezni ceramidi, identificirani v naši raziskavi (0,89 C16-ceramid in C22-ceramid), medtem ko je imela kombinacija 5 najboljših označevalcev, med katerimi so ceramidi in sfingomielini, AUC kar 0,92.

S tovrstnim izboljšanjem občutljivosti in specifičnosti diagnostične metode bi lahko bistveno spremenili obravnavo bolnic s sumljivimi tumorji jajčnikov. Znano je, da je veliko žensk operiranih zaradi sumljivih cist oziroma tvorbo jajčnikov, pri čemer se le za manjši delež izkaže, da gre za rakavo obolenje. Po podatkih iz leta 1995 naj bi bil rak jajčnikov prisoten le pri eni izmed 4. žensk, ki so bile operirane<sup>186</sup>. Največji problem klinika je v pomanjkanju zanesljivih metod, s katerimi bi bilo mogoče izključiti prisotnost rakavega obolenja, zaradi česar se pogosto zatekamo k operaciji, s katero je trenutno edino mogoče varno pridobiti biološki material za histopatološko preiskavo. Z uveljavljanjem novih metod, kot je metabolomika, bo v prihodnosti zelo verjetno mogoče z večjo zanesljivostjo opredeliti sumljive najdbe in tako ločiti tiste bolnice, ki potrebujejo nadaljnje zdravljenje.

## 6.2 Rak dojk

Pri raku dojk smo, podobno kot že pri raku jajčnikov pokazali dobre možnosti ločevanja med bolnicami z rakom dojk od zdrave kontrolne skupine z uporabo analize HPLC-TQ/MS serumskih metabolitov. Obstaja več raziskav na temo metabolomike pri raku dojk, kjer so opisovali številne metabolite, ki bi lahko bili uporabljeni za ločevanje bolnic z rakom dojk od zdravih žensk, prav tako pa nadalje za ločevanje med različnimi podtipi raka dojk in hormonskim statusom raka. Tang s sodelavci je uporabil podobno metodologijo, kot je opisana v naši raziskavi, vendar je namesto seruma uporabil tkivne vzorce raka dojk in zdravih dojk. Opisal je metabolite, povezane z glikolizo in glikogenolizo, ki so povezani z energetske funkcije celice in ki sovpadajo z Warburgovim pojavom<sup>187</sup>, kar sovpada z rezultati naše raziskave, kjer so se za pomembne izkazali acilkarnitini, ki so prav tako vključeni v regulacijo energetskega metabolizma celice.

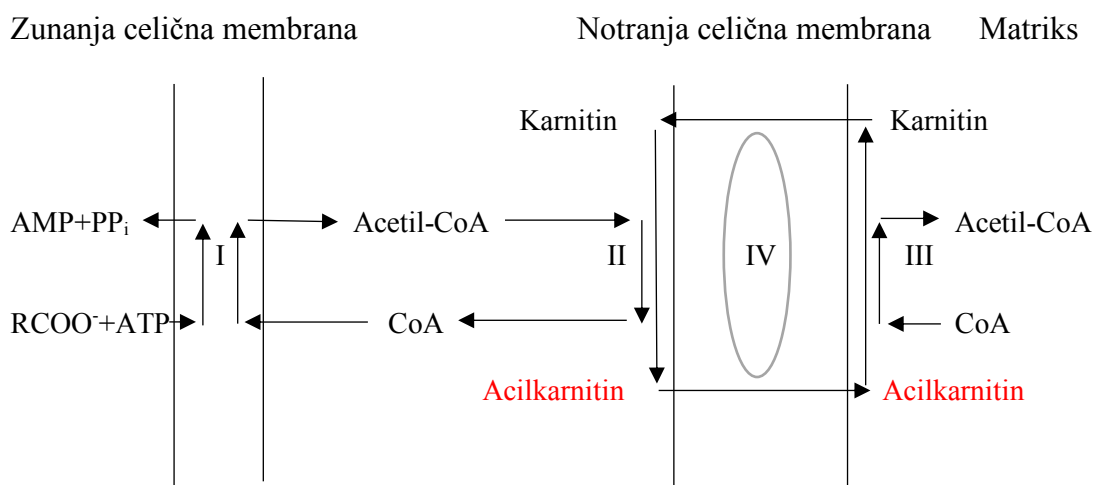
Opravljenе so bile že številne raziskave, kjer so s pomočjo orodij metabolomike poskušali odkriti označevalce za diagnostiko raka dojk, tako v tkivnih vzorcih, kot v urinu, serumu in plazmi. Nekaj tovrstnih raziskav je opisanih v tabeli 12.

Naše rezultate lahko z rezultati drugih raziskav primerjamo zgolj po učinkovitosti ločevanja raka dojk od kontrolne skupine. Z uporabo 4 najpomembnejših tumorskih označevalcev smo prikazali 83 % občutljivost ob 81 % specifičnost, kar je sicer neprimerljivo višje od dosedanjih tumorskih označevalcev, kot je CA 15-3, ki je glede na izsledke v literaturi povišan v manj kot 50 % primerov novoodkritega raka dojk<sup>71</sup>. Ob primerjavi učinkovitosti ločevanja obeh skupin z drugimi raziskavami na področju metabolomike naletimo na ogromno heterogenost, tako metodologije, kot tudi rezultatov. Vidimo lahko rezultate, ki na podlagi tkivnih vzorcev opisujejo občutljivost 94,8 % in specifičnost 93,9 % s pomočjo razmerja citidin-5-monofosfata in pentadekanojske kisline<sup>149</sup>. Naslednja raziskava, ki je prav tako iskala tumorske označevalce v tkivnih vzorcih, je za razliko od prejšnje opisala le 69 % občutljivost ob 94 % specifičnosti z uporabo zelo podobne analizne metodologije ob sicer popolnoma drugem setu izbranih označevalcev<sup>155</sup>. Raziskava, ki je kot vzorec uporabila krvno plazmo, navaja celo možnost razlikovanja s 100 % občutljivostjo ob 100 % specifičnosti<sup>188</sup>. Omenjena raziskava je vključevala 91 bolnic z rakom dojk in 20 zdravih žensk v kontrolni skupini. Podobno kot mi so

uporabili tekočinsko kromatografijo skupaj z masno spektrometrijo, analize pa so prav tako temeljile na naključnih gozdovih.

### 6.2.1 L-karnitin

V naši raziskavi so se kot pomembni označevalci za ločevanje med bolnicami z rakom dojke in zdravo kontrolno skupino izkazali acilkarnitini, ki so v metabolizmu karnitina ključne molekule za uporabo in shranjevanje energije celice. L-karnitine se v celicah sesalcev pojavlja v obliki prostega karnitina in acilkarnitinov<sup>189</sup>. L-karnitine omogoča transport maščobnih kislin v mitohondrije za nadaljnjo  $\beta$ -oksidacijo, kar vodi v esterifikacijo L-karnitina in tako v tvorbo acilkarnitinov različnih dolžin verig. Vloga L-karnitina je jasno določena, medtem ko so acilkarnitine sprva smatrali za stranske produkte, danes pa vse bolj postaja jasno, da ima karnitinski sistem še dodatne vloge, kot je odstranjevanje odvečnih acilnih skupin iz telesa ter modulacijo homeostaze znotrajceličnega koencima A (CoA)<sup>190</sup>. Vloga acilkarnitinov in karnitina je predstavljena na shemi 13.



Shema 13: Od karnitina odvisen transport maščobnih kislin. Povzeto po Bremer (1983)<sup>191</sup>

I: Acil-koencim A sintaza, II: zunanja karnitin aciltransferaza, III: notranja (latentna) karnitin aciltransferaza, IV: karnitin/acilkarnitin translokaza. AMP: adenzin monofosfat, ATP: adenzin trifosfat, CoA: koencim A, PP<sub>i</sub>: anorganski pirofosfat, RCOO<sup>-</sup>: maščobne kisline z dolgimi verigami<sup>191</sup>.

### 6.2.2 Acilkarnitin

V naši raziskavi so se med najpomembnejše označevalce uvrstili štiri metaboliti iz skupine acilkarnitinov. Gre za acilkarnitine z dolgimi verigami in sicer tetradecenoilkarnitin (AC 14:2), tetradekanoilkarnitin (AC 14:0) in dodekanoilkarnitin (AC 12:0). Pri vseh treh metabolitih smo opazili znižane serumske koncentracije pri bolnicah z rakom dojk. V literaturi je zelo malo opisanega o vlogi acilkarnitinov pri raku dojk. V raziskavi je Chughtai s sodelavci (2013) opisala spremembe v koncentracijah dveh acilkarnitinov (palmitoilkarnitin in stearoilkarnitin) na celični liniji raka dojk. V nasprotju z našo raziskavo je Chughtai opazala povišane koncentracije acilkarnitinov, še posebej ob izpostavljanju rakavih celic hipoksiji. Akumulacijo acilkarnitinov so skušali pojasniti z blokado oksidativnih procesov in s tem inhibicijo  $\beta$ -oksidacije med trajanjem hipoksije<sup>192</sup>. Podobne rezultate je opisal tudi Cui s sodelavci (2016), ki je poleg številnih metabolitov iz skupine lipidov poleg ceramidov in sfingomielina opisal še glutakonilkarnitin, ki je bil povišan v serumu bolnic z rakom dojk<sup>193</sup>.

Drugih raziskav, ki bi opisovale acilkarnitine AC 14:0, AC 12:0 in AC 14:2 v diagnostične namene pri raku dojk, ni bilo mogoče zaslediti, kar postavlja našo raziskavo kot prvo, ki je opisala potencial uporabe acilkarnitinov v diagnostične namene pri odkrivanju raka dojk.

Več o acilkarnitinih je bilo opisanega na področju raka ledvic, kjer so analizirali vzorce urina bolnikov z rakom ledvic in med preiskovanimi metaboliti vključili širok spekter acilkarnitinov. Pokazali so, da se med skupino z rakom ledvic in kontrolno skupino pomembno razlikujejo koncentracije dveh acilkarnitinov in sicer isobutirilkarnitina in suberoilkarnitina, medtem ko AC 14:0, AC 12:0 in AC 14:2 niso bili opisani<sup>194</sup>.

Acilkarnitini so sicer bolj poznani na drugih področjih medicine. Dobro je poznana njihova funkcija v tkivih z visoko stopnjo  $\beta$ -oksidacije, kot so na primer mišice in srce. Po drugi strani pa se je nadomeščanje karnitina in acilkarnitinov izkazalo za učinkovito pri zdravljenju različnih nevroloških obolenj, kljub dejstvu, da maščoba ni glavni vir energije za živčne celice. Glede na izsledke je tako predpostavljeno, da acilkarnitini sodelujejo v tvorbi lipidov, spreminjanju in stabilizaciji celične membrane, moduliranju genov in proteinov ter izboljševanju funkcije mitohondrijev<sup>189</sup>.

### 6.2.3 PE 18:2/18:2 (9,12-linoleinska kislina)

PE 18:2/18:2, 9,12-linoleinska kislina ali drugače tudi 9,12-oktadekadienojska kislina je najpogostejša večkratno nenasičena maščobna kislina v človekovi prehrani. V telesu lahko služi kot vir energije, podobno kot druge maščobne kisline, lahko se uporabi za tvorbo fosfolipidov, triacilglicerolov in holesterolnih estrov. Lahko deluje kot funkcionalna komponenta, ki vzdržuje prepustnost membrane. Kadar se sprostijo iz membranskih fosfolipidov, se lahko s pomočjo encimske oksidacije vključi v številne poti celične signalizacije<sup>195</sup>.

Incidenca raka dojke se, kot že opisano, bistveno razlikuje po različnih geografskih področjih<sup>16</sup>. Veliko raziskav je bilo opravljenih o vplivu prehrane na pojavnost raka dojke, vendar vloga prehrane v etiologiji raka ostaja nejasna. Vloga linoleinske kisline v prehrani pri raku ni popolnoma raziskana, vendar obstajajo raziskave na živalskih modelih, kjer so pokazali velik vpliv linoleinske kisline na rast in napredovanje tumorjev, ni pa bilo vidnega vpliva na samo pojavnost raka<sup>196</sup>. Predpostavili so številne signalne poti, ki jih aktivira linoleinska kislina, med drugim regulacijo ciklooksigenazne aktivnosti in prostaglandina E<sub>2</sub>. Zhou s sodelavci (2016) je v meta-analizi zajel 12 raziskav, ki so vključevale 10.410 bolnic z rakom dojke, pri čemer je pokazal, da sta tako visok vnos linoleinske kisline, kot tudi visoke serumske koncentracije povezane z nižanim tveganjem za pojav raka dojke, vendar povezave niso bile statistično pomembne<sup>197</sup>.

Ob primerjavi naših rezultatov z drugimi raziskavami naletimo na zanimive razlike. Jové s sodelavci (2017) je v svoji raziskavi z zelo podobno metodologijo prišla do nasprotnih rezultatov, kar zadeva linoleinsko kislino. Opisala je povečane plazemske koncentracije linoleinske kisline pri bolnicah z rakom dojke in za samo linoleinsko kislino določila AUC 0,935 za sposobnost ločevanja med rakom dojke in zdravimi ženskami<sup>188</sup>. V naši raziskavi smo merili serumske koncentracije, kjer smo opazili znižane vrednosti linoleinske kisline z AUC 0,709.

#### 6.2.4 Potencial metabolomike pri raku dojke

Pri raku dojke sama diagnostika odkritih lezij ni toliko problematična, saj je mogoče zaradi anatomske strukture dojke relativno hitro in enostavno priti do biološkega materiala za citološko oziroma histopatološko preiskavo s pomočjo tankoigelne ali debeloigelne punkcije. Večjo dilemo v diagnostiki predstavlja stopnja razširjenosti bolezni, saj je le-ta ključna za izbiro zdravljenja, zanjo pa je potreben širok spekter diagnostičnih preiskav. V naši raziskavi sicer nismo proučevali razlik v metabolitih med zgodnjim in razširjenim rakom dojke, vendar

obstajajo številne raziskave, ki opisujejo tovrstne ugotovitve. Trenutno uporabljan tumorski označevalec CA 15-3 se sicer uporablja za odkrivanje metastatske bolezni, vendar bi ga lahko metode metabolomike ob dobri ponovljivosti in nižji ceni v bližnji prihodnosti brez težav nadomestile.

Kot je bil namen naše raziskave, smo poskušali odkriti nove označevalce, ki bi jih lahko uporabljali za odkrivanje zgodnje bolezni oziroma celo v presejalne namene. Naše rezultate s 83 % občutljivostjo ob 81 % specifičnosti lahko postavimo ob bok mamografiji, kjer je Jacobsen leta 2015 na podlagi 2.872.791 ženskah določil občutljivost mamografije ob prvem obisku 91,8 % v ZDA ter 90,5 % na Danskem, ob specifičnosti 83,2 % v ZDA in 96,6 % na Danskem<sup>198</sup>. Naši rezultati se že približujejo tistim od mamografije, ki je že desetletja uveljavljena metoda. Ob upoštevanju rezultatov še drugih raziskav metabolomike vidimo, da bi metoda lahko dosegla in preseгла diagnostično učinkovitost mamografije, kar bi lahko pomenilo popolnoma novo poglavje v presejanju raka dojke.

### 6.3 Rak endometrija

S pomočjo orodij metabolomike smo odkrili 4 pomembne tumorske označevalce v serumu, s katerimi je mogoče razlikovati med bolnicami z rakom endometrija in zdravimi ženskami z občutljivostjo 94 % in specifičnostjo 75 %. Opravljenih je bilo več raziskav, ki so proučevale metabolom pri raku endometrija, tako v namene odkrivanja raka endometrija, kot tudi v namene razumevanja metabolnih sprememb in patogeneze bolezni.

Audet-Delage s sodelavci (2018) je poskušal uporabiti orodja metabolomike za odkrivanje karcinoma endometrija ter ponovitve bolezni. Uspelo mu je identificirati 137 metabolitov, ki so se razlikovali med skupino rakavih bolnic in kontrolno skupino<sup>165</sup>. Med temi je izbral dva označevalca, spermin in izovalerat, s katerima je dosegel AUC 0,914, kar je primerljivo našim rezultatom, kjer smo dosegli AUC 0,925 z izborom 4 najboljših označevalcev. Metaboliti, ki jih je določil Audet-Delage s sod. (2018) sicer sodijo v skupino lipidov, vendar prihajajo iz popolnoma različnih skupin od tistih, ki smo jih določili v naši raziskavi.

Podobne rezultate je opisal tudi Bahado-Singh s sodelavci (2018), kjer so med najpomembnejše označevalce uvrstili ceramide, fostatidilholin in 3-hidroksibutirično kislino. Za set najpomembnejših označevalcev so ugotavljali občutljivost 82,6 % in specifičnost 70,8 % z AUC 0,826<sup>168</sup>.

Trousil s sodelavci (2014) je proučeval metabolite v tkivu raka endometrija ter primerjal metabolite v vzorcih zdravega endometrija. Testiral je 17 vzorcev zdravega endometrija ter 28 vzorcev histološko potrjenega raka endometrija. Trousil je poleg masne spektrometrije uporabil še <sup>1</sup>H nuklearno magnetno resonanco. Opisal je več pomembnih metabolitov, ki so se razlikovali med skupino z rakom endometrija in kontrolno skupino, med drugim so metaboliti zajemali valin, levcin, alanin, prolin, glutation ter druge molekule, povezane s celičnim metabolizmom<sup>166</sup>.

Kot pri drugih rakih, so tudi pri raku endometrija poskušali odkriti diagnostično pomembne metabolne označevalce v urinu. Shao s sodelavci (2016) je analiziral jutranji urin 25 bolnic z rakom endometrija in 25 zdravih žensk s pomočjo tekočinske kromatografije in masne spektrometrije. Odkril je 5 pomembnih tumorskih označevalcev, od katerih so bili trije: N-acetilserin, urokanična kislina in izobutirilglicerin znižani, porfobilinogen in acetilcistein pa zvišana<sup>164</sup>. Natančnost modela je znašala 89,3 %, medtem ko je natančnost posameznega

označevalca v naši raziskavi znašala 81 %. Zaradi različnih analiznih modelov diagnostične učinkovitosti obeh raziskav ni mogoče natančno primerjati.

### 6.3.1 Cer 34:1;2 (C16-ceramid) in Cer 40:1;2 (C22-ceramid)

C16-ceramid in C22-ceramid tvorita ceramid sintazi CerS4 in CerS5, kot je že opisano v poglavju raka jajčnikov. Mojakgomo s sodelavci (2015) je raziskoval povezavo med CerS4, CerS5 in apoptozo pri celičnih linijah raka endometrija in debelega črevesa<sup>199</sup>. Apoptozo so pri raku endometrija inducirali z anastrozolom, pri čemer so spremljali stopnjo apoptoze s fluorescenčnimi metodami, sočasno pa so opazovali stopnjo izražanja CerS4 in CerS5 s kvantitativnim realnočasovnim PCR. Ugotovili so, da so rakave celice bolj dovzetne na indukcijo apoptoze v primerjavi z zdravimi. Ob tem je bilo izražanje CerS4 in CerS5 pri rakavih celicah povišano, nato se je ob aplikaciji anastrozola ter indukciji apoptoze znižalo v primerjavi z zdravimi celicami. Mojakgomo s sodelavci (2015) sicer niso določali koncentracij ceramidov v celicah, vendar lahko glede na izsledke njihove raziskave sklepamo na spremenjeno razmerje ceramidov s srednjimi in dolgimi verigami, ki jih sintetizirata sintazi CerS4 in CerS5. Te ugotovitve sovpadajo z rezultati naše raziskave, kjer smo opazili povišane serumske koncentracije ceramida C16 in C22 pri bolnicah z rakom endometrija.

Metabolizem sfingolipidov pri raku endometrija je opisal tudi Knapp s sodelavci (2010), ki je opazil povišane vrednosti sfinganina, sfingozina, dihidroceramida, ceramida in S1P, pri čemer je zaključil, da metabolizem sfingolipidov pomembno sodeluje v onkogenezi raka endometrija<sup>200</sup>. Žal v raziskavi niso razlikovali ceramidov z različnimi dolžinami verig, zato rezultatov ne moremo primerjati z našimi podatki.

### 6.3.2 Hidroksiheksadecenoilkarnitin (AC 16:1-OH)

Raziskav, ki bi opisovale prisotnost in vpliv acilkarnitinov pri raku endometrija, ni veliko. Knific s sodelavci (2018) je sicer v svojem delu na 61 bolnicah z rakom endometrija in 65 zdravih ženskah kot pomembne diagnostične in prognostične označevalce izpostavila AC 16:0 oziroma heksadecanoilkarnitin, ki se kaže kot učinkovit označevalec v razmerju s fosfatidilholinom Pcae C40:1<sup>201</sup>. V tej raziskavi je bilo pomembno še razmerje med prolinom



in tirozinom in med fosfatidilholinom Pcaa C42:0 in Pcae C44:5, kar je omogočalo odkrivanje raka endometrija z občutljivostjo 85,3 % ob specifičnosti 69,2 % in AUC 0,837. Raziskava Knifriceve s sodelavci (2018) se po dolžini identificiranega acilkarnitina še najbolj približa našim podatkom, vendar gre za podobno in ne identično molekulo.

Acilkarnitine pri raku endometrija je opisala tudi Gaudet s sodelavci (2012), ki so v raziskavo vključili 250 bolnic z rakom endometrija in jih primerjali z 250 zdravimi ženskami. Kot najpomembnejše označevalce za razlikovanje med skupinama so opredelili C5-acilkarnitin, oktenoilkarnitin, dekatrienoilkarnitin in linoleinsko kislino, ki so bili v primerih raka pomembno znižani<sup>169</sup>. Za razliko od naše raziskave je Gaudet s sodelavci (2012) opisovala znižane serumske koncentracije acilkarnitinov, medtem ko gre v našem primeru za zvišano koncentracijo. Ponovno gre pri Gaudetovi s sodelavci (2012) za druge metabolite iz skupine acilkarnitinov in ne natanko za hidroksiheksadecenoilkarnitin.

### 6.3.3 1-metiladenozin

Modificirani nukleozidi, ki se smatrajo za indikatorje celokupnega metabolizma ribonukleinske kisline (RNA) v telesu, že dolgo veljajo za tumorske označevalce v urinu. Ishiwata s sodelavci je že leta 1995 opisal povišane vrednosti 1-metiladenozina v serumu mišk s tumorji<sup>202</sup>. Kasneje je tudi Seidel s sodelavci opisal širok potencial modificiranih nukleozidov v diagnostiki raka, kjer je opisal povišane vrednosti 1-metiladenozina pri raku dojk, pri čemer so nadalje povišane vrednosti sovpadale z napredovalo boleznijo<sup>203</sup>, kar bi lahko sovpadalo tudi s povišanimi koncentracijami 1-metiladenozina v naših rezultatih. Drugih raziskav na temo 1-metiladenozina pri raku endometrija v nam dosegljivi literaturi ni mogoče najti.

### 6.3.4 Potencial metabolomike pri raku endometrija

CA 125 se kot sicer najboljši tumorski označevalec pri raku endometrija skupaj z ostalimi ob 49,1 % občutljivosti in 83,1 % specifičnosti slabo izkaže za zgodnje odkrivanje bolezni. Temelj diagnostike tako še vedno ostaja transvaginalni ultrazvok ob dokončni histološki opredelitvi endometrija. Glede na rezultate naše in podobnih raziskav, kjer vidimo bistveno višjo občutljivost in specifičnost metabolomike od trenutno uporabljenih tumorskih označevalcev in

tudi transvaginalnega ultrazvoka, je mogoče sklepati, da bo v prihodnosti metabolomika zavzela pomembno vlogo pred samim odvzemom materiala za histološko preiskavo.

Pri raku endometrija so znane populacije z visokim tveganjem za razvoj bolezni, pri katerih je smiselno izvajati presejanje. Zanesljivost transvaginalnega ultrazvoka pri asimptomatskih ženskah je ob 77,1 % občutljivosti ter 85,8 % specifičnosti vprašljiva. Pri ženskah z visokim tveganjem za razvoj raka endometrija, kot je na primer s sindromom Lynch, se zaradi slabe zanesljivosti drugih, manj invazivnih metod priporočajo redne letne biopsije endometrija za histološko opredelitev, kar pomeni za žensko večkratne invazivne posege. S pomočjo seta označevalcev, ki nudi dovolj zanesljive diagnostične možnosti, je pričakovati uporabo tovrstnih metod za izbor žensk z visokim tveganjem za pojav bolezni, pri katerih je smiselno opraviti biopsijo.

#### 6.4 Prihodnost metabolomike

Metabolomika na človeških vzorcih predstavlja veliko prednost pred raziskavami na celicah *in vitro* ali pred raziskavami na modelnih organizmih. Metabolni profili veliko bolje povzamejo dejanski biološki sistem. Tipični *ex vivo* vzorci so tkivni ekstrakti ali telesne tekočine. Telesne tekočine, kot je krvna plazma, urin ali slina, predstavljajo lahko dostopne vzorce, kjer je odvzem vzorcev manj invaziven in postopek ekstrakcije bistveno preprostejši kot v primeru tkiv, ki lahko nudijo sicer boljši vpogled v sam metabolizem tkiva. Glavna omejitev metabolomike telesnih tekočin je predvsem nabor prisotnih metabolitov. V urinu bomo tako našli pretežno odpadne produkte, ki jih je pogosto težko povezati s funkcijo biološkega sistema. Podobno v telesnih tekočinah opažamo večjo variabilnost metabolnih vzorcev, kot je to v primeru *ex vivo* vzorcev<sup>204</sup>.

Poleg izbire pravega vzorca za proučevanje metabolitov, eden izmed večjih izzivov metabolomike v raziskovanju rakavih obolenj ostaja metodologija analize in klasifikacije potencialnih bioloških označevalcev. Pogosto vidimo različne spektre predlaganih bioloških označevalcev za isto bolezen, pri čemer lahko gre le za manjšo razliko v metodologiji raziskave. Ob porastu števila podobnih raziskav ter vedno večji dostopnosti novih tehnologij lahko pričakujemo, da se bodo postopoma uveljavile posamezne metodologije in se tako poenotile, kar je prvi pogoj za klinično uporabnost metabolomike.

Kljub izzivom metabolomike se na področju ves čas odvijajo pomembne izboljšave. Trenutno se največ napredka kaže pri ustvarjanju podatkovnih zbirk metodologij in rezultatov analiz na širokem spektru bioloških vzorcev. Cilj je združiti različne vzorce, obdelane z različnimi analitičnimi pristopi in pridobljene podatke ponuditi celotni strokovni javnosti za nadaljnjo obdelavo. Tovrstni projekti so se izkazali na področju genomike za zelo učinkovite s pomočjo GenBank, ki nudi nukleotidna zaporedja več kot 380.000 organizmov. Laboratoriji po svetu vsakodnevno izboljšujejo podatkovno bazo z novimi podatki<sup>205</sup>. Obsežna, javno dostopna baza je prav tako potrebna na področju metabolomike, ki bo omogočila interpretacijo ter standardizacijo postopkov in podatkov.

Tehnološki napredek analiznih naprav ter razvoj informacijske tehnologije je že omogočil odkrivanje prvih bioloških označevalcev. Z združevanjem različne metodologije se spektri novih bioloških označevalcev le še širijo. Ti označevalci so koristni tako za identifikacijo bolezenskega procesa, kot za samo razumevanje bioloških procesov ter tako nudijo nov nivo spoznavanja kancerogeneze. V prihodnosti je prav tako mogoče, da bo lahko sama metabolomika odkrivala tudi potencialne tarče za ciljano zdravljenje rakavih obolenj.

## 6.5 Omejitve raziskave

Raziskava ima poleg zanimivih rezultatov številne omejitve. Najpomembnejša omejitev je relativno majhno število vzorcev, saj je raziskava potekala v enem samem centru, kjer je frekvenca nekaterih bolezni, kot na primer zgodnjega raka jajčnikov, relativno majhna. Število vzorcev raka dojke in endometrija je sicer večje, primerljivo z večjo frekvenco tovrstnih primerov, vendar je tudi to število majhno v razmerju s številom preiskovanih parametrov za vsak pozamezni vzorec (N=232). Primerljivo s številom primerov raka je bila ustvarjena tudi kontrolna skupina in skupina bolnic z benignimi ginekološkimi obolenji. Kljub sicer večjemu številu zbranih vzorcev so bili vzorci iz opisanih skupin izbrani uravnoteženo glede na skupino bolnic z rakom, temu primerno je bilo tudi končno število vzorcev. Za večjo moč raziskave bi bilo potrebno vključiti večje število vzorcev ter zbiranje razširiti na različne centre, da bi s tem zajeli različne populacije in s tem izključili potencialne vplive okolja, kot je na primer način življenja in prehrane.

Naslednja pomanjkljivost raziskave je uporaba istih vzorcev za učenje algoritmov in nato testiranje uspešnosti, kar nekoliko zmanjša zanesljivost rezultatov. Primerneje bi bilo za

testiranje uspešnosti modelov uporabiti sveže primere, ki niso bili uporabljeni za ustvarjanje modela, saj je na ta način mogoče doseči bolj zanesljive rezultate, ki dejansko prikazujejo, kako se model obnese pri novih, še ne videnih primerih. Seveda bi bilo za tovrstno ločitev obeh skupin potrebno bistveno večje število vzorcev.

V raziskavi smo analizirali 232 znanih metabolitov, kar je na nek način prednost, saj tovrstna analiza ne dopušča možnosti težav z identificiranjem molekul, kot je pogosto v podobnih analizah, po drugi strani pa nas takšen pristop omeji v možnosti odkrivanja novih, še ne opisanih metabolitov, ki bi lahko bili potencialno zelo zanimivi.

## 7. Zaključki

1. V raziskavi smo odkrili 5 označevalcev iz skupine ceramidov in sfingomielinov (C16-ceramid, C22-ceramid, C24-ceramid, C18-sfingomielin, C18:1-sfingomielin), s pomočjo katerih smo uspeli ločiti skupino bolnic z rakom jajčnikov od zdravih žensk in tistih z benignimi ginekološkimi obolenji z občutljivostjo 83 %, specifičnostjo 80 % in AUC 0,920.
2. Pri raku dojk so se za najpomembnejše izkazali 4 označevalci in sicer tetradecenoilkarnitin, tetradekanoilkarnitin, dodekanoilkarnitin in 9,12-linoleinska kislina, ki so dosegli 81 % občutljivost ob 81 % specifičnosti in AUC 0,839.
3. Pri raku endometrija smo identificirali 4 najpomembnejše označevalce, to so: C16-ceramid, C22-ceramid, hidroksiheksadecenoilkarnitin in 1-metiladenozin, ki so se izkazali z 93 % občutljivostjo ob 75 % specifičnosti in AUC 0,925.

### **Spremljajoči zaključki:**

Diagnostična učinkovitost posameznih metabolitov za posamezno maligno obolenje:

#### **Rak jajčnikov:**

- C16-ceramid, občutljivost 80 %, specifičnost 86 %, AUC 0,89
- C22-ceramid, občutljivost 80 %, specifičnost 76 %, AUC 0,89
- C24-ceramid, občutljivost 80 %, specifičnost 86 %, AUC 0,87
- C18-sfingomielin, občutljivost 67 %, specifičnost 71 %, AUC 0,84
- C18:1-sfingomielin, občutljivost 60 %, specifičnost 85 %, AUC 0,81

#### **Rak dojk:**

- Tetradecenoilkarnitin, občutljivost 74 %, specifičnost 71 %, AUC 0,73
- Tetradekanoilkarnitin, občutljivost 73 %, specifičnost 81 %, AUC 0,73
- Dodekanoilkarnitin, občutljivost 72 %, specifičnost 62 %, AUC 0,71
- 9,12-linoleinska kislina, občutljivost 69 %, specifičnost 67 %, AUC 0,71

#### **Rak endometrija:**

- C16-ceramid, občutljivost 73 %, specifičnost 81 %, AUC 0,83
- C22-ceramid, občutljivost 67 %, specifičnost 81 %, AUC 0,77
- Hidroksiheksadecenoilkarnitin, občutljivost 60 %, specifičnost 96 %, AUC 0,76

- 1-metiladenozin, občutljivost 67 %, specifičnost 81 %, AUC 0,75

**Diagnostična učinkovitost najboljših kombinacij metabolitov za posamezno maligno obolenje:**

Rak jajčnikov: set 5 označevalcev z 83 % občutljivostjo, 80 % specifičnostjo in AUC 0,920

Rak dojk: set 4 označevalcev z 81 % občutljivostjo, 81 % specifičnostjo in AUC 0,839.

Rak endometrija: set 4 označevalcev z 93 % občutljivostjo, 75 % specifičnostjo in AUC 0,925.

**Izvor najpomembnejših metabolitov za posamezno obolenje**

**Rak jajčnikov:** ceramidi in sfingomielini sodijo v skupino sfingolipidov, ki se sintetizirajo preko serina in palmitoil koencima A preko serije encimov.

**Rak dojk:** acilkarnitini so produkti, ki nastanejo iz karnitina in acetilkoencima A in igrajo pomembno vlogo v Krebsovem ciklu. 9,12-linoleinska kislina je esencialna aminokislina in se ne sintetizira v telesu.

**Rak endometrija:** ceramidi sodijo v skupino sfingolipidov, ter se sintetizirajo preko serina in palmitoil koencima A preko serije encimov. Acilkarnitini so produkti, ki nastanejo iz karnitina in acetilkoencima A in igrajo pomembno vlogo v Krebsovem ciklu. 1-metiladenozin je metilirani nukleotid, ki nastane z dodatkom  $-CH_3$  skupine. Metilacija igra pomembno vlogo v izražanju genov.

## 8. Literatura

1. Bianconi E, Piovesan A, Facchin F, Beraudi A, Casadei R, Frabetti F, et al. An estimation of the number of cells in the human body. *Ann. Hum. Biol.* 2013;40(6):463–71.
2. Bradbury R, Buschauer A, Gether U, Lowe J, Stilz H. *Cancer. Biochem. Educ.* Berlin: Springer-Verlag; 2007.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57–70.
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.
5. Zadnik V, Primic Zakelj M, Lokar K, Jarm K, Ivanus U, Zagar T. Cancer burden in Slovenia with the time trends analysis. *Radiol. Oncol.* 2017;51(1):47–55.
6. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer.* 2015;136(5):E359–86.
7. DeSantis CE, Chieh Lin C, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, et al. *Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2014.* CA. *Cancer J. Clin.* 2014;64(4):252–71.
8. Barnholtz-Sloan JS, Schwartz AG, Qureshi F, Jacques S, Malone J, Munkarah AR. Ovarian cancer: Changes in patterns at diagnosis and relative survival over the last three decades. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2003;189(4):1120–7.
9. Testa U, Petrucci E, Pasquini L, Castelli G, Pelosi E. Ovarian Cancers: Genetic Abnormalities, Tumor Heterogeneity and Progression, Clonal Evolution and Cancer Stem Cells. *Medicines.* 2018;5(1):16.
10. Tone AA, Salvador S, Finlayson SJ, Tinker A V, Kwon JS, Lee C-H, et al. The role of the fallopian tube in ovarian cancer. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 2012;10(5):296–306.
11. Dietl J. Revisiting the pathogenesis of ovarian cancer: The central role of the fallopian tube. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2014;289(2):241–6.
12. Nowak M, Janas Ł, Stachowiak G, Stetkiewicz T, Wilczyński JR. Current clinical application of serum biomarkers to detect ovarian cancer. *Prz. Menopauzalny.* 2015;14(4):254–9.
13. Moore RG, Brown AK, Miller MC, Skates S, Allard WJ, Verch T, et al. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol. Oncol.* 2008;108(2):402–8.
14. Montagnana M, Benati M, Danese E. Circulating biomarkers in epithelial ovarian cancer diagnosis: from present to future perspective. *Ann. Transl. Med.* 2017;5(13):276.
15. Armitage EG, Barbas C. Metabolomics in cancer biomarker discovery: Current trends and future perspectives. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2014;87:1–11.
16. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the

- adult population in 2008. *Int. J. Cancer*. 2013;132(5):1133–45.
17. Edge S, Byrd D, Compton C, Fritz A, Greene F, A T. *AJCC cancer staging manual*. 7th edition. New York: Springer; 2010.
  18. Nezhat FR, Apostol R, Nezhat C, Pejovic T. New insights in the pathophysiology of ovarian cancer and implications for screening and prevention. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2015;213(3):262–7.
  19. Menon U, Grif M, Gentry-maharaj A. *Gynecologic Oncology Ovarian cancer screening — Current status , future directions*. 2014;132:490–5.
  20. Lowry KP, Lee SI. *Imaging and Screening of Ovarian Cancer*. *Radiol. Clin. North Am.* 2017;55(6):1251–9.
  21. Yin BWT, Dnistrian A, Lloyd KO. Ovarian cancer antigen CA125 is encoded by the MUC16 mucin gene. *Int. J. Cancer*. 2002;98(5):737–40.
  22. Perez BH, Gipson IK. *Focus on Molecules: Human mucin MUC16*. *Exp. Eye Res.* 2008;87(5):400–1.
  23. Jacobs I, Bast RCJ. The CA 125 tumour-associated antigen: a review of the literature. *Hum. Reprod.* 1989;4(1):1–12.
  24. Zhao T, Hu W. CA125 and HE4: Measurement Tools for Ovarian Cancer. *Gynecol. Obstet. Invest.* 2016;81(5):430–5.
  25. Mathieu KB, Bedi DG, Thrower SL, Qayyum A, Bast RC. Screening for ovarian cancer: imaging challenges and opportunities for improvement. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* In press 2017
  26. Skates SJ. Ovarian cancer screening: Development of the risk of ovarian cancer algorithm (ROCA) and ROCA screening trials. *Int. J. Gynecol. Cancer*. 2012;22(suppl. 1):2–5.
  27. Yurkovetsky Z, Skates S, Lomakin A, Nolen B, Pulsipher T, Modugno F, et al. Development of a multimer assay for early detection of ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* 2010;28(13):2159–66.
  28. Sorensen SS, Mosgaard BJ. Combination of cancer antigen 125 and carcinoembryonic antigen can improve ovarian cancer diagnosis. *Dan. Med. Bull.* 2011;58(11):A4331.
  29. Sagi-Dain L, Lavie O, Auslander R, Sagi S. CEA in evaluation of adnexal mass: retrospective cohort analysis and review of the literature. *Int. J. Biol. Markers*. 2015;30(4):e394-400.
  30. Santotoribio JD, Garcia-de la Torre A, Canavate-Solano C, Arce-Matute F, Sanchez-del Pino MJ, Perez-Ramos S. Cancer antigens 19.9 and 125 as tumor markers in patients with mucinous ovarian tumors. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2016;37(1):26–9.
  31. Kyung MS. Serum CA19-9 as a Predictor of Malignancy in Primary Ovarian Mucinous Tumors: A Matched Case-Control Study. *Med. Sci. Monit.* 2014;20:1334–9.
  32. Skates SJ, Horick N, Yu Y, Xu FJ, Berchuck A, Havrilesky LJ, et al. Preoperative sensitivity and specificity for early-stage ovarian cancer when combining cancer antigen CA-125II, CA 15-3,



- CA 72-4, and macrophage colony-stimulating factor using mixtures of multivariate normal distributions. *J. Clin. Oncol.* 2004;22(20):4059–66.
33. Gadducci A, Cosio S, Carpi A, Nicolini A, Genazzani AR. Serum tumor markers in the management of ovarian, endometrial and cervical cancer. *Biomed. Pharmacother.* 2004;58(1):24–38.
  34. Wieskopf B, Demangeat C, Purohit A, Stenger R, Gries P, Kreisman H, et al. Cyfra 21-1 as a biologic marker of non-small cell lung cancer. Evaluation of sensitivity, specificity, and prognostic role. *Chest.* 1995;108(1):163–9.
  35. Bandiera E, Zanotti L, Fabricio ASC, Bucca E, Squarcina E, Romani C, et al. Cancer antigen 125, human epididymis 4, kallikrein 6, osteopontin and soluble mesothelinrelated peptide immunocomplexed with immunoglobulin M in epithelial ovarian cancer diagnosis. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2013;51(9):1815–24.
  36. Wu Y, Lu M, Zhou Q. Kallikrein expression as a prognostic factor in ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *J. BUON.* 2015;20(3):855–61.
  37. Cheng D, Liang B, Li Y. Serum Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF-C) as a Diagnostic and Prognostic Marker in Patients with Ovarian Cancer. *PLoS One.* 2013;8(2):1–6.
  38. Sakurai M, Satoh T, Matsumoto K, Michikami H, Nakamura Y, Nakao S, et al. High pretreatment plasma D-dimer levels are associated with poor prognosis in patients with ovarian cancer independently of venous thromboembolism and tumor extension. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 2015;25(4):593–8.
  39. Chauhan S, Nigam JS, Singh P, Misra V, Thakur B. Endodermal sinus tumor of vagina in infants. *Rare Tumors.* 2013;5(2):83–4.
  40. Miao P, Sheng S, Sun X, Liu J, Huang G. Lactate dehydrogenase a in cancer: A promising target for diagnosis and therapy. *IUBMB Life.* 2013;65(11):904–10.
  41. Petrelli F, Cabiddu M, Coinu A, Borgonovo K, Ghilardi M, Lonati V, et al. Prognostic role of lactate dehydrogenase in solid tumors: A systematic review and meta-analysis of 76 studies. *Acta Oncol.* 2015;54(7):961–70.
  42. Cole LA. hCG, its free subunits and its metabolites. Roles in pregnancy and trophoblastic disease. *J. Reprod. Med.* 1998;43(1):3–10.
  43. Dikmen ZG, Colak A, Dogan P, Tuncer S, Akbiyik F. Diagnostic performances of CA125, HE4, and ROMA index in ovarian cancer. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2015;36(4):457–62.
  44. Granato T, Porpora MG, Longo F, Angeloni A, Manganaro L, Anastasi E. HE4 in the differential diagnosis of ovarian masses. *Clin. Chim. Acta.* 2015;446:147–55.
  45. Richardson LC. From Cancer Screening to Treatment: Service Delivery and Referral in the National Breast and Cervical Cancer Early Detection Program. *Cancer.* 2014;120(16):2549–56.
  46. Ganz PA, Goodwin PJ. Breast Cancer Survivorship: Where Are We Today? *Adv. Exp. Med. Biol.* 2015. p. 1–8.

47. Bensenhaver J, Winchester DP. Surgical leadership and standardization of multidisciplinary breast cancer care. The evolution of the national accreditation program for breast centers. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 2014;23(3):609–16.
48. Dumalaon-Canaria JA, Hutchinson AD, Prichard I, Wilson C. What causes breast cancer? A systematic review of causal attributions among breast cancer survivors and how these compare to expert-endorsed risk factors. *Cancer Causes Control.* 2014;25(7):771–85.
49. Shiovitz S, Korde LA. Genetics of breast cancer: A topic in evolution. *Ann. Oncol.* 2015;26(7):1291–9.
50. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al. Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies. *Am. J. Hum. Genet.* 2003;72(5):1117–30.
51. Adamovich TL, Simmons RM. Ductal carcinoma in situ with microinvasion. *Am. J. Surg.* 2003;186(2):112–6.
52. Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochem. Biophys.* 2015;72(2):333–8.
53. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Rakha et al. Breast Cancer Res.* 2010;133(6):860–8.
54. D'Abreo N, Hindenburg AA. Sex hormone receptors in breast cancer. *Vitam. Horm.* 2013;93:99–133.
55. Krishnamurti U, Silverman JF. HER2 in Breast Cancer: A Review and Update. *Adv Anat Pathol.* 2014;21(2):100–7.
56. Christgen M, Steinemann D, Kühnle E, Länger F, Gluz O, Harbeck N, et al. Lobular breast cancer: Clinical, molecular and morphological characteristics. *Pathol. Res. Pract.* 2016;212(7):583–97.
57. Klevos GA, Ezuddin NS, Vinyard A, Ghaddar T, Gort T, Almuna A, et al. A Breast Cancer Review: Through the Eyes of the Doctor, Nurse, and Patient. *J. Radiol. Nurs. Elsevier Inc.;* 2017;36(3):158–65.
58. Howlader N, Noone A, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Kosary C, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014. Bethesda: Natl. Cancer Institute.. 2017.
59. Gold RH, Bassett LW, Widoff BE. Highlights from the History of Mammography. *RadioGraphics.* 1990;10(6):1111–31.
60. Séradour B, Heid P, Estève J. Comparison of direct digital mammography, computed radiography, and film-screen in the French National Breast Cancer Screening Program. *Am. J.*

- Roentgenol. 2014;202(1):229–36.
61. Castagno R, Canuti D, Petrella M, Bucchi L, Fedato C, Garena F, et al. Information provided by breast cancer screening programmes: a comparison between 2001 and 2014. *Epidemiol Prev.* 2015;39(3 Suppl 1):48–51.
  62. Loy EY, Molinar D, Chow KY, Fock C. National breast cancer screening programme, Singapore: Evaluation of participation and performance indicators. *J. Med. Screen.* 2015;22(4):194–200.
  63. O'Brien KM, Dwane F, Kelleher T, Sharp L, Comber H. Interval cancer rates in the Irish national breast screening programme. *J. Med. Screen.* 2015;22(3):136–43.
  64. Evans DG, Brentnall AR, Harvie M, Dawe S, Sergeant JC, Stavrinou P, et al. Breast cancer risk in young women in the national breast screening programme: Implications for applying NICE guidelines for additional screening and chemoprevention. *Cancer Prev. Res.* 2014;7(10):993–1001.
  65. Gareth ED, Nisha K, Yit L, Soujanya G, Emma H, Massat NJ, et al. MRI breast screening in high-risk women: Cancer detection and survival analysis. *Breast Cancer Res. Treat.* 2014;145(3):663–72.
  66. Niell BL, Freer PE, Weinfurter RJ, Arleo EK, Drukteinis JS. Screening for Breast Cancer. *Radiol. Clin. North Am.* 2017;55(6):1145–62.
  67. Nelson HD, Fu R, Cantor A, Pappas M, Daeges M, Humphrey L. Effectiveness of breast cancer screening: Systematic review and meta-analysis to update the 2009 U.S. Preventive services task force recommendation. *Ann. Intern. Med.* 2016;164(4):244–55.
  68. Peairs KS, Choi Y, Stewart RW, Sateia HF. Screening for breast cancer. *Semin. Oncol.* 2017;44(1):60–72.
  69. Donepudi MS, Kondapalli K, Amos SJ, Venkanteshan P. Breast cancer statistics and markers. *J. Cancer Res. Ther.* 2014;10(3):506–11.
  70. Duffy MJ, Shering S, Sherry F, McDermott E, O'Higgins N. CA 15-3: a prognostic marker in breast cancer. *Int. J. Biol. Markers.* 2000;15(4):330–3.
  71. Molina R, Zanon G, Filella X, et al. Use of Serial Carcinoembryonic Antigen and Ca-15.3 Assays in Detecting Relapses in Breast-Cancer Patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 1995;41–8.
  72. Figueroa-Magalhães MC, Jelovac D, Connolly RM, Wolff AC. Treatment of HER2-positive breast cancer. *The Breast.* 2014;23(2):128–36.
  73. Fokter Dovnik N, Dovnik A, Cas Sikosek N, Ravnik M, Arko D, Takac I. Prognostic Role of HER2 Status and Adjuvant Trastuzumab Treatment in Lymph Node-Negative Breast Cancer Patients - A Retrospective Single Center Analysis. *Breast Care.* 2016;11(6):406–10.
  74. Duffy MJ, McGowan PM, Harbeck N, Thomssen C, Schmitt M. UPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: Validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast Cancer Res.* 2014;16(4):1–10.
  75. Lampelj M, Arko D, Cas-Sikosek N, Kavalarič R, Ravnik M, Ježersek-Novaković B, et al.

- Urokinase plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) in breast cancer-correlation with traditional prognostic factors. *Radiol. Oncol.* 2015;49(4):357–64.
76. Bertheau P, Lehmann-Che J, Varna M, Dumay A, Poirot B, Porcher R, et al. P53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. *Breast.* 2013;22(S2):S27–9.
77. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-tieulent J, Jemal A. Global Cancer Statistics, 2012. *CA a cancer J. Clin.* 2015;65(2):87–108.
78. Curado M, Edwards B, Shin R, Storm H, Ferlay J, Heanue M, et al. Cancer incidence in five continents vol. IX. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2007.
79. Morice P, Leary A, Creutzberg C, Abu-Rustum N, Darai E. Endometrial cancer. *Lancet.* 2016;387(10023):1094–108.
80. Thomas M, Mariani a, Wright JD, Madarek EOS, Powell M a, Mutch DG, et al. Surgical management and adjuvant therapy for patients with uterine clear cell carcinoma: a multi-institutional review. *Gynecol. Oncol.* 2008;108(2):293–7.
81. Yang HP, Meeker A, Guido R, Gunter MJ, Huang GS, Luhn P, et al. PTEN expression in benign human endometrial tissue and cancer in relation to endometrial cancer risk factors. *Cancer Causes Control.* 2015;26(12):1729–36.
82. Samulak D, Grosman-Dziewiszek P, Michalska MM, Mojs E, Samulak K, Romanowicz H, et al. Evaluation of expression of the PTEN gene, oestrogen and progesterone receptors as diagnostic and predictive factors in endometrial cancer. *Pathol. Oncol. Res.* 2014;20(1):191–6.
83. Scully MM, Palacios-Helgeson LK, Wah LS, Jackson TA. Rapid Estrogen Signaling Negatively Regulates PTEN Activity Through Phosphorylation in Endometrial Cancer Cells. *Horm. Cancer.* 2014;5(4):218–31.
84. Diaz-Padilla I, Romero N, Amir E, Matias-Guiu X, Vilar E, Muggia F, et al. Mismatch repair status and clinical outcome in endometrial cancer: A systematic review and meta-analysis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2013;88(1):154–67.
85. Banno K, Yanokura M, Iida M, Masuda K, Aoki D. Carcinogenic mechanisms of endometrial cancer: Involvement of genetics and epigenetics. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2014;40(8):1957–67.
86. Ali AT. Reproductive factors and the risk of endometrial cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 2014;24(3):384–93.
87. Jenabi E, Poorolajal J. The effect of body mass index on endometrial cancer: a meta-analysis. *Public Health.* 2015 Jul;129(7):872–80.
88. Cust AE. Physical activity and gynecologic cancer prevention. Recent results cancer Res. *Fortschritte der Krebsforsch. Prog. dans les Rech. sur le cancer.* 2011;186:159–85.
89. Nevadunsky NS, Van Arsdale A, Strickler HD, Moadel A, Kaur G, Levitt J, et al. Obesity and age at diagnosis of endometrial cancer. *Obstet. Gynecol.* 2014;124(2 Pt 1):300–6.

90. Barry JA, Azizia MM, Hardiman PJ. Risk of endometrial, ovarian and breast cancer in women with polycystic ovary syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update.* 2014;20(5):748–58.
91. Purdie DM. Epidemiology of endometrial cancer. *Rev. Gynaecol. Pract.* 2003;3(4):217–20.
92. Smith RA, Andrews K, Brooks D, DeSantis CE, Fedewa SA, Lortet-Tieulent J et al. Cancer Screening in the United States , 2016 : A Review of Current American Cancer Society Guidelines and Current Issues in Cancer Screening. *A Cancer J. Clin.* 2016;66(2):95–114.
93. Jacobs I, Gentry-Maharaj A, Burnell M, Manchanda R, Singh N, Sharma A, et al. Sensitivity of transvaginal ultrasound screening for endometrial cancer in postmenopausal women: A case-control study within the UKCTOCS cohort. *Lancet Oncol.* 2011;12(1):38–48.
94. Lu KH, Daniels M. Endometrial and ovarian cancer in women with lynch syndrome : Update in Screening and Prevention. *Fam Cancer.* 2014;12(2):1–7.
95. Smith RA, Manassaram-Baptiste D, Brooks D, Doroshenk M, Fedewa S, Saslow D, et al. Cancer Screening in the United States, 2015: A Review of Current American Cancer Society Guidelines and Current Issues in Cancer Screening Robert. *Ca Cancer J Clin.* 2015;65:30–54.
96. Rižner TL. Discovery of biomarkers for endometrial cancer: current status and prospects. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2016;16(12):1315–36.
97. Kim JH, Kim BW, Jeon YE, Cho H, Nam EJ, Kim SW, et al. Pre-treatment diagnosis of endometrial cancer through a combination of CA125 and multiplication of neutrophil and monocyte. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2012;38(1):48–56.
98. Jiang T, Huang L, Zhang S. Preoperative serum CA125: A useful marker for surgical management of endometrial cancer. *BMC Cancer.* 2015;15(1):1–8.
99. Cherchi PL, Dessole S, Ruiu GA, Ambrosini G, Farina M, Capobianco G, et al. The value of serum CA 125 and association CA 125/CA 19-9 in endometrial carcinoma. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 1999;20(4):315–7.
100. Scambia G, Gadducci A, Panici PB, Foti E, Ferdeghini M, Ferrandina G, et al. Combined use of CA 125 and CA 15-3 in patients with endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 1994;54(3):292–7.
101. Li J, Lin J, Luo Y, Kuang M, Liu Y. Multivariate analysis of prognostic biomarkers in surgically treated endometrial cancer. *PLoS One.* 2015;10(6):1–11.
102. Baser E, Gungor T, Togrul C, Turkoglu O, Celen S. Preoperative prediction of poor prognostic parameters and adjuvant treatment in women with pure endometrioid type endometrial cancer: what is the significance of tumor markers? *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2014;35(5):513–8.
103. Heyer H, Grunwald S, Köhler G, Ohlinger R. Significance of laboratory studies for ruling out metastases in primary endometrial carcinoma. *Anticancer Res.* 2007;27(3 B):1673–7.
104. Hashiguchi Y, Kasai M, Fukuda T, Ichimura T, Yasui T, Sumi T. Serum CA19-9 as a tumor marker in patients with endometrial cancer. *Curr. Oncol.* 2019;23(5):e439–42.

105. Kozakiewicz B, Chądzyńska M, Dmoch-Gajzlerska E, Stefaniak M. Monitoring the treatment outcome in endometrial cancer patients by CEA and TATI. *Tumor Biol.* 2016;37(7):9367–74.
106. Scharf ME. Omic research in termites: An overview and a roadmap. *Front. Genet.* 2015;6:76.
107. Cvijovic M, Almquist J, Hagmar J, Hohmann S, Kaltenbach HM, Klipp E, et al. Bridging the gaps in systems biology. *Mol. Genet. Genomics.* 2014;289(5):727–34.
108. Mast FD, Ratushny A V., Aitchison JD. Systems cell biology. *J. Cell Biol.* 2014;206(6):695–706.
109. Potter M, Newport E, Morten KJ. The Warburg effect: 80 years on. *Biochem. Soc. Trans.* 2016;44(5):1499–505.
110. Xu XD, Shao SX, Jiang HP, Cao YW, Wang YH, Yang XC, et al. Warburg effect or reverse warburg effect? a review of cancer metabolism. *Oncol. Res. Treat.* 2015;38(3):117–22.
111. Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science.* 1956;123(3191):309–14.
112. Lee N, Kim D. Cancer Metabolism : Fueling More than Just Growth. 2016;39(12):847–54.
113. Sun H, Zhang A, Yan G, Piao C, Li W, Sun C, et al. Metabolomic Analysis of Key Regulatory Metabolites in Hepatitis C Virus–infected Tree Shrews. *Mol. Cell.* 2013;710–9.
114. Dunn WB. Current trends and future requirements for the mass spectrometric investigation of microbial, mammalian and plant metabolomes. *Phys. Biol.* 2008;5(1):011001.
115. Buszewski B, Rudnicka J, Ligor T, Walczak M, Jezierski T, Amann A. Analytical and unconventional methods of cancer detection using odor. *Trends Anal. Chem.* 2012;38:1–12.
116. Blekherman G, Laubenbacher R, Cortes DF, Mendes P, Torti FM, Akman S, et al. Bioinformatics tools for cancer metabolomics. *Metabolomics.* 2011;7(3):329–43.
117. Zhang H, Zhao F, Zhou X, Lou G, Li K. Identification of Potential Biomarkers for Ovarian Cancer by Urinary Metabolomic Profiling. *J Proteome Res.* 2013;12(1):505–12.
118. Dumas M, Maibaum EC, Teague C, Ueshima H, Zhou B, Lindon JC, et al. Assessment of Analytical Reproducibility of <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy Based Metabonomics for Large-Scale Epidemiological Research : the INTERMAP Study. *Anal. Chem.* 2006;78(7):2199–208.
119. Woo HM, Kim KM, Choi MH, Jung BH, Lee J, Kong G, et al. Mass spectrometry based metabolomic approaches in urinary biomarker study of women’s cancers. *Clin. Chim. Acta.* 2009;400(1–2):63–9.
120. Guan W, Zhou M, Hampton CY, Benigno BB, Walker LD, Gray A, et al. Ovarian cancer detection from metabolomic liquid chromatography/mass spectrometry data by support vector machines. *BMC Bioinformatics.* 2009;10:259.
121. Gowda GNAN, Raftery D. Can NMR solve some significant challenges in metabolomics? *J Magn Reson.* 2015;260:144–60.
122. Zhang A, Sun H, Wang X. Saliva metabolomics opens door to biomarker discovery, disease

- diagnosis, and treatment. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012;168(6):1718–27.
123. Halket JM, Waterman D, Przyborowska AM, Patel RKP, Fraser PD, Bramley PM. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *J. Exp. Bot.* 2005;56(410):219–43.
  124. Gowda GAN, Djukovic D. Overview of Mass Spectrometry-Based Metabolomics: Opportunities and Challenges. *Methods Mol Biol.* 2014;1198:3–12.
  125. Keun HC, Athersuch TJ. Metabolic Profiling. *Methods Mol. Biol.* 2011.
  126. Gao P, Xu G. Mass-spectrometry-based microbial metabolomics: Recent developments and applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015;407(3):669–80.
  127. Carneiro S, Pereira R, Rocha I. Yeast metabolomics: sample preparation for a GC/MS-based analysis. *Methods Mol. Biol.* 2014;1152:197–207.
  128. Brennan L. NMR-based metabolomics: From sample preparation to applications in nutrition research. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 2014;83:42–9.
  129. Yang C, Richardson AD, Osterman A, Smith JW. Profiling of central metabolism in human cancer cells by two-dimensional NMR, GC-MS analysis, and isotopomer modeling. *Metabolomics.* 2008;4(1):13–29.
  130. Garcia E, Andrews C, Hua J, Kim HL, Sukumaran DK, Szyperski T, et al. Diagnosis of early stage ovarian cancer by 1H NMR metabolomics of serum explored by use of a micro-flow NMR probe. *J Proteome Res.* 2011;10(4):1765–71.
  131. Ke C, Hou Y, Zhang H, Fan L, Ge T, Guo B, et al. Large-scale profiling of metabolic dysregulation in ovarian cancer. *Int. J. Cancer.* 2015;136(3):516–26.
  132. Zhang AH, Sun H, Qiu S, Wang XJ. Metabolomics in noninvasive breast cancer. *Clin. Chim. Acta.* 2013.
  133. Turkoglu O, Zeb A, Graham S, Szyperski T, Szender JB, Odunsi K, et al. Metabolomics of biomarker discovery in ovarian cancer: a systematic review of the current literature. *Metabolomics.* 2016;12(4):60.
  134. Buas MF, Gu H, Djukovic D, Zhu J, Drescher CW, Urban N, et al. Identification of novel candidate plasma metabolite biomarkers for distinguishing serous ovarian carcinoma and benign serous ovarian tumors. *Gynecol. Oncol.* 2016;140(1):138–44.
  135. Li K, Fan L, Zhang W, Yin M, Zhang T, Wu X, et al. Identification of metabolic biomarkers to diagnose epithelial ovarian cancer using a UPLC/QTOF/MS platform. *Acta Oncol.* 2012;51(4):473–9.
  136. Fong MY, McDunn J, Kakar SS. Identification of metabolites in the normal ovary and their transformation in primary and metastatic ovarian cancer. *PLoS One.* 2011;6(5):1–12.
  137. Shender VO, Pavlyukov MS, Ziganshin RH, Arapidi GP, Kovalchuk SI, Anikanov NA, et al. Proteome – Metabolome Profiling of Ovarian Cancer Ascites Reveals Novel Components Involved in Intercellular Communication. *Mol Cell Proteomics.* 2014;13(12):3558–71.

138. Zhou M, Guan W, Walker LDE, Mezencev R, Benigno BB, Gray A, et al. Rapid mass spectrometric metabolic profiling of blood sera detects ovarian cancer with high accuracy. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2010;19(9):2262–71.
139. Odunsi K, Wollman RM, Ambrosone CB, Hutson A, McCann SE, Tammela J, et al. Detection of epithelial ovarian cancer using <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics. *Int. J. Cancer.* 2005;113(5):782–8.
140. Zhang T, Wu X, Yin M, Fan L, Zhang H, Zhao F, et al. Discrimination between malignant and benign ovarian tumors by plasma metabolomic profiling using ultra performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta.* 2012;413(9–10):861–8.
141. Hilvo M, De Santiago I, Gopalacharyulu P, Schmitt WD, Budczies J, Kuhberg M, et al. Accumulated metabolites of hydroxybutyric acid serve as diagnostic and prognostic biomarkers of ovarian high-grade serous carcinomas. *Cancer Res.* 2016;76(4):796–804.
142. Slupsky CM, Steed H, Wells TH, Dabbs K, Schepansky A, Capstick V, et al. Urine metabolite analysis offers potential early diagnosis of ovarian and breast cancers. *Clin. Cancer Res.* 2010;16(23):5835–41.
143. Gribbestad IS, Fjøsne HE, Haugen OA, Nilsen G, Krane J, Petersen SB, et al. In vitro proton NMR spectroscopy of extracts from human breast tumours and non-involved breast tissue. *Anticancer Res.* 1993;13(6A):1973—1980.
144. Cífková E, Holčapek M, Lísa M, Vrána D, Gatěk J, Melichar B. Determination of lipidomic differences between human breast cancer and surrounding normal tissues using HILIC-HPLC/ESI-MS and multivariate data analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015;407(3):991–1002.
145. Dória ML, Cotrim CZ, Simões C, Macedo B, Domingues P, Domingues MR, et al. Lipidomic analysis of phospholipids from human mammary epithelial and breast cancer cell lines. *J. Cell. Physiol.* 2013;228(2):457–68.
146. Bougnoux P, Hajjaji N, Couet C. The lipidome as a composite biomarker of the modifiable part of the risk of breast cancer. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.* 2008;79(3–5):93–6.
147. Günther UL. Metabolomics Biomarkers for Breast Cancer. *Pathobiology.* 2015;82(3–4):153–65.
148. Asiago VM, Alvarado LZ, Shanaiah N, Gowda GN, Owusu-Sarfo K, Ballas R, et al. Early Detection of Recurrent Breast Cancer Using Metabolite Profiling. 2010;70(21):8309–18.
149. Budczies J, Denkert C, Müller BM, Brockmüller SF, Klauschen F, Györfy B, et al. Remodeling of central metabolism in invasive breast cancer compared to normal breast tissue - a GC-TOFMS based metabolomics study. *BMC Genomics.* 2012;13(1):334.
150. Tenori L, Oakman C, Claudino WM, Bernini P, Cappadona S, Nepi S, et al. Exploration of serum metabolomic profiles and outcomes in women with metastatic breast cancer: A pilot study. *Mol. Oncol.* 2012;6(4):437–44.



151. Jobard E, Pontoizeau C, Blaise BJ, Bachelot T, Elena-Herrmann B, Trédan O. A serum nuclear magnetic resonance-based metabolomic signature of advanced metastatic human breast cancer. *Cancer Lett.* 2014;343(1):33–41.
152. Nam H, Chung BC, Kim Y, Lee K, Lee D. Combining tissue transcriptomics and urine metabolomics for breast cancer biomarker identification. *Bioinformatics.* 2009;25(23):3151–7.
153. Hennes C, Bullinger D, Fux R, Friese N, Seeger H, Neubauer H, et al. Prediction of breast cancer by profiling of urinary RNA metabolites using Support Vector Machine-based feature selection. *BMC Cancer.* 2009;9:1–11.
154. Brockmöller SF, Bucher E, Müller BM, Budczies J, Hilvo M, Griffin JL, et al. Integration of metabolomics and expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAM) in breast cancer—link to patient survival, hormone receptor status, and metabolic profiling. *J. Proteome Res.* 2012;11(2):850–60.
155. Li M, Song Y, Cho N, Chang JM, Koo HR, Yi A, et al. An HR-MAS MR metabolomics study on breast tissues obtained with core needle biopsy. *PLoS One.* 2011;6(10):e25563.
156. Lv W, Yang T. Identification of possible biomarkers for breast cancer from free fatty acid profiles determined by GC-MS and multivariate statistical analysis. *Clin. Biochem.* 2012;45(1–2):127–33.
157. Dória ML, Cotrim Z, MacEdo B, Simões C, Domingues P, Helguero L, et al. Lipidomic approach to identify patterns in phospholipid profiles and define class differences in mammary epithelial and breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 2012;133(2):635–48.
158. Chen Y, Zhang R, Song Y, He J, Sun J, Bai J, et al. RRLC-MS/MS-based metabolomics combined with in-depth analysis of metabolic correlation network: finding potential biomarkers for breast cancer. *Analyst.* 2009;134(10):2003.
159. Kim Y, Koo I, Jung BH, Chung BC, Lee D. Multivariate classification of urine metabolome profiles for breast cancer diagnosis. *BMC Bioinformatics.* 2010;11(suppl. 2):S4.
160. Yu L, Jiang C, Huang S, Gong X, Wang S, Shen P. Analysis of urinary metabolites for breast cancer patients receiving chemotherapy by CE-MS coupled with on-line concentration. *Clin. Biochem.* 2013;46(12):1065–73.
161. Lin T, Zhao X, Kong W-M. Association between adiponectin levels and endometrial carcinoma risk: Evidence from a dose-response meta-analysis. *BMJ Open.* 2015;5(9):e008541.
162. Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, et al. A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metab.* 2009;9(4):311–26.
163. Lotta LA, Scott RA, Sharp SJ, Burgess S, Luan J, Tillin T, et al. Genetic Predisposition to an Impaired Metabolism of the Branched-Chain Amino Acids and Risk of Type 2 Diabetes: A Mendelian Randomisation Analysis. *PLoS Med.* 2016;13(11):1–22.
164. Shao X, Wang K, Liu X, Gu C, Zhang P, Xie J, et al. Screening and verifying endometrial

- carcinoma diagnostic biomarkers based on a urine metabolomic profiling study using UPLC-Q-TOF/MS. *Clin. Chim. Acta.* 2016;463:200–6.
165. Audet-Delage Y, Villeneuve L, Grégoire J, Plante M, Guillemette C. Identification of metabolomic biomarkers for endometrial cancer and its recurrence after surgery in postmenopausal women. *Front. Endocrinol.* 2018;9(87):1–12.
166. Trousil S, Lee P, Pinato DJ, Ellis JK, Dina R, Aboagye EO, et al. Alterations of choline phospholipid metabolism in endometrial cancer are caused by choline kinase alpha overexpression and a hyperactivated deacylation pathway. *Cancer Res.* 2014;74(23):6867–77.
167. Troisi J, Sarno L, Landolfi A, Scala G, Martinelli P, Venturella R, et al. Metabolomic Signature of Endometrial Cancer. *J. Proteome Res.* 2018;17(2):804–12.
168. Bahado-Singh RO, Lugade A, Field J, Al-Wahab Z, Han BS, Mandal R, et al. Metabolomic prediction of endometrial cancer. *Metabolomics.* 2018;14(6):1–9.
169. Gaudet MM, Falk RT, Stevens RD, Gunter MJ, Bain JR, Pfeiffer RM, et al. Analysis of serum metabolic profiles in women with endometrial cancer and controls in a population-based case-control study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012;97(9):3216–23.
170. Kozar N, Kruusmaa K, Bitenc M, Argamasilla R, Adsuar A, Goswami N, et al. Metabolomic profiling suggests long chain ceramides and sphingomyelins as a possible diagnostic biomarker of epithelial ovarian cancer. *Clin. Chim. Acta.* 2018;481:108–14.
171. Fan L, Yin M, Ke C, Ge T, Zhang G, Zhang W, et al. Use of plasma metabolomics to identify diagnostic biomarkers for early stage epithelial ovarian cancer. *J. Cancer.* 2016;7(10):1265–72.
172. Gaul DA, Mezencev R, Long TQ, Jones CM, Benigno BB, Gray A, et al. Highly-accurate metabolomic detection of early-stage ovarian cancer. *Nat. Publ. Gr.* 2015;5:16351.
173. Grammatikos G, Schoell N, Ferreirós N, Bon D, Herrmann E, Farnik H, et al. Serum sphingolipidomic analyses reveal an upregulation of C16- ceramide and sphingosine-1-phosphate in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(14):18095–105.
174. Chen L, Chen H, Li Y, Li L, Qiu Y, Ren J. Endocannabinoid and ceramide levels are altered in patients with colorectal cancer. *Oncol. Rep.* 2015;34(1):447–54.
175. Holliday MW, Cox SB, Kang MH, Maurer BJ. C22:0- and C24:0-dihydroceramides Confer Mixed Cytotoxicity in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines. *PLoS One.* 2013;8(9):1–14.
176. Karahatay S, Thomas K, Koybasi S, Senkal CE, ElOjeimy S, Liu X, et al. Clinical relevance of ceramide metabolism in the pathogenesis of human head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): Attenuation of C18-ceramide in HNSCC tumors correlates with lymphovascular invasion and nodal metastasis. *Cancer Lett.* 2007;256(1):101–11.
177. Dany M, Ogretmen B. Ceramide induced mitophagy and tumor suppression. *Biochim. Biophys.*

- Acta - Mol. Cell Res. 2015;1853(10):2834–45.
178. Kihara A. Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal acylceramides. *Prog. Lipid Res.* 2016;63:50–69.
  179. Sassa T, Suto S, Okayasu Y, Kihara A. A shift in sphingolipid composition from C24 to C16 increases susceptibility to apoptosis in HeLa cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 2012;1821(7):1031–7.
  180. Schiffmann S, Sandner J, Birod K, Wobst I, Angioni C, Ruckhäberle E, et al. Ceramide synthases and ceramide levels are increased in breast cancer tissue. *Carcinogenesis.* 2009;30(5):745–52.
  181. Grösch S, Schiffmann S, Geisslinger G. Chain length-specific properties of ceramides. *Prog. Lipid Res.* 2012;51(1):50–62.
  182. Kamil B, Anna F, Anna S, Sławomir P, Halina C. Regulation of sphingomyelin metabolism. *Pharmacol. Reports.* 2016;68(3):570–81.
  183. Huang H, Tong T-T, Yau L-F, Chen C-Y, Mi J-N, Wang J-R, et al. LC-MS Based Sphingolipidomic Study on A2780 Human Ovarian Cancer Cell Line and its Taxol-resistant Strain. *Sci. Rep.* 2016;6(October):34684.
  184. Vouk K, Ribič-Pucelj M, Adamski J, Rižner TL. Altered levels of acylcarnitines, phosphatidylcholines, and sphingomyelins in peritoneal fluid from ovarian endometriosis patients. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2016;159:60–9.
  185. Separovic D, Shields AF, Philip PA, Bielawski J, Bielawska A, Pierce JS, et al. Altered Levels of Serum Ceramide, Sphingosine and Sphingomyelin Are Associated with Colorectal Cancer: A Retrospective Pilot Study. *Anticancer Res.* 2017;37(3):1213–8.
  186. V S, BH D, BW G, et al. Ovarian cancer: Screening, treatment, and follow-up. *JAMA.* 1995;273(6):491–7.
  187. Tang X, Lin CC, Spasojevic I, Iversen ES, Chi JT, Marks JR. A joint analysis of metabolomics and genetics of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2014;16(4):1–15.
  188. Jové M, Collado R, Quiles JL, Sol J, Ruiz-sanjuan M, Fernandez M, et al. A plasma metabolomic signature discloses human breast cancer. *Oncotarget.* 2017;8(12):19522–33.
  189. Jones LL, McDonald DA, Borum PR. Acylcarnitines: Role in brain. *Prog. Lipid Res.* 2010;49(1):61–75.
  190. Reuter SE, Evans AM. Carnitine and acylcarnitines: Pharmacokinetic, pharmacological and clinical aspects. *Clin. Pharmacokinet.* 2012;51(9):553–72.
  191. Bremer J. Carnitine-Metabolism. 1983;63(4).
  192. Chughtai K, Jiang L, Greenwood TR, Glunde K, Heeren RMA. Mass spectrometry images acylcarnitines, phosphatidylcholines, and sphingomyelin in MDA-MB-231 breast tumor models. *J. Lipid Res.* 2013;54(2):333–44.
  193. Cui M, Wang Q, Chen G. Serum metabolomics analysis reveals changes in signaling lipids in breast cancer patients. *Biomed. Chromatogr.* 2016;30(1):42–7.

194. Ganti S, Taylor SL, Kim K, Hoppel CL, Guo L, Yang J, et al. Urinary acylcarnitines are altered in human kidney cancer. *Int J Cancer*. 2012;130(12):2791–800.
195. Whelan J FK. Linoleic Acid. *Adv. Nutr.* 2013;4(3):311–2.
196. Rose D. Dietary Fat, Fatty Acids and Breast Cancer. *Breast Cancer*. 1997;4(1):7–16.
197. Zhou Y, Wang T, Zhai S, Li W, Meng Q. Linoleic acid and breast cancer risk: A meta-analysis. *Public Health Nutr.* 2016;19(8):1457–63.
198. Kemp Jacobsen K, O’Meara ES, Key D, S M Buist D, Kerlikowske K, Vejborg I, et al. Comparing sensitivity and specificity of screening mammography in the United States and Denmark. *Int. J. cancer*. 2015;137(9):2198–207.
199. Mojakgomo R, Mbita Z, Dlamini Z. Linking the ceramide synthases (CerSs) 4 and 5 with apoptosis, endometrial and colon cancers. *Exp. Mol. Pathol.* 2015;98(3):585–92.
200. Knapp P, Baranowski M, Knapp M, Zabielski P, Błachnio-Zabielska AU, Górski J. Altered sphingolipid metabolism in human endometrial cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2010;92(1–4):62–6.
201. Knific T, Vouk K, Smrkolj Š, Prehn C, Adamski J, Rižner TL. Models including plasma levels of sphingomyelins and phosphatidylcholines as diagnostic and prognostic biomarkers of endometrial cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2018;178:312–21.
202. Ishiwata S, Itoh K, Yamaguchi T, Sasaki S, Ishida N, Mizugaki M. Serum 1-methyladenosine and pseudouridine as tumor markers in tumor-bearing mice. *Yakugaku Zasshi*. 1995;115(7):523–7.
203. Seidel A, Brunner S, Seidel P, Fritz GI, Herbarth O. Modified nucleosides: An accurate tumour marker for clinical diagnosis of cancer, early detection and therapy control. *Br. J. Cancer*. 2006;94(11):1726–33.
204. Dunn WB, Broadhurst D, Ellis DI, Brown M, Halsall A, O’Hagan S, et al. A GC-TOF-MS study of the stability of serum and urine metabolomes during the UK Biobank sample collection and preparation protocols. *Int. J. Epidemiol.* 2008;37(suppl. 1):23–30.
205. Benson DA, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(D1):32–7.

## 9. Članek kot del doktorske disertacije

KOZAR, Nejc, KRUUSMAA, Kristi, BITENC, Marko, ARGAMASILLA, Rosa, ADSUAR, Antonio, GOSWAMI, Nandu, ARKO, Darja, TAKAČ, Iztok. Metabolomic profiling suggests long chain ceramides and sphingomyelins as a possible diagnostic biomarker of epithelial ovarian cancer. *Clinica Chimica Acta*. [Online ed.], Jun. 2018, vol. 481, str. 108-114, ilustr. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898118300986?via%3Dihub>, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.02.029>, doi: [10.1016/j.cca.2018.02.029](https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.02.029). [COBISS.SI-ID [6267199](https://www.cobiss.si/id/6267199)]

## 10. Priloge

### 10.1 Zahvala

Na prvem mestu se moram zahvaliti svojemu mentorju, **red. prof. dr. Iztoku Takaču, dr. med. svetnik**, za potrpežljivo mentorstvo tako skozi leta specializacije, kot tudi skozi študij. Njegova vrata so bila vedno na stežaj odprta za vprašanja in konstruktivne pogovore. Njegova predanost delu in raziskovalna vnema sta mi ves čas dajala zagon za nove izzive.

Zahvaljujem se **prim. Uršuli Salobir Gajšek, dr. med.** in **Marku Mlinariču, dr. med.** za pravi nasvet ob pravem času, oba sta namreč veliko pripomogla k izbiri specializacije ginekologije in porodništva.

Zahvaljujem se celotnemu kolektivu Klinike za ginekologijo in perinatologijo Univerzitetnega kliničnega centra Maribor za potrpežljivost in pomoč pri zbiranju vzorcev.

Zahvaljujem se osebju podjetja Universal Dx, predvsem **Kristi Kruusmaa** za prijetno in produktivno sodelovanje.

Hvala tudi moji družini, predvsem **Nataši**, za neskončne ure potrpljenja in neomejeno podporo.

## 10.2 Osebna bibliografija za obdobje 2007 – 2018

### 2007

1. KOZAR, Nejc. *Količina vodikovega cianida v jabolčnih pečkah : [raziskovalno področje] kemija in kemijska tehnologija : raziskovalna naloga*. Maribor: II. gimnazija Maribor, 2007. 26 f., ilustr. [COBISS.SI-ID [60616193](#)]
- 

### 2012

2. FERANT, Žan, KOZAR, Nejc, DOLINŠEK, Jernej, MIČETIĆ-TURK, Dušanka. Mineral bone density in children and adolescents with celiac disease and inflammatory bowel disease. V: *Abstract book*. [S. l.: s. n. 2012]. [COBISS.SI-ID [512267832](#)]
  3. KOZAR, Nejc, FERANT, Žan, DOLINŠEK, Jernej, MIČETIĆ-TURK, Dušanka. Mineral bone density in pediatric patients with celiac disease on gluten-free diet. V: *Abstract book*. [S. l.: s. n. 2012]. [COBISS.SI-ID [512268088](#)]
  4. FERANT, Žan, KOZAR, Nejc. *Mineralna kostna gostota pri otrocih in mladostnikih s celiakijo in kronično vnetno črevesno boleznijo*. Maribor: Univerza, Medicinska fak., 2012. 57 str., ilustr. <http://dkum.uni-mb.si/Dokument.php?id=53841>. [COBISS.SI-ID [512250680](#)] nagrada: Srebrna Dekanova nagrada za l. 2012
- 

### 2013

5. FERANT, Žan, KOZAR, Nejc, DOLINŠEK, Jernej, ŠIKIĆ POGAČAR, Maja, MIČETIĆ-TURK, Dušanka. Bone mineral density and body composition in pediatric patients with coeliac disease and inflammatory bowel disease. V: *European Society of Pediatric Clinical Research 22nd Meeting, June 28, 2013, Hradec Králové, Czech Republic*. [Hradec Králové: s. n. 2013], str. 14. [COBISS.SI-ID [4709695](#)]
6. KOZAR, Nejc, FERANT, Žan, DOLINŠEK, Jernej, ŠIKIĆ POGAČAR, Maja, MIČETIĆ-TURK, Dušanka. Mineral bone density correlates with t-TG levels in pediatric patients with celiac disease. V: *European Society of Pediatric Clinical Research 22nd Meeting, June 28, 2013, Hradec Králové, Czech Republic*. [Hradec Králové: s. n. 2013], str. 20. [COBISS.SI-ID [4709951](#)]
7. FERANT, Žan, KOZAR, Nejc. Mineralna kostna gostota pri otrocih in mladostnikih s celiakijo in kronično vnetno črevesno boleznijo. V: BUKOVNIK, Anja (ur.), et al. *Zbornik prispevkov s programom, 1. kongres študentov medicine, Maribor, 20. maj 2013, UKC Maribor*. Maribor: Medicinska fakulteta. 2013, str. 17. [COBISS.SI-ID [512285240](#)]
8. ŠIKIĆ POGAČAR, Maja, DOLINŠEK, Jernej, FERANT, Žan, KOZAR, Nejc, MIČETIĆ-TURK, Dušanka. Raven vitamina D pri otrocih in mladostnikih s celiakijo in kroničnimi vnetnimi črevesnimi boleznimi v severovzhodni Sloveniji. V: ROTOVNIK-KOZJEK, Nada (ur.). *Zbornik, 2. kongres klinične prehrane in presnovne podpore z*

- mednarodno udeležbo, Portorož, 15.-17. november 2013. Ljubljana: Slovensko združenje za klinično prehrano. 2013, str. 189-191. [COBISS.SI-ID [4901951](#)]
9. FERANT, Žan, KOZAR, Nejc, ŠIKIĆ POGAČAR, Maja, DOLINŠEK, Jernej, MIČETIĆ-TURK, Dušanka. Vitamin D levels in children and adolescents affected by celiac disease and inflammatory bowel disease in Northeastern Slovenia. V: *Abstracts*, 15th International Celiac Disease Symposium, Chicago, September 22-25, 2013. [Chicago: s. n. 2013], str. 29. [COBISS.SI-ID [4790079](#)]
- 

## 2014

10. KOZAR, Nejc, TAKAČ, Iztok. Ameriško združenje za klinično onkologijo (ASCO) - 50. obletnica delovanja : Chicago, ZDA, 30. 5.-3. 6. 2014. *Isis : glasilo Zdravniške zbornice Slovenije*, ISSN 1318-0193. [Tiskana izd.], nov. 2014, leto 23, št. 11, str. 58-59. [COBISS.SI-ID [5155647](#)]
11. FERANT, Žan, KOZAR, Nejc, MIČETIĆ-TURK, Dušanka. *Bone mineral density and body composition : bone mineral density and body composition in children and adolescents with celiac disease and inflammatory bowel disease*. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing, cop. 2014. 52 str., ilustr. ISBN 978-3-659-58499-2. [COBISS.SI-ID [512430392](#)]
12. FERANT, Žan, KOZAR, Nejc, DOLINŠEK, Jernej, ŠIKIĆ POGAČAR, Maja, MIČETIĆ-TURK, Dušanka. Bone mineral density and body composition in pediatric patients with celiac disease and inflammatory bowel disease. *HealthMed*, ISSN 1840-2291, 2014, vol. 8, no. 3, str. 319-328. [http://www.healthmed.ba/pdf/healthmed\\_8\\_3\\_web.pdf](http://www.healthmed.ba/pdf/healthmed_8_3_web.pdf). [COBISS.SI-ID [4938047](#)]
13. KOZAR, Nejc, FERANT, Žan, DOLINŠEK, Jernej, ŠIKIĆ POGAČAR, Maja, MIČETIĆ-TURK, Dušanka. Bone mineral density correlates with t-TG levels in pediatric patients with celiac disease. *HealthMed*, ISSN 1840-2291, 2014, vol. 8, no. 1, str. 19-26. [http://www.healthmed.ba/pdf/healthmed\\_8\\_1\\_web.pdf](http://www.healthmed.ba/pdf/healthmed_8_1_web.pdf). [COBISS.SI-ID [4880447](#)]
14. IVANECZ, Arpad, KOZAR, Nejc, JAGRIČ, Tomaž, POTRČ, Stojan. Laparoscopic liver surgery - from wedge resections to major hepatectomy. V: *Program i satnica = Programme and timetable. Knjiga sažetaka = Abstract book*, 12. Hrvatski kongres endoskopske kirurgije s međunarodnim sudjelovanjem, Varaždin, Hrvatska, 21.-24. svibnja 2014. [S. l.: s. n. 2014], str. 21. [COBISS.SI-ID [4995903](#)]
15. KOZAR, Nejc, FERANT, Žan, DOLINŠEK, Jernej, ŠIKIĆ POGAČAR, Maja, MIČETIĆ-TURK, Dušanka. Mineralna kostna gostota sovpada z nivojem t-TG med pediatričnimi bolniki s celiakijo. V: BRECELJ, Jernej (ur.), et al. *6. slovenski pediatrični kongres, 9.-11. oktober 2014, Terme Čatež, Čatež ob Savi*, (Slovenska pediatrija, ISSN 1318-4423, letn. 21, suppl. 1). Ljubljana: Pediatrična klinika. 2014, str. 97. [COBISS.SI-ID [5130815](#)]
-



## 2015

16. STOPNIŠEK, Katja. *Doživljanje poroda : (diplomsko delo)*. Maribor: [K. Stopnišek], 2015. V, 44 f., 5 f. pril., ilustr. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=54243>. [COBISS.SI-ID [2159012](#)]
17. KOZAR, Nejc, KOVAČIČ, Borut, RELJIČ, Milan, KOVAČ, Vilma. Our experience in treatment of idiopathic infertility using intrauterine inseminations (IUI) and in vitro fertilization (IVF). V: *Programme and book of abstracts, The XIII Annual Meeting of the Mediterranean Society for Reproductive Medicine*, May 14-16, 2015, Ljubljana, Slovenia. [Ljubljana: Mediterranean Society for Reproductive Medicine. 2015], str. 58. [COBISS.SI-ID [5383999](#)]
18. PAKIŽ, Maja, BALI, Robert, KOZAR, Nejc, BUT, Igor. Predoperativni kriteriji za odločitev o pristopu (laparoskopski, laparotomija) pri kirurškem zdravljenju raka endometrija. V: KREBS, Bojan (ur.), IVANECZ, Arpad (ur.). [*Zbornik predavanj*], 13. kongres endoskopske kirurgije Slovenije, simpozij z mednarodno udeležbo, Maribor, 16.-18. april, 2015. Maribor: Slovensko združenje za gastroenterologijo in hepatologijo. 2015, str. 156-157. [COBISS.SI-ID [5339455](#)]
19. KUDER, Lucija, LUKMAN, Lara, KOZAR, Nejc. Ultrazvočna preiskava posteljice, materničnega vratu in ultrazvok v poporodnem obdobju. V: GAVRIČ-LOVREC, Vida (ur.). *4. Mariborska šola ultrazvočne diagnostike v ginekologiji in perinatologiji : učno gradivo*. Maribor: Medicinska fakulteta: Univerzitetni klinični center. 2015, str. 139-150, ilustr. [COBISS.SI-ID [5485119](#)]
20. ČAS-SIKOŠEK, Nina, KOZAR, Nejc. UZ dojk. V: GAVRIČ-LOVREC, Vida (ur.). *4. Mariborska šola ultrazvočne diagnostike v ginekologiji in perinatologiji : učno gradivo*. Maribor: Medicinska fakulteta: Univerzitetni klinični center. 2015, str. 74-84, ilustr. [COBISS.SI-ID [5481791](#)]

---

## 2016

21. KOZAR, Nejc, GAVRIČ-LOVREC, Vida. 5. mariborska šola praktične ultrazvočne diagnostike v ginekologiji in perinatologiji. *Isis : glasilo Zdravniške zbornice Slovenije*, ISSN 1318-0193. [Tiskana izd.], dec. 2016, leto 25, št. 12, str. 53-54, ilustr. [COBISS.SI-ID [5874495](#)]
22. KOZAR, Nejc, TAKAČ, Iztok, ARKO, Darja. Database management in breast cancer and the application in the research field. V: *Uniting the globe in the fight against gynecologic cancer : scientific program*. [Lisbon]: International Gynecologic Cancer Society. cop. 2016. <http://cmoffice.kenes.com/KA/igcs16program.html>. [COBISS.SI-ID [5838655](#)]
23. TAKAČ, Iztok, ARKO, Darja, KOZAR, Nejc. Examples of database management in gynaecological oncology and the application in the research field. V: MARKELJ, Tilen (ur.). *Research is the backbone of medicine - RIBOM : [1st Student Research Conference, 9th and 8th April 2016 in Maribor : collection of scientific papers]*. Maribor: Faculty of Medicine. 2016, str. [11]-12. [COBISS.SI-ID [5660479](#)]
24. KOZAR, Nejc, ČAS-SIKOŠEK, Nina, RAVNIK, Maja. Neoadjuvant systemic oncologic treatment of breast cancer : a review of new data and our first results. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, ISSN

- 1872-7654. [Online ed.], Nov. 2016, vol. 206, str. e64-e65. [http://www.ejog.org/article/S0301-2115\(16\)30499-7/fulltext](http://www.ejog.org/article/S0301-2115(16)30499-7/fulltext), doi: [10.1016/j.ejogrb.2016.07.182](https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.07.182). [COBISS.SI-ID [6090047](#)]
25. KOZAR, Nejc, PAKIŽ, Maja. Spremljanje bolnic po zaključenem zdravljenju maligne ginekološke bolezni in raka dojke. *Naša bolnišnica : časopis Splošne bolnišnice Maribor*, 2016, letn. 17, št. 4, str. 18-19, ilustr. [COBISS.SI-ID [5943871](#)]
- 

## 2017

26. TAKAČ, Iztok (urednik), KOZAR, Nejc (urednik). *Abstract book*. Maribor: Department of Gynaecology and Perinatology, University Medical Centre, 2017. 88 str. ISBN 978-961-6909-87-7. [COBISS.SI-ID [92377857](#)]
27. KOZAR, Nejc, ČAS-SIKOŠEK, Nina, ARKO, Darja, RAVNIK, Maja, TAKAČ, Iztok. *Ki-67 can be used as a predictive factor for the effectiveness of neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients : lecture on International Meeting of the European Society of Gynaecological Oncology (ESGO), Vienna, Austria, November 4-7, 2017*. [COBISS.SI-ID [6190655](#)]
28. KOZAR, Nejc, BUT, Igor. *Laparoscopic rectopexy : case presentation in free communications/video session at 5th Top 40 Urogynecology Meeting, Bohinj, October 6-8, 2017*. [COBISS.SI-ID [6143039](#)]
29. KOZAR, Nejc, BUT, Igor. *Mini sling procedure : case presentation in free communications/video session at 5th Top 40 Urogynecology Meeting, Bohinj, October 6-8, 2017*. [COBISS.SI-ID [6143295](#)]
30. ARKO, Darja, ČAS-SIKOŠEK, Nina, KOZAR, Nejc, SOBOČAN, Monika, TAKAČ, Iztok. The value of ultrasound-guided surgery for breast cancer. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, ISSN 1872-7654. [Online ed.], Sep. 2017, vol. 216, str. 198-203. [http://www.ejog.org/article/S0301-2115\(17\)30368-8/pdf](http://www.ejog.org/article/S0301-2115(17)30368-8/pdf), doi: [10.1016/j.ejogrb.2017.07.034](https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2017.07.034). [COBISS.SI-ID [6091583](#)]
- 

## 2018

31. PAKIŽ, Maja (urednik), KOZAR, Nejc (urednik), 1st International Multidisciplinary Workshop on Approach to Women with Pelvic Organ Tumors, University Medical Centre Maribor, Department of Gynaecologic and Breast Oncology, 12 - 13 January 2018, Maribor. *Abstract book*. Maribor: University Medical Centre, Department of Gynaecologic and Breast Oncology, 2018. 140 str. ISBN 978-961-7039-00-9. [COBISS.SI-ID [93837313](#)]
32. PAKIŽ, Maja (urednik), KOZAR, Nejc (urednik). *Abstract book*. Maribor: University Medical Centre, Department of Gynaecologic and Breast Oncology, 2018. ISBN 978-961-7039-01-6. <http://www.ukc-mb.si/>. [COBISS.SI-ID [94001153](#)]
33. TAKAČ, Iztok, KOZAR, Nejc. Anamneza in ginekološki pregled pred in po porodu doma, materinska knjižica. V: TAKAČ, Iztok (ur.), KOZAR, Nejc (ur.). *Obravnava*
-

- ženske pred in po porodu doma v ginekološki dispanzerski ambulanti : zbornik : učna delavnica za zdravnike specializante in specialiste ginekologije in porodništva, specializante in specialiste družinske medicine, specializante in specialiste urgentne medicine, zdravnike pripravnike, medicinske sestre, medicinske sestre babice, reševalce in zdravstvene administratorje, 19. 1. 2018, Medicinska fakulteta Univerze v Mariboru, Maribor, Slovenija. Maribor: Univerzitetni klinični center, Klinika za ginekologijo in perinatologijo. 2018, str. 59-63. [COBISS.SI-ID [6224447](#)]
34. KOZAR, Nejc, KRUUSMAA, Kristi, BITENC, Marko, ARGAMASILLA, Rosa, ADSUAR, Antonio, GOSWAMI, Nandu, ARKO, Darja, TAKAČ, Iztok. Metabolomic profiling suggests long chain ceramides and sphingomyelins as a possible diagnostic biomarker of epithelial ovarian cancer. *Clinica Chimica Acta*. [Online ed.], Jun. 2018, vol. 481, str. 108-114, ilustr. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898118300986?via%3Dihub>, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.02.029>, doi: [10.1016/j.cca.2018.02.029](https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.02.029). [COBISS.SI-ID [6267199](#)]
35. TAKAČ, Iztok (urednik), KOZAR, Nejc (urednik). *Obravnava ženske pred in po porodu doma v ginekološki dispanzerski ambulanti : zbornik : učna delavnica za zdravnike specializante in specialiste ginekologije in porodništva, specializante in specialiste družinske medicine, specializante in specialiste urgentne medicine, zdravnike pripravnike, medicinske sestre, medicinske sestre babice, reševalce in zdravstvene administratorje, 19. 1. 2018, Medicinska fakulteta Univerze v Mariboru, Maribor, Slovenija*. Maribor: Univerzitetni klinični center, Klinika za ginekologijo in perinatologijo, 2018. 142 str., ilustr. ISBN 978-961-6909-99-0. [COBISS.SI-ID [93885697](#)]
36. TAKAČ, Iztok (urednik), KOZAR, Nejc (urednik). *Obravnava ženske pred in po porodu doma v ginekološki dispanzerski ambulanti : zbornik : učna delavnica za zdravnike specializante in specialiste ginekologije in porodništva, specializante in specialiste družinske medicine, specializante in specialiste urgentne medicine, zdravnike pripravnike, medicinske sestre, medicinske sestre babice, reševalce in zdravstvene administratorje, 19. 1. 2018, Medicinska fakulteta Univerze v Mariboru, Maribor, Slovenija*. Maribor: Univerzitetni klinični center, Klinika za ginekologijo in perinatologijo, 2018. ISBN 978-961-7039-02-3. <http://www.ukc-mb.si/>. [COBISS.SI-ID [93998337](#)]
37. KOVAČ, Vilma (urednik), RELJIČ, Milan (urednik), KOZAR, Nejc (urednik). *Šola ginekološke endokrinologije : zbornik : učna delavnica za zdravnike specializante in specialiste ginekologije in porodništva ter za vse zdravstvene delavce, ki želijo poglobiti znanje iz ginekološke endokrinologije, 16. 3. 2018, Maribor*. Maribor: Klinika za ginekologijo in perinatologijo, Univerzitetni klinični center, 2018. 108 str., ilustr. ISBN 978-961-7039-03-0. [COBISS.SI-ID [94138881](#)]
38. KOVAČ, Vilma (urednik), RELJIČ, Milan (urednik), KOZAR, Nejc (urednik). *Šola ginekološke endokrinologije : zbornik : učna delavnica za zdravnike specializante in specialiste ginekologije in porodništva ter za vse zdravstvene delavce, ki želijo poglobiti znanje iz ginekološke endokrinologije, 16. 3. 2018, Maribor*. Maribor: Klinika za ginekologijo in perinatologijo, Univerzitetni klinični center, 2018. ISBN 978-961-7039-04-7. [www.ukc-mb.si](http://www.ukc-mb.si/). [COBISS.SI-ID [94139137](#)]

Izpis bibliografskih enot: vse bibliografske enote

Izbrani format bibliografske enote: ISO 690

Razvrščanje bibliografskih enot: leto - naraščajoče, naslov

Vir bibliografskih zapisov: Vzajemna baza podatkov COBISS.SI/COBIB.SI, 29. 4. 2018

## 10.3 Mnenje komisije za medicinsko etiko



### KOMISIJA REPUBLIKE SLOVENIJE ZA MEDICINSKO ETIKO

---

Prof. dr. Iztok Takač, dr. med.  
Klinika za ginekologijo in perinatologijo, Univerzitetni klinični center Maribor  
Ljubljanska 5, 2000 Maribor

in

mag. Marko Bitenc in  
Inštitut za farmakogenomiko, genetski testi, d. o. o.  
Tehnološki park 24, 1125 Ljubljana

Štev.: 37/04/14  
Datum: 5. 5. 2014

Spoštovana gospoda prof. Takač in mag. Bitenc,

z datumom 6. 3. 2014<sup>1</sup> ste Komisiji za medicinsko etiko (KME) poslali v etično presojo predlog raziskave z naslovom:

*“Odkrivanje bioloških označevalcev s pomočjo orodij metabolomike, z namenom zgodnjega odkrivanja oblik raka pri ženskah – Metabolomic biomarker discovery for detection of early stage women’s cancers.”*

KME je vlogo obravnavala na seji 8. aprila 2014 (prilagam seznam navzočih članov). Etičnih zadržkov v vašem predlogu ni našla in vam s tem izdaja svoje soglasje za izvedbo raziskave<sup>2</sup>.

Lep pozdrav,

dr. Božidar Voljč, dr. med.,  
predsednik Komisije RS za medicinsko etiko

---

<sup>1</sup> Datum poštnega žiga: 27. 3. 2014.

<sup>2</sup> KME priporoča uporabo slovenskega jezika vsaj v osnovnih dopisih (protokol je lahko v angleščini). V privolitvenem obrazcu opustite moško slovnično obliko, saj bodo v raziskavo vključene le ženske. S tem jim izkažete tudi primernejši, osebnejši odnos.

---

Naslov:

Komisija RS za medicinsko etiko, Inštitut za klinično nevrofiziologijo, Zaloška 7, 1525 Ljubljana  
Telefon: 01/522-1509, telefaks: 01/522-1533, naslov za elektronsko pošto: [Tone.Zakelj@kclj.si](mailto:Tone.Zakelj@kclj.si)  
<http://www.kme-nmec.si/>



Republic of Slovenia  
THE NATIONAL MEDICAL ETHICS COMMITTEE

---

LIST OF MEMBERS

**Prof. Dr. Jože Balažič (M)**

MD, Deontologist, Specialist in Forensic Medicine  
Institute of Forensic Medicine  
University of Ljubljana Medical Faculty  
Korytkova 2, 1000 Ljubljana

**Prof. Dr. Matej Cimerman (M)**

MD, Surgeon  
Division of Surgery, Department of Traumatology  
University Medical Centre Ljubljana  
Zaloška 7, 1525 Ljubljana

**Assist. Prof. Dr. Roman Globokar (M)**

Theologian, Professor of Moral Theology  
University of Ljubljana, Faculty of Theology  
Štula 23, 1210 Ljubljana-Sentvid

**Dr. Urh Grošelj (M)**

MD, Paediatrician  
Department of Paediatrics  
University Medical Centre Ljubljana  
Bohoričeva 20, 1525 Ljubljana

**Prof. Dr. Matija Horvat (M)**

MD, Cardiologist, *retired*, formerly:  
Centre for Intensive Internal Medicine  
Department of Internal Medicine  
University Medical Centre Ljubljana  
Zaloška 7, 1525 Ljubljana

**Prof. Dr. Marga Kocmur (F)**

MD, Psychiatrist  
University Hospital for Psychiatry  
Studenc 48, 1260 Ljubljana Polje

**Prof. Dr. Damjan Korošec, LL.D. (M)**

Department for Criminal Law  
University of Ljubljana Faculty of Law  
Poljanski nasip 2, 1000 Ljubljana

**Prof. Dr. Borut Ošljaj (M)**

Philosopher  
Faculty of Arts  
University of Ljubljana  
Aškerčeva 2, Ljubljana

**Assoc. Prof. Dr. Tone Pačnik (M)**

Clinical Psychologist  
Centre for Mental Health  
University Hospital for Psychiatry  
Zaloška 29, 1000 Ljubljana

**Prim. Dr. Dušica Pleterski-Rigler (F)**

MD, Paediatrician, *retired*, formerly:  
Dept. for Infectious and Febrile Diseases  
University Medical Centre Ljubljana  
Japljeva 2, 1525 Ljubljana

**Prof. Dr. Pavel Poredoš (M)**

MD, Internist  
Department of Vascular Diseases  
University Medical Centre Ljubljana  
Zaloška 7, 1525 Ljubljana

**Assoc. Prof. Dr. Janez Primožič (M)**

MD, Paediatrician  
Department of Paediatric Surgery  
University Medical Centre Ljubljana  
Zaloška 7, 1525 Ljubljana

**Dr. Božidar Voljč (M)**

MD, Specialist in Family Medicine, *retired*, formerly:  
The National Institute of Transfusion Medicine  
Šlajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

**Prof. Dr. Marjeta Zorman-Terčelj (F)**

MD, MSc, Internist-Pulmologist  
Department of Pulmology and Allergy  
University Medical Centre Ljubljana  
Zaloška cesta 7, 1525 Ljubljana

**Mr. Tone Žakelj, Vice-Chair (M)**

Research and Education Secretary  
Institute of Clinical Neurophysiology  
University Medical Centre Ljubljana  
Zaloška 7, 1525 Ljubljana

*The names of those Members present on the 223<sup>rd</sup>  
NMEC session of 8<sup>th</sup> April 2014 & taking decisions on  
ethical review of research are printed in italics.*

*Five Members constitute the quorum for ethical review  
of research. None of the Members had any conflict of  
interest in the matter on which they voted.*

Signed:  
Dr. Božidar Voljč, MD,  
Chairman

---

Address for correspondence:

Republic of Slovenia Medical Ethics Committee, Institute of Clinical Neurophysiology, University Medical Centre Ljubljana  
Zaloška 7, SI-1525 Ljubljana, Slovenia

Telephone + 386 1 522 15 09, Telefax + 386 1 522 1533, E-mail: [tone.zakelj@kcli.si](mailto:tone.zakelj@kcli.si)  
URL: <http://www.kme-nmec.si/>

# 11. Delovni življenjepis kandidata



## Življenjepis

### OSEBNI PODATKI **Kozar Nejc**

📍 (Slovenija)

✉ nejc.kozar@gmail.com

♂ Spol Moški | Datum rojstva 1988 | Državljanstvo slovensko

### DELOVNE IZKUŠNJE

1. 9. 2014–v teku **Zdravnik specializant ginekologije in porodništva**  
UKC Maribor, Maribor (Slovenija)

1. 11. 2013–31. 5. 2014 **Zdravnik pripravnik**  
UKC Maribor, Maribor (Slovenija)

2008–2011 **Študent Tutor**  
Medicinska fakulteta Univerze v Mariboru, Maribor (Slovenija)

2008–2009 **Demonstrator pri študijskem procesu**  
Inštitut za anatomijo in histologijo in embriologijo, Maribor (Slovenija)  
Demonstrator pri vajah iz anatomije

### IZOBRAŽEVANJE IN USPOSABLJANJE

2013–v teku **Doktor znanosti**  
Medicinska fakulteta Univerze v Mariboru, Maribor (Slovenija)  
Podiplomski študij Biomedicinske tehnologije

2013–2014 **Osnove medicinske hipnoze in hipnoterapije**  
Društvo za Medicinsko Hipnozo Slovenije, Kranj (Slovenija)

2007–2013 **Doktor medicine**  
Medicinska fakulteta Univerze v Mariboru, Maribor (Slovenija)

15. 4. 2013–8. 8. 2013 **Erasmus praksa iz kirurgije**  
Policlinico S.Orsola-Malpighi, Università degli studi di Bologna, Bologna (Italija)

27. 8. 2012–31. 8. 2012 **Poletna šola s področja kardiovaskularnih bolezni**  
Koc University School of Medicine, Istanbul (Turčija)

17. 7. 2011–31. 7. 2011 **Poletna šola kirurgije (International Surgery Summer School)**  
Universitas Medicinae et Pharmaciae Gr. T. Popa Iassiensis, Iasi (Romunija)

2005–2007 **Mednarodna matura**  
II. gimnazija Maribor, Maribor (Slovenija)





- 2003–2005 **Splošna gimnazija**  
II. gimnazija Maribor, Maribor (Slovenija)
- 1995–2003 **Osnovna šola**  
Osnovna šola Janka Glazerja Ruše, Ruše (Slovenija)

## 12. Izjava o avtorstvu in istovetnosti tiskane in elektronske oblike doktorske disertacije

### **PRILOGA 4: IZJAVA O AVTORSTVU IN ISTOVETNOSTI TISKANE IN ELEKTRONSKE OBLIKE DOKTORSKE DISERTACIJE**

**UNIVERZA V MARIBORU  
MEDICINSKA FAKULTETA**

#### **IZJAVA O AVTORSTVU IN ISTOVETNOSTI TISKANE IN ELEKTRONSKE OBLIKE DOKTORSKE DISERTACIJE**

Ime in priimek študenta/-ke: Nejc Kozar, dr. med.

Študijski program: Medicinska biotehnologija

Naslov doktorske disertacije: Odkrivanje bioloških označevalcev s pomočjo orodij metabolomike, z namenom zgodnjega odkrivanja oblik raka pri ženskah

Mentor/-ica: Prof. dr. Iztok Takač, dr. med., svetnik

Somentor/-ica: /

Podpisani/-a študent/-ka Nejc Kozar

- izjavljam, da je zaključno delo rezultat mojega znanstvenoraziskovalnega dela;
- izjavljam, da sem pridobil/-a vsa potrebna soglasja za uporabo podatkov in avtorskih del v zaključnem delu in jih v zaključnem delu jasno in ustrezno označil/-a;
- na Univerzo v Mariboru neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki, pravico reproduciranja ter pravico ponuditi zaključno delo javnosti na svetovnem spletu preko DKUM in drugih informacijskih zbirk in ponudnikov; sem seznanjen/-a, da bodo dela deponirana/objavljena v DKUM dostopna široki javnosti pod pogoji licence Creative Commons BY-NC-D, kar vključuje tudi avtomatizirano indeksiranje preko spleta in obdelavo besedil za potrebe tekstovnega in podatkovnega rudarjenja in ekstrakcije znanja iz vsebin; uporabnikom se dovoli reproduciranje brez predelave avtorskega dela, distribuiranje, dajanje v najem in priobčitev javnosti samega izvirnega avtorskega dela, in sicer pod pogojem, da navedejo avtorja in da ne gre za komercialno uporabo;
- dovoljujem objavo svojih osebnih podatkov, ki so navedeni v zaključnem delu in tej izjavi, skupaj z objavo zaključnega dela;
- izjavljam, da je tiskana oblika zaključnega dela istovetna elektronski obliki zaključnega dela, ki sem jo oddal/-a za objavo v DKUM;
- izjavljam, da sem seznanjen s pogoji Proquest-a za oddajo in javno objavo doktorske disertacije v podatkovno zbirko ProQuest Dissertations & Theses Global (<http://contentz.mkt5049.com/lp/43888/382619/PQDTauthoragreement.pdf>).

Uveljavljam permisivnejšo obliko licence Creative Commons: \_\_\_\_\_ (navedite obliko)

Začasna nedostopnost:

Zaključno delo zaradi zagotavljanja konkurenčne prednosti, zaščite poslovnih skrivnosti, varnosti ljudi in narave, varstva industrijske lastnine ali tajnosti podatkov naročnika: \_\_\_\_\_ (naziv in naslov naročnika/institucije) ne sme biti javno dostopno do \_\_\_\_\_ (datum odloga javne objave ne sme biti daljši od 3 let od zagovora dela). To se nanaša na tiskano in elektronsko obliko zaključnega dela.

Temporary unavailability:

To ensure competitive advantage, protection of business secrets, safety of persons and nature, protection of industrial property, or confidentiality of information of the client \_\_\_\_\_ (client/institution name and address) the thesis shall not be accessible to the public until \_\_\_\_\_ (the deferment of public availability shall not exceed 3 years from the date of the thesis defense). This applies to printed and electronic thesis forms.

Kraj in datum: Maribor, 19.11.18 Podpis študenta/-ke: \_\_\_\_\_

Podpis mentorja/-ice: \_\_\_\_\_ (samo v primeru, če delo ne sme biti javno dostopno)

Ime in priimek ter podpis odgovorne osebe naročnika in žig: \_\_\_\_\_ (samo v primeru, če delo ne sme biti javno dostopno)