

PROTEINA HE4 (HUMAN EPIDIDYMIS PROTEIN 4), NJË BIOSHËNJUES ME VLERË NË MONITORIMIN E KANCERIT TË VEZOREVE

QIRINXHI XH., MITRE A.

Universiteti i Tiranës, Fakulteti i Shkencave të Natyrës, Departamenti i Biologjisë

e-mail: xhuliana.qirinxhi@fshn.student.info

Përmbledhje

Në vendet në zhvillim, kanceri i ovarit mbetet edhe sot sëmundja me koeficientin më të lartë të vdekjeve krahasuar me të gjithë sëmundjet e tjera gjinekologjike malinje. Për më tepër se 25 vjet, antigeni kanceroz CA 125 është përdorur si biomarker standard për diagnostifikimin dhe menaxhimin e femrave me kancer epitelial të ovareve. Sensitiviteti për CA 125 në kancerin epitelial të ovareve është i lidhur me stadin e tumorit, dhe nivele jo normale të CA 125 serike mundet gjithashtu të gjenden në disa sëmundje beninje. Ka lindur nevoja për shenjues me sensitivitet dhe specifitet më të mirë dhe disa biomarkerë të rinj janë zbuluar dhe janë duke u vlerësuar. Në mes të një numri të madh biomarkerësh (HE4), një proteazë e sekretuar në serum është aprovuar kohët e fundit për monitorimin e kancerit epitelial të ovarit. Qëllimi i studimit është të tregojmë që HE4 është shenjues me vlerë në identifikimin e kancerit të ovarit edhe në stadin e hershëm. Në këtë studim janë marrë 265 individë, nga të cilët 179 individë janë individë normalë dhe 86 individë janë të sëmurë me sëmundje beninje dhe malinje të vezoreve të ndarë në tre grupe, sëmundje beninje të ovareve, malinj stadi i parë, malinj stadi i avancuar. Nga analiza dhe përpunimi statistikor i rezultateve tona mund të themi, që HE4 nuk është një shenjues ideal në monitorimin e kancerit të vezores, por një shenjues me sensitivitet dhe specifitet të mirë, si në stadin fillestar ashtu edhe në atë të avancuar të sëmundjes, duke shfaqur epërsi ndaj shenjuesit tradicional Ca125.

Abstract

In developing countries, ovarian cancer is still even today the disease with the highest coefficient of deaths compared with the all the others malignant gynecological diseases. For more than 25 years, cancer antigen 125 (CA 125) has been the criterion standard biomarker for the diagnosis and management of women with epithelial ovarian cancer. Sensitivity of CA 125 in ovarian cancer is related to tumour stage, and abnormal CA 125 serum levels may be also found in several benign diseases. There is a need for additional markers to improve sensitivity with retained or better specificity, and many new biomarkers have been introduced and continue to be evaluated. Among a wide spectrum of biomarkers, the human epididymis protein 4 (HE4), a protease that is secreted into serum, has recently been approved, for monitoring epithelial ovarian cancer. The purpose of the study is to show that HE4 is a valuable marker in identifying ovarian cancer even in the earliest stages. In this study were 265 individuals of whom 179 are normal individuals and 86 individuals are sick with benign and malignant disease of the ovaries, divided into three groups, benign ovarian disease, malignant first stage, advanced stage malignant. From the analysis and statistical processing of our results we can say that HE4 is not a ideal marker in the monitoring of ovarian cancer, but a marker with good sensitivity and specificity, as in the initial stage as well as in advanced disease, featuring superior to traditional marker Ca125.

Fjalëkyçe: HE4, kanceri i ovarit, shenjues biologjik, stad i hershëm.

Hyrje

Në botë gjatë një viti ka rreth 204 000 persona të diagnostikuar me kancer të ovareve dhe rreth 125,000 vdekje të shkaktuara prej tij. Në vendet në zhvillim, kanceri i ovarit mbetet edhe sot sëmundja me koeficientin më të lartë të vdekjeve krahasuar me të gjithë sëmundjet e tjera gjinekologjike malinje. Një nga arsyet, që koeficienti i vdekjeve nga kjo sëmundje është shumë i lartë, është edhe kultura e ulët e kontrollit të vazhdueshëm, e cila mundëson diagnostikimin e sëmundjes në fazat e hershme të saj. Në vendet në zhvillim mbi 70 % e femrave me karcinomë ovariane diagnostikohen në stadin e avancuar, ku edhe mundësitë për ndërhyrje të suksesshme janë shumë të kufizuara. Sot është provuar shkencërisht se ka një korrelacion shumë të mirë midis stadi të hershëm të diagnostikimit dhe mundësisë të kurimit të sëmundjes dhe rritje të probabilitetit të kurimit të saj (Rauh-Hain *et al.* 2011).

Simptomat e kancerit të vezores janë zakonisht jospecifike, sidomos gjatë stadeve fillestare të sëmundjes. Për të diagnostikuar pacientët me këtë diagnozë përdoret ekografia, e cila ka specificitet të ulët (Valentin *et al.* 2004). Për më tepër se 25 vjet, antigeni kanceroz CA 125 është përdorur si biomarker standard për diagnostifikimin dhe menaxhimin e femrave me kancer epithelial të ovareve (2). Sensitiviteti për CA 125 në kancerin epithelial të ovareve është i lidhur me stadin e tumorit (5,6), dhe nivele jo normale të CA 125 serike mundet gjithashtu të gjenden në disa sëmundje beninje (6). Ka lindur nevoja për shenjues me sensitivitet dhe specifitet më të mirë dhe disa biomarkerë të rinj janë zbuluar dhe janë duke u vlerësuar. Në mes të një numëri të madh biomarkerësh (HE4), një proteazë e sekretuar në serum është aprovuar kohët e fundit për monitorimin e kancerit epithelial të ovarit.

Në këtë studim, ne kemi pasur si qëllim të tregojmë që HE4 është shenjues me vlerë në identifikimin e kancerit të vezores. Proteina humane epididimale 4 (HE4), është shenjues i ri për karcinomën ovariane, i cili është produkt i gjenit *WFDC2 (HE4)* (Ono., 2000). HE4 i takon familjes proteinike të “whey acedid four-disulfide core” (WFDC) (Bingle, 2002). HE4 arrin vlera të ulta në epitelin e indeve frymëmarrës dhe riprodhues, përfshirë këtu edhe indin epithelial të vezoreve, ndërkohë që në rastin e shndërrimeve kancerogjene të vezoreve arrin vlera shumë të larta (Hellstrom, 2003). Në serumin e pacientëve me kancer të vezores shihet se kemi një rritje të ndjeshme të sasisë së HE4-s, për këtë matja e nivelit serik të HE4 pritet të ndihmojë në uljen e riskut të kancerit ovarian epithelial me anë të diagnostikimit më të shpejtë të tij, (Kirchoff, 1998).

Niveli i HE4, korrelohet me përgjigjen klinike ndaj terapisë ose dhe me nivelin e sëmundshmërisë (fazën) në rastet e pacientëve të diagnostikuar me kancer

të vezores. Këto të dhëna përkojnë edhe me të dhënat e përfituara nëpërmjet ekografisë (imazheria CT). Në të tilla kushte HE4 mund të jetë një tregues shumë i mirë i stadit dhe gjendjes së sëmundshëmrisë, që në fazat më të hershme të saj duke rritur kështu probabilitetin e uljes së riskut të humbjes së jetës (Anastasi, 2010).

Materiali dhe metodat

Në këtë studim gjatë periudhës 2012-2014 janë përzgjedhur për t'u analizuar 265 paciente femra nga të cilat 179 në gjendje normale dhe 86 me sëmundje beninje dhe malinje të vezoreve. Individët e marrë në studim kanë qenë pacientë dhe vullnetarë të testuar dhe kontrolluar në Spitalin Onkologjik në QSUT "Nënë Tereza" Tiranë dhe në Spitalin Gjinekologjik "Mbretëresha Geraldinë" po në Tiranë.

Kriteret përzgjedhëse të kampionit në studim ishin: vullnetarizmi për plotësimin e të gjithë testeve klinike dhe marrëveshja për të bërë teste klinike të mëtejshme për diagnostikim histologjik dhe klinik. Kriteret përjashtuese për përzgjedhjen e kampionit ishin: shtatzania, sëmundjet infektive si dhe sëmundjet kronike të mëlçisë dhe veshkave (Elham, 2013).

Serumet e testuara janë marrë prej individëve vullnetarë të përfshirë në studim, pas sqarimit të tyre për studimin në fjalë dhe plotësimin të një formulari, të firmosur në marrëveshjeje me ta, ku sigurohet anonimiteti dhe përdorimi i të dhënave vetëm për qëllime shkencore.

Për testimin e përmbajtjes serologjike të këtyre individëve janë përdorur në marrëveshje strukturat e klinikës mjekësore "Intermedika" në Tiranë, ku është realizuar edhe matja e vlerave të HE4 në serumet e pacientëve në studim.

Në këtë studim kampioni normal përbëhet nga 179 individë femra normale, por me risk bazuar, në historitë e tyre familjare (rekomandimi për përzgjedhjen e këtij grupi është bërë nga mjeku gjinekolog ose onkolog. Këta individë janë testuar përveç analizave serologjike edhe përmes i ekzaminimeve të tjera, si imazherisë. Është bërë kujdes, që individët e zgjedhur të kenë shpërndarje moshe nga 20-70 vjeç.

Gjaku është marrë në venë, është lënë të koagulojë për 20 minuta në temperaturë dhome dhe pastaj i është nënshtruar centrifugimit me 3200 rrotullime në minutë. Testet serologjike të funksioneve të mëlçisë dhe veshkave janë kryer për të gjithë pacientët në studim në aparaturën Cobas c 6000 (Roche/Hitachi Cobas C systems) (Elham, 2013).

Vlerat e pritura

Bazuar në të dhënat e literaturës vlera prag e shënjesit HE4 është 150 pmol/l (Elham, 2013).

Rezultatet e marra janë përmbledhur në tabela dhe pas sistemimit të tyre është kryer përpunimi statistikor. Të dhënat në këtë punim janë të

prezantuara si mesatare±devijimin standard (SD). Marrëdhëniet lineare midis variablave janë përcaktuar, duke përdorur testing e korrelacionit Spearman.

Analiza ROCu realizua për të treguar vlerën diagnostike të parametrin He4 të nxjerrë grafikisht nga krahasimi i ndjeshmërisë me specificitetin duke përdorur intervale me 95% besueshmëri. Sinjifikanca statistikore është një vlerë $P < 0.05$. Të gjitha analizat statistikore u realizuan duke përdorur programin SPSS, versioni 18.0. Analiza e variancës ANOVA u përdor për të vlerësuar diferencat e shprehjes së markerit He4, për femrat e marra në studim mbi dhe nën nivelin limit të poshtëm (150 pmol/l).

Rezultate dhe diskutimet

Në këtë studim janë marrë 265 individë nga të cilët 179 individë janë individë normalë dhe 86 individë janë të sëmurë me sëmundje beninje dhe malinje të vezoreve të ndarë në tre grupe, sëmundje beninje të ovareve, malinj stadi i parë, malinj stad i avancuar.

Tek individët normalë (të pasëmurë) u gjet ,që në 6 prej tyre shenjuesi HE4 kishte vlera të larta (përkatësisht nga 150pmol/l-197,6pmol/l →vlera prag 150pmol/l).

Në grupin e pacientëve me sëmundje beninje asnjë individ nuk pati rritje të HE4 mbi pragon. Përsa i përket HE4 rezulton vlera e saj nuk e kalon pragon në këtë grup, pasi në shumicën e rasteve problemet beninje kanë të bëjnë me praninë e kisteve.

Sa i takon stadi të parë të sëmundjes u regjistruan 8 persona me vlera të larta të HE4 (përkatësisht: 153,1pmol/l; 163,1pmol/l; 200,2pmol/l; 174,4pmol/l; 150pmol/l; 156pmol/l; 156,7pmol/l; 192pmol/l→vlera prag 150pmol/l). Në fakt vëmë re, se në 4 nga rastet në studim brënda këtij grupi HE4 është nën nivelin e pragut, pavarësisht nga diagnoza mjeksore e përcaktuar nga mjeku dhe e konfirmuar nga imazheria.

Grupi i tretë i përket individëve me stad të avancuar sëmundje (përcaktuar klinikisht si i tillë), përbëhet nga 27 persona. 23 individët e tjerë të këtij grupi u gjetën që e kalonin pragon për shenjuesin, që tregon se në fazën e avancuar shenjuesi korrelohet mirë me stadin.

Më poshtë paraqitet përpunimi statistikor i rezultateve të këtij punimi. Përpunimi statistikor i të dhënave ka pasur për qëllim të zbulojë lidhjet midis parametrin të matur, sinjifikancës dhe ndjeshmërisë së tij në zbulimin e kancerit të vezores. Para fillimit të përpunimit statistikor është bërë dallimi midis vlerave të matura dhe vlerës prag për shenjuesin. Me marrëveshje të gjithë individët tek të cilët vlera e matur nuk e kalon vlerën e pragut janë shënuar me “0” ndërsa individët tek të cilët vlera e matur e kalon vlerën e pragut janë shënuar me “1”.

Statistika deskriptive							
	Numri i vëzhgimeve	Minimumi	Maksimumi	Mesatarja	Devijimi standart	Mediana	Moda
HE 4	265	12,60	335,60	78,1449	55,78533	52,8800	43,88

Tabela 1. Tabela paraqet vlerat minimale, maksimale, mesataren dhe devijimin standard për bioshënjesim e marrë në analizë: HE4.

Nga të dhënat e tabelës 1 rezultoi që niveli mesatar i HE4 për grupin në studim ishte 78,14pmol/l (DS = +/-55,7) me një interval nga 12,60pmol/l-335,6pmol/l. Vlera me shpeshësinë më të madhe ose Moda për shenjusin HE4 është 43pmol/l.

Në tabelën 2 tregohen vlerat e shpërndarjes së frekuencave për grupet e marra në studim sipas gjendjes së tyre shëndetësore. Në studimin tonë ku janë përfshirë 265 femra shohim se kampioni përbëhet nga 33 femra, që kanë sëmundje beninje, 179 femra normale, të paprekura nga sëmundja, ndërsa pjesa tjetër e femrave ndodhen në stadin e parë dhe të avancuar të sëmundjes përkatësisht 26 dhe 27. Duke i shprehur këto shifra në % mund të themi se 12,5% e kampionit ka sëmundje beninje, 67,5% gëzojnë shëndet të plotë 9.1% ndodhen në stadin e parë të sëmundjes dhe 10.2 % e femrave të analizuar gjenden në stadin e avancuar të sëmundjes.

	Frekuenca	Përqindja	Përqindja kumulative
B	33	12,5	12,5
N	179	67,5	80,0
st1	26	9,8	89,8
Sta	27	10,2	100,0
Total	265	100,0	

Tabela 2. Shpërndarja e frekuencave për variablin stad i sëmundjes

Analiza e variancës ANOVA u përdor për të vlerësuar diferencat e shprehjes së shënjesit He4, për femrat e marra në studim mbi dhe nën nivelin limit të poshtëm (150 pmol/l). Nga vlerat e marra të paraqitura në tabelën 3 ne arrijmë në përfundimin, se ekzistojnë statistika ndarëse të rëndësishme midis mesatareve të vlerave të He4 për të dy grupet e krijuar normal dhe të sëmurë. ($F_{1,263}=972,568;p<0,0005$).

ANOVA
HE4/150

	Shuma e katroreve	Shkallet e lirisë	Mesatarja kuadratike	Vlera faktike e Fisherit	Sinjifikanca
Midis grupeve	646691,734	1	646691,734	972,568	<0,0005
Brenda grupeve	174877,186	263	664,932		
Totali	821568,920	264			

Tabela 3. Rezultatet e analizës statistikore ANOVA për shenjuesin HE4

Për të parë specificitetin dhe ndjeshmërinë e parametrin të analizuar HE4 u përdor edhe metoda statistikore ROC. Vlerat e sensitivitetit dhe specificitetit të HE4 u krahasuan me ato të shenjuesit tradicional CA125 të matura në të njëjtët pacientë. Në këtë përpunim janë përfshirë vetëm individët e klasifikuar në stadin fillestar dhe atë të avancuar të sëmundjes.

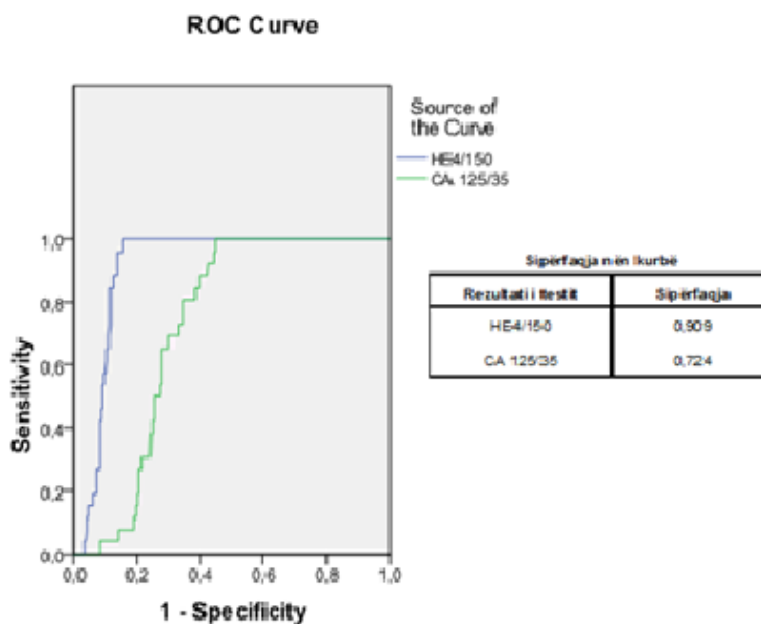


Figura 1. Kurba ROC e vlerave të HE4 dhe CA125 në stadin fillestar të sëmundjes.

Në rastin e individëve në stadin fillestar të sëmundjes, duket edhe vizualisht se vlerat e sipërfaqes, që kufizon kurba e vlerave të HE4 është më e madhe se ajo e kufizuar nga CA125. Përmasat e kësaj sipërfaqje tregojnë që në këtë grup shenjuesi HE4 është më i ndjeshëm se CA125. Vlerat e ndjeshmërisë dhe specificitetit për këtë grup janë për HE4 dhe CA125 përkatësisht: 91% dhe 72.4%.

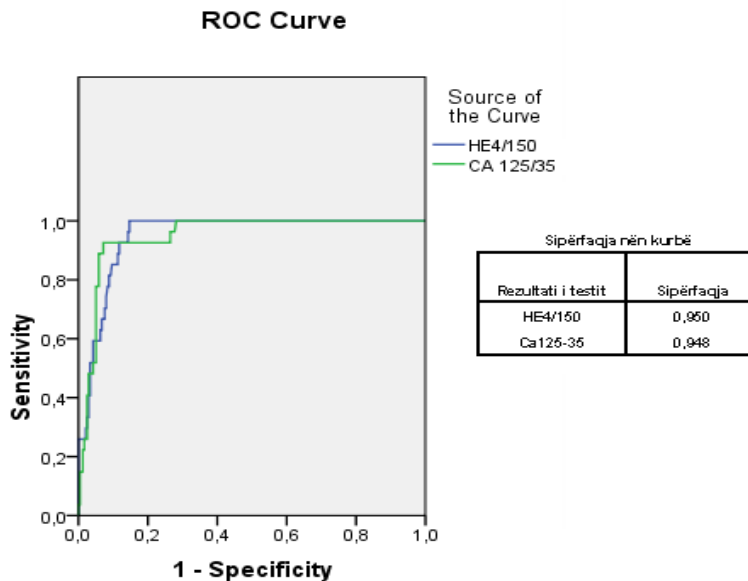


Figura 2. Kurba ROC e vlerave të HE4 dhe CA125 në stadin e avancuar të sëmundjes

Në rastin e individëve me stad të avancuar të sëmundjes (Fig.2) sensitiviteti dhe specifiteti i HE4 janë edhe më të larta se në stadin fillestar të sëmundjes. Sipërfaqja e kufizuar nga kurba ROC përfshin rreth 95% dhe është e përafërt me atë të CA125 rreth 94.8%. Nga sa më sipër mund të themi se He4 nuk është një shënjes ideal në monitorimin e kancerit të vezores, por një shënjes me sensitivitet dhe specifitet të mirë. Nivele të HE4, nuk gjenden vetëm në tumore të vezoreve, por gjithashtu në tumore malinj të endometrit, kancerin e mushkërive etj (Moore, 2008). kanë treguar se shprehja e HE4 shkon në marrëdhënie të drejtë me stadin e tumorit. Studimet mbi nivelin e shprehjes së HE4 serike kanë treguar se ndjeshmëria dhe specifiteti i HE4 është më i mirë se Ca125 (shënjesi tradicional) dhe të dy shënjesit janë komplementarë (Molina, 2009). Rezultatet tona konfirmojnë këto studime dhe tregojnë qartë se përdorimi i HE4 mund të jetë i rëndësishëm në diagnozën diferenciale të kancerit të ovareve, edhe në stadet fillestare të tij.

Literatura

Anastasi E., Marchei G. G., Viggiani V., Gennarini P., *et al.* (2010): HE4 a new potential early biomarker for the recurrence of ovarian cancer. *Tumor Biol.*, nr. 31: 113-119; Alberts B. (2008): *Molecular Biology of the cell*

Bast R. C., Klug T. L., St. John E., *et al.* (1983): A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *Nat.Eng. J. Med.*, nr. 309: 883-887

Bingle L., Singleton V., Bingle CD., (2002): The putative ovarian tumor markers gene HE4 (ĖFDC2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alterative splicing to yield multiple protein isoforms. *Oncogene*, nr. 21: 2768-2773

Chang X Human epididymis protein 4 (HE4) as a serum tumor biomarker in patients with ovarian carcinoma

Drapkin R., von Horsten H. H., Lin Y, *et al.* (2005): Human protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometriosis ovarian carcinomas. *Cancer Res.*, nr. 65: 2162-2169

Drapkin R., Von Horsten H. H., Lin Y. (2005): Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res.*, nr. 65:2162-2169

Elham O. H.,Hydi A.,Osama B. S.,Abeer M. M., Ali A. A.,Hazem M. A. G., (2013): Significance of HE4 estimation in comparison with CA125 in diagnosis of ovarian cancer and assessment of treatment response. *Diagnostic Pathology*, nr.8:11 doi:10.1186/1746-1596-8-11; FIGO Cancer Committee. (1986): Staging announcement. *GynecologicOncology*, nr. 25:383-385

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

Huhtinen K., *et al.* (2009): Serum HE4 concentration differentiates malignant ovarian tumors from ovarian endometriosis cysts. *British J. Cancer*, nr. 100: 1315-1319; Hanahan D., Weinberg R. A. (2000): The hallmarks of cancer, nr. 100: 57-70

Hellstrom I., Raycraft J., Hayden-Ledbetter M., *et al.* (2003): The HE4 (EFDC) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res.*, nr. 63: 3695-3700

Kirchhoff C., *et al.* (1998): Molecular characterization of epididymal proteins. *Rev. Reprod.*, nr. 3: 86-95

Molina R., Jose M Escudero (2009): HE4 a novel tumour marker for ovarian cancer: comparison with CA 125 and ROMA algorithm in patients with gynaecological diseases Moore RG, Brown AK, Miller MC

Moore R. G.,*et al.*(2008): A novel multiple marker bioassays utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecologic Oncology*, nr.108:402-408

Ono K., Tanaka T., Tsunoda T., *et al.* (2000): identification by cDNA microarray of genes involved in ovarian carcinogenesis. *Cancer Res.* Nr. 60: 5007-5011

Rauh-Hain, Krivak T C, Carmen M G, (2011): AB Ovarian cancer screening and early detection in general population. *Rev Obstet Gynecol*, nr.4 (1): 15-21

Ruggeri G., Bandiera E., Zanotti L., Belloli S., Ravaggi A. (2011): HE4 and epithelial ovarian cancer: comparison and clinical evaluation of two immunoassays and a combination algorithm. *Clin Chim Acta*, nr. 412: 1447-1453

The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol.* 2008;108: 402-408

Ingegerd Hellstrom, Karl Erik Hellstrom SMRP and HE4 as Biomarkers for Ovarian Carcinoma Used Alone and in Combination with CA125 and/or Each Other. *Gyneacol Oncol.* 2013 130 (3) 629-633

Valentin L., (2004): Use of morphology to characterize and manage common adnexal masses. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, nr. 18: 71-89