

VODIČI I PREPORUKE ZA KLINIČKU PRIMENU TUMORSKIH MARKERA

Marijana Dajak

Institut za medicinsku biohemiju, Klinički centar Srbije, Beograd

Kratak sadržaj: U toku poslednjih dvadeset godina predstavljeni su brojni tumorski markeri, ali za većinu od njih specifična klinička primena je ograničena i samo mali broj markera je odobren za kliničku primenu od strane zdravstvenih organizacije. U ovom radu dat je pregled konsenzus preporuka koje su sačinili Nacionalna akademija za kliničku biohemiju (NACB) u Sjedinjenim Američkim Državama i Evropska grupa za tumorske markere (EGTM). Pristup obe ove grupe je sličan, svaka grupa razmatra odgovarajuću upotrebu tumorskih markera za specifični tip raka. Aktuelni vodiči koje su razvile ove radne grupe odnose se na sledeće: zahteve kvaliteta i kontrole, karcinom dojke, ginekološke karcinome, karcinom prostate, kolorektalni karcinom, neuroendokrine tumore, tumore seminalnih ćelija, monoklonalne gamopatije i karcinom pluća.

Ključne reči: CA15-3, HER-2/neu onkoprotein, CA125, CEA, hCG, CYFRA21.1, kalcitonin, AFP, PALP, NSE

Uvod

Poslednjih dvadeset godina definicija tumorskog markera značajno se razvija kao rezultat napredovanja u tehnologiji i stalno se obnavlja od strane stručnih organizacija. Generalno, tumorski marker je molekul koji se stvara u organizmu i može da se meri u serumu, plazmi ili drugim telesnim tečnostima ili u ekstraktima tkiva da bi se dopunilo i unapredilo kliničko praćenje malignih bolesti.

Pošto se većina tumorskih markera meri imunohemijskim tehnikama, mora se voditi računa o brojnim pre- i postanalitičkim faktorima. Zajednička obaveza kliničara i specijaliste laboratorijske medicine je da detaljno izvrše evaluaciju reagenasa, preporuče referentne intervale i utvrde kliničku korist primene tumorskog markera u dijagnozi, terapijskom praćenju ili proceni prognoze maligne bolesti.

U ovom radu dat je pregled konsenzus preporuka za primenu tumorskih markera, predloženih od strane Nacionalne akademije za kliničku biohemiju (NACB, *National Academy of Clinical Biochemistry*) u Sjedinjenim Američkim Državama i Evropske grupe za tumorske markere (EGTM, *European Group on Tumor Markers*). Pristup obe ove grupe je sličan. Svaka grupa razmatra odgovarajuću upotrebu tumorskih markera za specifični tip raka (1). Aktuelne preporuke koje su razvile ove radne grupe se odnose na sledeće oblasti:

1. zahtevi kvaliteta i kontrola (EGTM)
2. karcinom dojke (NACB, EGTM)
3. ginekološki karcinomi (NACB, EGTM)
4. karcinom prostate (NACB, EGTM)
5. kolorektalni karcinom (NACB, EGTM)
6. neuroendokrini tumori (NACB)
7. tumori seminalnih ćelija (NACB, EGTM)
8. monoklonalne gamopatije (NACB)
9. karcinom pluća (EGTM).

Na nivou naše zemlje takođe postoji Radna grupa za maligne bolesti koja je 2002. godine izdala Nacionalni vodič kliničke prakse za karcinom dojke, pluća, kolorektuma, testisa i ovarijuma (2).

Zahtevi kvaliteta i kontrola

Kvalitet krajnjeg rezultata merenja tumorskog markera odražavaće sve događaje nastale u toku preanalitičke, analitičke i postanalitičke faze. Potrebno je naglasiti da će pogrešan rezultat tumorskog markera (naročito kada je lažno povišen) više uznemiriti pacijenta nego većina drugih laboratorijskih testova. Prema tome glavna odgovornost je na laboratoriji da odezbedi tačan rezultat, kao i da blagovremeno dostavi kliničarima raspoložive informacije važne za specifični test; npr. izbegavanje merenja prostata speci-

fičnog antigena kod pacijenata s prostatitisom ili CA125 za vreme menstrualnog ciklusa.

Zadovoljavajuće merenje bilo kog analita zahteva ispravan i odgovarajući uzorak koji se analizira metodom za koju su definisani zahtevi za unutrašnju (IQC, *Internal Quality Control*) i spoljašnju kontrolu (EQA, *External Quality Assessment*) kvaliteta. Osnovni zahtevi za IQC i EQA opisani su u *tabeli I*.

Laboratorija mora takođe biti svesna analitičkih interferencija specifičnih za određeni parametar. U *tabeli II* prikazana su tri najvažnija potencijalna uzroka netačnog rezultata tumorskog markera.

Napredak u automatizaciji je značajno povećao analitičku pouzdanost većine najčešće korišćenih tu-

morskih markera, što je omogućilo da pažnja bude više usmerena na to kako da se postigne najefektivnija klinička upotreba ovih važnih testova. Kratak pregled preporuka EGTM grupe za događaje u postanalitičkoj fazi prikazan je u *tabelama III i IV*.

U toku sprovođenja spoljašnje kontrole kvaliteta od učesnika se može tražiti da izvrše kliničku interpretaciju dobijenih kontrolnih rezultata. Pojedine, na ovaj način sprovedene, ankete identifikovale su potrebu za poboljšanjem konsenzusa za odgovarajuće vreme merenja tumorskog markera, što je značajno promenilo vrednost referentnih opsega (4). Ovakve ankete mogu povećati edukacionu vrednost EQA, olakšati poređenje između laboratorija i poboljšati »tačnost« konsenzus vrednosti.

Tabela I Analitička razmatranja o važnosti kontrole kvaliteta kod tumorskih markera

Zahtevi unutrašnje kontrole kvaliteta	
Procena reproducibilnosti	Poželjna varijabilnost unutar određivanja <5%, a između određivanja <10%; manuelno i/ili istraživačko određivanje može biti manje precizno; kriterijumi za željenu preciznost određivanja mogu se alternativno zasnivati na biološkoj varijaciji.
Ustanovljeni kriterijum za prihvatanje određivanja	Izbor odgovarajućeg kriterijuma za prihvatljivost IQC, poželjno je da se zasniva na logičnom kriterijumu.
Kontrolni uzorci blisko odražavaju autentični serum pacijenta	Uopšteno, nije poželjno oslanjati se isključivo na kontrolnom materijalu koji je dat u sklopu testa; trebalo bi koristiti i kontrolu sa autentičnim serumskim matriksom iz nezavisnog izvora.
Koncentracije u kontrolnom uzorku treba da odgovaraju kliničkoj primeni	Negativna i niska pozitivna kontrola treba da se koristi za sve tumorske markere, ali takođe postoji potreba i za širim koncentracionim opsegom, kao i za procenu tačnosti dilucionih etapa kod uzorka s visokim koncentracijama.
Procena interferencija u toku određivanja	Poželjna je povremena provera mogućih interferencija (npr. od heterofilnih i dr. antitela, od aditiva u vakutajnerima i dr.).
Zahtevi spoljašnje kontrole kvaliteta	
EQA uzorak sa odgovarajućom koncentracijom analita	Koncentracije koje pokrivaju radni opseg određivanja; povremeno treba uključiti i više koncentracije da bi se proverilo ponašanje pri razblaživanju uzorka; za neke analite (npr. AFP, hCG) je važno koristiti i normalni serum radi provere bazalnih vrednosti.
Procena »stabilnosti« određivanja	Procena »stabilnosti« rezultata unutar laboratorije može postići ponovljenim merenjem uzoraka istog <i>pool-a</i> i poređenjem rezultata tokom vremena (npr. 6–12 meseci).
Utvrdjivanje tačnosti i stabilnosti ciljnih vrednosti	Ovo su obično konsenzus srednje vrednosti, pošto ne postoje raspoložive referentne metode za ove analite. Validnost konsenzus vrednosti trebalo bi dokazati procenom njihove: <ol style="list-style-type: none"> 1. stabilnosti, ponovljenom distribucijom istog <i>pool-a</i> 2. tačnosti, sa <i>recovery</i> testom, gde se koriste <i>pool-ovi</i> sa poznatom količinom podesnog internacionalnog standarda (IS). Ovakva validacija je moguća za AFP, hCG, CEA i PSA za koje postoje trenutno prihvaćeni IS (BS 72/225, IS 75/537, IRP 63/601 i IS 96/670).
Interpretaciona praksa	Ona obezbeđuje dragocena sredstva (npr. referentni intervali) za poređenja rezultata iz različitih laboratorija.

Tabela iz konsenzus preporuka EGTM grupe (3).

Tabela II Potencijalni uzroci netačnog rezultata tumorskog markera

Efekat prozona kod visokih koncentracija	Protokoli za identifikaciju ovog efekta su neophodni kako bi se izbeglo pogrešno izdavanje niskog rezultata, naročito kod pacijenata gde se tumorski markeri određuju prvi put. Prozonski efekti se mogu smanjiti korišćenjem antitela u čvrstoj fazi ili većeg vezujućeg kapaciteta, određivanjem uzorka u dva različita razblaženja, ili korišćenjem određivanja u sekvencama koje uključuju ispiranje (<i>wash step</i>).
<i>Carry-over</i> uzorka	Potencijalni problem kad god se određuje uzorak jako visoke koncentracije, tako da se to mora povremeno proveriti.
Interferencija od strane heterofilnih antitela ili humanih anti-mišjih antitela (HAMA)	Lažno povišeni ili sniženi rezultati se mogu dobiti kod uzoraka pacijenata koji sadrže anti-IgG antitela sposobna da reaguju sa antitelima koja se koriste u određivanju. Kod pacijenata pod tretmanom koji koriste mišja monoklonalna antitela za terapijske svrhe ili imidžing procedure, prisutna su HAMA koja mogu dovesti do netačnog rezultata. Ovakve interferencije mogu se otkriti ponovnim određivanjem uzorka posle tretmana s blokirajućim agensom (imobilizovan na epruvetama), dodatkom ne-imuno mišjeg seruma reakcionoj smeši, ili ponovnim određivanjem uzorka drugom metodom.

Tabela iz konsenzus preporuka EGTM grupe (3).

Tabela III Važni postanalitički zahtevi za primenu tumorskih markera

Klinička informacija od strane ordinirajućeg doktora	Podsticanje kliničara da daju kratke kliničke informacije (npr. »postoperativno«, »posle hemoterapije«) je od velike važnosti kod bilo koje interpretacije, a to može pomoći i da se identifikuju slučajne laboratorijske greške.
Upotrebljivost odgovarajućih referentnih opsega	Pre početnog tretmana pacijenta važno je poznavati referenti opseg tumorskog markera koji je dobijen iz odgovarajuće zdrave populacije. Takođe, pacijentova bazalna vrednost je najvažniji podatak za interpretaciju tumorskog markera. Ako je ovo dobro utvrđeno, porast čak i u okviru referentnog opsega može biti klinički značajan.
Prepoznavanje značajnih ili klinički važnih promena	Treba uzeti u obzir i biološku i analitičku varijaciju. Povećanje ili sniženje vrednosti markera od $\pm 25\%$ često se smatra da je od kliničkog značaja, ali potrebna su dalja ispitivanja u ovom području.
Definisanje protokola pri promeni metoda	Laboratorija bi trebala da dá obaveštenje uz rezultat tumorskog markera ako se promeni metoda; biće od veće koristi ako laboratorija naznači da li će promena metode uticati na interpretaciju rezultata.
Poznavanje poluvremena života tumorskog markera	Ovo vreme se definiše kao vreme potrebno da se koncentracije tumorskog markera smanji za 50% posle potpunog uklanjanja tumorskog tkiva (razlikuje se od definicija koje se koriste za druge analite). Od posebnog značaja je za interpretaciju serumskih koncentracija izvesnih tumorskih markera kao što su AFP i hCG.
Realno poređenje korisnosti tumorskog markera	Dobijanje objektivne kliničke informacije o korisnosti tumorskog markera je prioritet i u razmatranju je od strane brojnih profesionalnih organizacija.

Tabela iz konsenzus preporuka EGTM grupe (3).

Tabela IV Važni zahtevi pri izdavanju rezultata tumorskih markera

- Kompletan pregled svih vrednosti, pošto trend kretanja u koncentraciji markera daje najbolju informaciju. Bitni klinički detalji treba da su dati u izveštaju, jer to olakšava interpretaciju. Grafički prikaz može biti od koristi.
- Preporuke za frekvenciju određivanja tumorskih markera.
- Preporuke kada ponoviti određivanje radi potvrde rezultata. Očigledan porast u koncentraciji markera trebalo bi uvek potvrditi ponovnim merenjem.
- Dobra komunikacija između laboratorije i kliničkog osoblja, što olakšava odgovarajuću upotrebu ovih testova.

Tabela iz konsenzus preporuka EGTM grupe (3).

Karcinom dojke

Statistički podaci u Americi su pokazali da prosečna žena ima približno 11% šanse da oboli od karcinoma dojke u toku svog života. Mada medicinska nauka nije utvrdila načine prevencije od razvoja karcinoma dojke, dostignuća u dijagnozi i terapiji mogu zaustaviti bolest kod mnogih pacijenata. Osim toga, značajan broj letalnih ishoda može se izbeći ranom detekcijom, npr. samopregledavanjem, mamografijom, i/ili kliničkim ispitivanjem. Iako se tumorski markeri nisu pokazali kao pogodan *screening* test, oni obezbeđuju korisnu informaciju za praćenje ovih pacijenata, primarno kao prediktivni indikatori za izbor terapije kod primarnog karcinoma dojke i kao markeri za praćenje kliničkog toka bolesti. Trenutno se kao markeri karcinoma dojke koriste ili preporučuju:

- estrogenski i progestinski receptori,
- CA15-3,
- BR27.29 (CA27.29),
- CEA i
- HER-2/neu (c-erb B2) onkoprotein.

Estrogenski i progestinski receptori

Glavni tumorski markeri koji su se koristili kod tkiva karcinoma dojke su: steroidni receptori, p53 tumor supresorni gen, c-erb B2 (HER-2/neu) i parametri iz ciklusa deobe ćelije – S faza i broj hromozoma (mere se protočnom citometrijom). Steroidni receptori su trenutno jedini tkivni markeri prihvaćeni u standardnoj praksi (5).

Estrogenski i progestinski receptori koriste se kao prediktivni indikatori odgovora na endokrinu terapiju i za procenu verovatnog kliničkog toka kod pacijenata s karcinomom dojke, tj. kao prognostički faktori. Uopšte, pacijenti sa receptor pozitivnim tumorima imaju bolju prognozu, barem u kratkom periodu, u odnosu na one sa receptor negativnim malignitetima (6). Približno 30% »nodus negativnih« i do 75% »nodus pozitivnih« pacijenata sa karcinomom dojke imaju recidiv metastatske bolesti i umreće u toku narednih 10 godina.

Zbog etičkih razloga estrogenski i progestinski receptori se retko određuju kod normalnog tkiva dojke kod žena bez karcinoma, tako da dobro-doku-

mentovani referentni opsezi nisu dostupni. Međutim brojna biohemijska ispitivanja koja su koristila ligand-vezujuće tehnike ili enzimsko imunoodređivanje pokazala su da nekancerogeno tkivo dojke sadrži veoma niske (< 15 fmol/mg proteina) ili nemerljive nivoe receptora seksualnih hormona. Vrednosti od 10 fmol/mg proteina (ligand-vezujuća tehnika) ili 15 fmol/mg proteina (enzimsko imunoodređivanje) uopšteno se koriste kao *cut-off* vrednosti. Nivoi i distribucija estrogenskih i progestinskih receptora u biopsijama karcinoma dojke su zavisni od starosnog doba i menopauzalnog statusa pacijenta (7). Generalno, biopsije od premenopauzalnih pacijenata s karcinomom dojke sadrže manje nivoe ovih receptora u odnosu na one kod postmenopauzalnih žena s karcinomom dojke.

U poslednjoj deceniji je otkriveno skoro 20 varijanti receptora seksualnih hormona. Tako na primer, nedavno je otkrivena nova forma estrogenskog receptora označena kao beta (ER-β). Ova izoforma, u odnosu na alfa formu (ER-α), pokazuje drugačije ligand vezujuće osobine i biološke aktivnosti (8).

Bez obzira koja se tehnika koristi za određivanje, pravilan izbor i rukovanje biopsijom tkiva dojke je veoma važno za reproducibilnost rezultata. Prvo, tkivo mora biti zamrznuto na -20 °C ili na nižoj temperaturi odmah posle hirurškog isecanja i u zamrznutom stanju transportovano do laboratorije. Pre ekstrakcionog procesa, sredstva koja su korišćena za zamrzavanje i/ili bojenje treba potpuno ukloniti. Receptori seksualnih hormona su nestabilni u ekstraktima tkiva na sobnoj temperaturi i gube aktivnost na 4 °C u roku od 2–4 sata. Ekstrakte treba zamrznuti odmah posle dobijanja na -70 °C. Stabilnost sadržaja receptora u zamrznutim ekstraktima varira u zavisnosti od tipa tumora, prisustva hemoragičnog i normalnog tkiva i drugih faktora. Nakon 48 sati, ako treba ponoviti određivanje, mora se pripremiti sveži ekstrakt od preostalog zamrznutog tkiva.

Analitička preciznost trenutno dostupnih radioligand vezujućih tehnika i metoda enzimskog imunoodređivanja (koje koriste standardizovane reagense i stabilne referentne uzorke) je znatno bolja (koeficijenti varijacije su 4–15%) od preciznosti koja se zahteva u kliničkim ispitivanjima. Granice odlučivanja (*cut-off* vrednosti) zavise od metode i one treba da su navedene prilikom izdavanja rezultata.

CA15-3 (MUC-1) i BR27.29 (CA27.29)

Karcinomu asocirani antigeni (CA) su ugljenohidratne molekule sa epitopima prepoznatljivim od strane monoklonalnih antitela. Tumorski markeri mukoproteinskog tipa za karcinom dojke su: CA15-3, BR27.29, CA-549, MCA, CA-M26 i CA-M29. Osetljivost i specifičnost ovih antigena je slična i istovremena upotreba više ovih markera ne obezbeđuje dodatne informacije. Samo CA15-3 i BR27.29 su odobreni kao markeri kliničkog praćenja pacijenata sa karcinomom dojke sa metastazama.

Nivoi CA15-3 su povišeni kod 60–80% pacijenata s metastazirajućim karcinomom dojke, u korelaciji su sa promenama kliničkog stanja i odgovora na terapiju i njihovo redovno određivanje može da pomogne u ranoj detekciji metastaza na kostima i jetri. Prema preporukama EGTM grupe (9) istovremena primena CA15-3 i karcinoembrionalnog antigena (CEA) verovatno povećava osetljivost kao i kliničku korisnost ovih antigena kao markera karcinoma dojke.

BR27.29 je nedavno otkriven mukoproteinski marker. Ispitivanja pokazuju da je BR27.29 dobar marker u detekciji kasnijeg stadijuma metastazirajuće bolesti, da dobro odražava aktivnost bolesti i da može da se koristi u prognozi recidiva bolesti i nastanka metastaza na kostima (10). Po nekim podacima BR27.29 je osetljiviji, ali manje specifičniji marker od CA15-3.

U uzorcima za određivanje CA15-3 ili BR27.29 serum treba bez odlaganja odvojiti od koaguluma. CA15-3 i BR27.29 su stabilni u serumu 24 sata na 4 °C, a posle uzorke treba zamrznuti da bi se održala stabilnost ukoliko je potrebno ponoviti određivanje. Izbor metoda za određivanje CA15-3 i BR27.29, analitička preciznost, referentni opseg i granice odlučivanja treba da se utvrde unutar svake institucije. Buduća ispitivanja treba da utvrde uticaj pola, rase, starosne dobi i menopauzalnog statusa na nivoje CA15-3 kod zdravih i pacijenata sa karcinomom dojke. Potrebno je i ispitati mogućnost interferencija, pronaći odgovarajući referentni uzorak za BR27.29 i unaprediti kontrolu kvaliteta.

NACB i EGTM preporuke za primenu tumorskih markera kod karcinoma dojke

1. Status estrogenskih i progestinskih receptora treba koristiti za identifikaciju onih pacijenata s karcinomom dojke koji će verovatno odgovoriti na adjuvantnu hormonsku terapiju (tamoksifen). Nivoje ovih receptora trebalo bi kvantifikovati kod svakog primarnog kancera dojke i kod pre- i post-menopauzalnih pacijenata u vreme dijagnoze, prema vodičima za kliničku praksu Američkog društva za kliničku onkologiju (ASCO, *American Society of Clinical Oncology*). Imunohistohemijska određivanja trebalo bi samo uraditi u slučaju da biopsija

tkiva onemogućava kvantifikaciju receptora. Imunohemija izvedena na parafinom obrađenom tkivu trebala bi takođe biti metoda izbora kada sveže tkivo nije dostupno.

2. Ukupna nepreciznost koja zadovoljava donošenje kliničkih odluka je 10–20% za nivoje estrogenskih i progestinskih receptora u vrednosti od 30–50 fmol/mg proteinskog ekstrakta, dok za vrednosti više od 100 fmol/mg proteina je 30–40%.
3. Nivoje estrogenskih i progestinskih receptora treba meriti samo kod onih metastazirajućih karcinoma dojke i kod pre- i post menopauzalnih pacijenata ako će rezultat pomoći u izboru tretmana, što je u saglasnosti sa ASCO vodičima kliničke prakse. Imunohistohemijska određivanja trebalo bi samo uraditi u slučaju da biopsija tkiva onemogućava kvantifikaciju receptora.
4. Određivanje CA15-3 ili BR27.29 je korisno za ranu detekciju recidiva karcinoma dojke kod pacijenata bez kliničkih simptoma a koji su predhodno lečeni od karcinoma stadijuma II i III. Visoki nivoi CA15-3 kod pacijenata s karcinomom dojke gotovo sigurno ukazuju na prisustvo metastaza.
5. Snižene koncentracije cirkulišućeg CA15-3 su znak uspešnog odgovora na terapiju, a vrednosti koje perzistiraju ili su u porastu, ukazuju na progresiju bolesti i slab odgovor na terapiju. Zbog toga se preporučuje opreznost pri primene CA15-3 u kliničkom praćenju pacijenata s karcinomom dojke. Osim toga, merenje CEA se preporučuje od strane EGTM grupe za ranu dijagnozu udaljenih metastaza.
6. Pošto su povišeni nivoi CA15-3 nađeni i kod brojnih drugih malignih i nemalignih bolesti, njegovu primenu treba isključiti iz *screening-a*, dijagnoze ili utvrđivanja stadijuma karcinoma dojke, što je u saglasnosti sa ASCO vodičima za kliničku praksu.
7. Upotreba BR27.29 u kliničkoj praksi je ograničena na praćenja pacijenata s karcinomom dojke kod kojih je bolest u uznapredovalom stadijumu.
8. Ako se uzorci duže čuvaju, epruvete ne bi trebale sadržati tiksotropični gel.

Klinička primena novih markera kod karcinoma dojke

Epidermalni faktor rasta (EGF, *epidermal growth factor*) je polipeptidni lanac, sa tri disulfidna mosta koji mu daju visoku temperaturnu stabilnost. Proteinski receptor za EGF je složena molekula koja se sastoji od velikog ekstracelularnog domena odgovornog za vezivanje sa EGF, transmembranskog dela koji drži receptor u citoplazmatskoj membrani i jednog unutrašnjeg domena koji sadrži ATP vezujuće mesto i pokazuje aktivnost tirozin kinaze.

Receptori za EGF su prisutni kod karcinoma dojke, endometrija i ovarijuma. Mogu se meriti ra-

diobeženim EGF ili ligand kompetitivnim određivanjem gde se meri i specifičan kapacitet vezivanja i afinitet EGF. Povećan broj receptora za EGF u biopsiji tumora dojke pokazalo se da je u korelaciji s kraćim periodom do ispoljavanja bolesti i smanjenim preživljavanjem (11). Za razliku od receptora za steroidne hormone, visoki nivoi receptora za EGF u biopsiji tumora dojke ukazuju na lošu prognozu. Mada ASCO vodiči za kliničku praksu ne preporučuju upotrebu receptora za EGF, sve je više dokaza o njihovoj vrednosti kao prognostičkih faktora i kao prediktivnih testova za procenu efikasnosti terapije novim lekovima koji su usmereni na EGF receptor pozitivan karcinom dojke.

Neu onkogen, originalno izolovan iz neuroblastoma pacova, kodira površinski glikoprotein, označen kao »p185 neu« i koji pokazuje aktivnost tirozin kinaze sa strukturom sličnom receptoru za EGF receptor. Ispitivanjem molekularnih osobina i hromozomske lokalizacije utvrđeno je da se receptor za EGF razlikuje od p185 neu.

Ispitivanja pokazuju da je humani homolog *c-neu* gena, označen kao *c-erb B2* ili kao *HER-2/neu*, višestruko povećan kod humanog karcinoma dojke i u korelaciji je sa smanjenim periodom do ispoljavanja bolesti i smanjenim preživljavanjem (12). ASCO grupa je 2000. godine uključila u preporuke merenje *HER-2/neu* onkoproteina kod primarnog karcinoma dojke bilo prilikom dijagnoze ili recidiva bolesti. ASCO grupa je preporučila i metode za merenje ovog onkoproteina, kao i njegovu primenu kod izbora terapije i praćenja odgovora na terapiju (sa trastuzumabom). Merenje *HER-2/neu* onkoproteina bilo u ekstraktima tumora ili kao cirkulišućeg ekstracelularnog domena ne preporučuje se za prognozu bolesti.

Katepsin D pripada klasi kiselih lizozomalnih proteaza koje su pronađene u svim ćelijama. Pod stimulacijom estrogena, u kulturi ćelija karcinoma dojke ova proteaza se sekretuje kao prekurzor od 52 kDa. Fosfoglukoprotein, pro-katepsin D se razlaže na 3 razvijene forme molekulske mase 48 kDa, 34 kDa i 14 kDa. Monoklonalna antitela koja se nalaze u okviru postojećih IRMA testova usmerena su protiv sve ove tri forme. Takođe za merenje ovog analita u ekstraktima karcinoma dojke postoje i odlični EIA i ELISA testovi. Istraživanja su pokazala da je prekomerna ekspresija katepsina D kod karcinoma dojke bez prisutnih izraslina u korelaciji sa smanjenom dužinom perioda bez prisustva bolesti i smanjenim preživljavanjem (13). Međutim ASCO panel je zaključio da su postojeći podaci nedovoljni da potvrde korisnost primene katepsina D kod praćenje pacijenata s karcinomom dojke.

Za serin proteaze, *urokinaza-tip plazminogen aktivatora* (uPA) i tkivni tip plazminogen aktivatora (tPA), je poznato da konvertuju plazminogen u plazmin. tPA učestvuje uglavnom u intravaskularnoj trombolizi, dok uPA posreduje u pericelularnoj prote-

olizi za vreme ćelijske migracije i remodeliranja tkiva kod fizioloških i patofizioloških stanja (involucija mlečnih žlezda, invazija trofoblasta, spermatogeneza, zarašćivanje rana).

Enzimski inaktivna forma ili proenzim uPA (pro-uPA) se sekretuje iz ćelija i vezuje za svoj receptor (uPAR) na ćelijskoj membrani. Izvesne proteaze (npr. plazmin, tripsin, kalikrein, katepsin B) prevode pro-uPA u enzimski aktivnu formu velike molekulske mase koja se sastoji od dva polipeptidna lanca vezana sa disulfidnim mostom. Aktivirani uPA zatim prevodi plazminogen u plazmin. Plazmin je proteaza širokog spektra koja katalizuje degradaciju višestrukih proteina u ekstracelularnom matriksu što omogućava invaziju i metastaziranje. *Plazminogen aktivator inhibitori* (PAI-1 i PAI-2), koje stvaraju normalne i tumorske ćelije, inhibišu uPA čak i onda kada je vezan za svoj receptor.

Izgleda da uPA ima ulogu da posreduje u invaziji tumorskih ćelija kod karcinoma. Povišeni nivoi uPA, PAI-1 i PAI-2 prisutni su u tkivnim ekstraktima kod različitih karcinoma kao što su karcinom dojke, ovarijuma, uterusa, cerviksa, prostate i kolona. Ekspresija uPA i PAI-1 kod karcinoma dojke je u korelaciji s kliničkim tokom bolesti; kada su oba ova analita povišena u istoj biopsiji rizik od recidiva bolesti i period preživljavanja se mogu tačnije predvideti (14).

Ginekološki karcinomi

U zapadnim zemljama ginekološki karcinomi su zastupljeni približno 15% od svih karcinoma kod žena i odgovorni su za približno 10% smrti kao posledice karcinoma. Po učestalosti na prvom mestu su karcinomi endometrijuma, a zatim ovarijuma i grlića materice. Međutim, ovarijalni karcinom ima najveću stopu mortaliteta.

Karcinom ovarijuma

Trenutno ne postoji efektivna metoda za otkrivanje karcinoma jajnika kod asimptomatičnih žena. Najbolji trenutno dostupan marker za epitelijalni karcinom ovarijuma (najčešći, 90% od svih ovarijalnih maligniteta) je mukoprotein CA125. Povišeni nivoi CA125 su pronađeni kod približno 80% pacijenata s epitelijalnim karcinom ovarijuma. Međutim CA125 ima nisku osetljivost u ranoj fazi bolesti i nisku specifičnost (15).

Dvaput izmerena vrednost CA125 iznad bazalne vrednosti (< 35 U/mL) u bilo kom intervalu ukazuje da treba odmah uraditi rektovaginalni pregled, transvaginalnu sonografiju (TVC) i/ili abdominalnu kompjuterizovanu tomografiju. Ukoliko su detektovani abnormaliteti to ukazuje da je potrebno uraditi laparoskopiju ili laparotomiju.

Brzina opadanja CA125 posle hirurške interven-

cije i za vreme citotoksične hemoterapije se pokazala kao nezavisan prognostički faktor u kliničkim ispitivanjima i ovaj parametar bi se mogao koristiti za utvrđivanje potrebe za dodatnom hemoterapijom. Posle operacije i hemoterapije CA125 bi trebalo meriti svaka tri meseca. Međutim, bolest može napredovati i bez propratnog povišenja CA125 pa tumorske depozite treba detektovati fizičkim ili imidžing ispitivanjima kad kod je moguće (16).

95% populacije zdravih žena ima vrednosti CA125 manje od 35 U/mL. U postmenopausalnom period vrednosti su niže (<20 U/mL). CA125 nije specifičan marker karcinoma ovarijuma i može biti povišen kod adenokarcinoma falopianske tube, endometrijuma, cerviksa, pankreasa, kolona, dojke i pluća. Takođe može biti povećan i kod benignih ginekoloških stanja kao što su endometrioza, fibroidni tumori, adenomioza, zatim kod inflamatornih bolesti karlice, menstruacije i u prvom trimestru normalne trudnoće. Vrednosti mogu biti povećane u plazmi i zbog benignog ascita ili bilo kog inflamatornog stanja u peritoneumu, pleuri ili perikardijumu. Teške hepatične bolesti takođe mogu dovesti do porasta CA125.

Serum za određivanje CA125 treba bez odlaganja odvojiti od koaguluma. Uzorci se mogu čuvati na 4 °C do 24 sata. Preporučuje se čuvanje seruma na -20 °C (u kraćem periodu) ili na -70 °C (u dužem periodu) da bi se očuvala stabilnost analita ako je potrebno ponoviti određivanje. NACB grupa smatra da je koeficijent varijacije <15% poželjan za određivanje CA125.

NACB i EGTM preporuke za primenu tumorskih markera kod karcinoma ovarijuma

CA125 ne bi trebalo koristiti za *screening* opšte asimptomatične populacije za detekciju sporadičnog karcinoma ovarijuma.

CA125 bi trebalo određivati svakih šest meseci uz transvaginalnu sonografiju (TVC) koju treba uraditi jednom godišnje, kao dodatni marker za ranu detekciju karcinoma ovarijuma kod osoba sa: porodičnom istorijom karcinoma dojke ili ovarijuma, dokazanom mutacijom u BRCA1, BRCA2, ili neprikladnošću repariranih gena.

CA125 bi trebalo određivati kod žena kod kojih su prisutne mase (čvorići) u karlici radi razlikovanja benignih od malignih lezija.

CA125 bi trebalo određivati za vreme primarne terapije radi predviđanja prognoze.

CA125 se može meriti i radi potvrđivanja neuspele terapije.

Pošto je gubitak aktivnosti CA125 primećen kod ponovljenog procesa zamrzavanja i odmrzavanja, preporučuje se da se porcije seruma čuvaju na -70 °C.

Karcinom cerviksa

Posle karcinoma dojke cervikalni maligniteti su drugi po redu glavni uzrok mortaliteta kod žena s karcinomom. Za karcinome skvamoznih ćelija, antigen karcinoma skvamoznih ćelija (SCCA, *squamous cell carcinoma antigen*) je marker izbora. Drugi markeri koji su ispitivani kod cervikalnog karcinoma su karcinoembrionalni antigen (CEA), humani horionski gonadotropin (hCG) beta fragment – hCGβcf (βcf, *beta-core fragment*) i citokeratini (TPA i CYFRA21.1), ali na osnovu trenutno dostupnih podataka njihova upotreba kod cervikalnog karcinoma se ne preporučuje (15).

Dve uzastopno izmerene vrednosti SCCA ako su u porastu, ukazuju na progresiju ili recidiv bolesti u 76% slučajeva, sa lažno pozitivnim povišenim vrednostima u 2,8–5% slučajeva. Zbog toga, merenje SCCA u serumu svaka tri meseca može biti korisno za izbor terapije.

Kod 99% zdravih žena vrednosti za SCCA su manje od 1,9 µg/L. Vrednosti kod žena su više nego kod muškaraca. Nije primećena razlika u vrednostima kod pušača i nepušača. SCCA nije specifičan marker za karcinom cerviksa materice, jer je povišen i kod različitih neoplazmi skvamoznih ćelija kao što su karcinomi kože, pluća, ezofagusa, bešike, anusa, kao i kod benignih kožnih bolesti, plućnih bolesti i teške bubrežne insuficijencije.

Pošto se velike količine SCCA često mogu naći u salivi, znoju i respiratornim sekretima, kontakt krvi sa kožom ili salivom treba izbegavati. Prosečna dnevna varijacija od 24% je primećena za nivoe SCCA u serumu. Zbog toga, *cut-off* vrednosti bi trebalo individualno razmatrati kod praćenja recidiva bolesti. NACB grupa preporučuje da na rezultatima treba da stoji napomena: »koristiti samo u istraživačke svrhe«.

Karcinom endometrijuma

Trenutno ne postoji marker koji ima potrebnu osetljivost i specifičnost za rano otkrivanje i dijagnozu karcinoma endometrijuma. Za praćenje pacijenata s karcinomom endometrijuma, najbolji od dostupnih markera je CA125; povišene vrednosti su pronađene u približno 60% pacijenata sa rekurentnim karcinomom endometrijuma. Međutim, kao i sa SCCA kod cervikalnog karcinoma, ne postoje dokazi da serijsko merenje CA125 poboljšava kliničko praćenje pacijenta (17).

Karcinom prostate

Klinička primene prostata specifičnog antigena (PSA) kod pacijenata s karcinomom prostate je opisana u posebnom radu (autor – dr. Nataša Lalić). Ovde su samo navedene *preporuke NACB i EGTM*

za primenu PSA kod karcinoma prostate i one su sledeće:

1. NACB i EGTM grupe su se složile sa preporukom Američkog društva za karcinome da PSA za dijagnozu ne sme biti korišćen sam, već bi se trebao primenjivati zajedno s digitalnim rektalnim pregledom (DRE, *digital rectal examination*);
2. zbog polemike oko upotrebe PSA za detekciju veoma malih tumora, niska *cut-off* vrednost (2 µg/L) se ne preporučuje;
3. NACB grupa strogo preporučuje posebne referentne intervale za PSA, za različite starosne dobi i rase, dok EGTM grupa ne preporučuje posebne intervale po godištima,
4. upotreba procenta slobodnog PSA se preporučuje kao pomoćni marker u razlikovanju karcinoma prostate od benigne prostatične hiperplazije (BPH) kada je ukupan PSA u opsegu 4–10 µg/L i DRE je negativan; potrebna je odgovarajuća validacija medicinskih granica odlučivanja za svaku kombinaciju određivanja slobodnog i ukupnog PSA unutar svake institucije;
5. preporučuje se da se uzorkovanje krvi vrši pre bilo koje manipulacije na prostati i nekoliko nedelja posle rešavanja problema prostatitisa;
6. preporuke za rukovanje sa uzorkom:
 - uzorke treba centrifugirati i držati na 4 °C u roku od tri sata posle vađenja krvi;
 - uzorci se mogu čuvati na 4 °C do 24 sata;
 - uzorke koji se neće analizirati u roku od 24 sata posle sakupljanja, treba čuvati zamrznute na –20 °C ili još nižim temperaturama;
 - za čuvanje u dužem periodu, uzorke treba zamrznuti na –70 °C ili nižim temperaturama.
7. preporučuje se da kada se jedno visokosenzitivno određivanje koristi za kliničke svrhe, u laboratoriji treba odrediti koja je najniža merljiva koncentracija i o tome obavestiti kliničare; treba uvesti kontrolu kvaliteta i za ovakve nivoe; uticaj intraindividualne biološke varijacije (koja može biti prilično visoka pri ovako niskim koncentracijama) takođe treba uzeti u obzir;
8. sledeća saopštenja i informacije treba pridodati svakom izdatom rezultatu:
 - PSA je korišćen zajedno sa DRE
 - naziv testa
 - analitičku osetljivost testa
 - važeći referentni opseg koji je naveden u korišćenom testu (u obzir treba uzeti i etničke i regionalne razlike u referentnoj populaciji).

Kolorektalni karcinom

Kolorektalni karcinom je vodeći uzrok smrti kod pacijenata s malignitetima (11% od svih smrti kao posledica karcinoma); on je drugi po redu, iza karcinoma pluća. Petogodišnje preživljavanje je oko 90% kada se kolorektalni karcinom dijagnostikuje u ranoj fazi, ali u većini slučajeva se otkriva tek kada se karcinom proširi i izlečenje je nemoguće. Tumorski markeri nemaju primenu u detektovanju bolesti zbog nedostatka specifičnosti, ali su korisni kao dodatno sredstvo za predviđanje recidiva i procenu efikasnosti tretmana (5).

Američko društvo za karcinome je 2001. godine izdalo preporuke u kojima postoji nekoliko mogućnosti za *screening* pacijenata s prosečnim rizikom za razvoj kolorektalnog karcinoma, kao i za visoko rizične grupe (18). Prva mogućnost za prosečnu rizičnu grupu od 50 i više godina je godišnje testiranje prisustva okultnog krvarenja u fecesu (FOBT, *fecal occult blood testing*), što je pokazalo da smanjuje rizik od smrti za jednu trećinu kada se izvodi rutinski. Druge mogućnosti za *screening* u intervalima od pet godina uključuju fleksibilnu sigmoidoskopiju (sa ili bez FOBT) ili dupli klistir sa barijumskim kontrastom (neosetljiv za vizualizaciju manjih neoplazmi). Krajnja mogućnost je kolonoskopija, najosetljivija metoda, koja se preporučuje jednom u svakih 10 godina za pojedince sa prosečnim rizikom za pojavu kolorektalnog karcinoma.

Pojedinci sa povećanim rizikom za pojavu kolorektalnog karcinoma su oni sa inflamatornim bolestima creva, porodičnim adematoznim polipozama, naslednim nepolipozičnim kolorektalnim karcinomom ili sa porodičnom istorijom karcinoma. Kod njih se karcinom razvija približno 10 godina pre nego kod onih sa prosečnim rizikom, pa ih treba intenzivnije pratiti i uraditi *screening* u ranijim godinama starosti (u 40. godini). Većina kolorektalnih karcinoma nastaje iz prekurzornih adematoznih polipa, lezija kojima treba oko 10–12 godina da se razviju u maligno stanje (19). Ovako dug interval daje mogućnost intervencije pre razvoja karcinoma; preventivno uklanjanje polipa smanjuje mortalitet i incidencu pojave bolesti.

CEA se smatra markerom izbora kod kolorektalnog karcinoma, ali nema ulogu u detekciji i dijagnozi, zbog visokog procenta lažno pozitivnih rezultata i loše prognostičke vrednosti. Međutim, merenje CEA može da posluži kao dopuna u određivanju prognoze, pojave recidiva i odgovora na terapiju (20).

Povećana postoperativna vrednost CEA je nepovoljan prognostički indikator, ali ova informacija nije klinički bitna za opšti ishod.

CEA ima ograničenu ulogu kod asimptomatičnih recidiva. Za detekciju povratka bolesti kod pacijenata s dijagnostikovanim kolorektalnim karcinomom dokumentovano je da CEA ima osetljivost oko 80% (opseg 17–89%) i specifičnost oko 70% (opseg

34–91%). Pronađeno je da je određivanje CEA najosetljivije za dijagnozu hepatične ili retroperitonealne bolesti i da je relativno neosetljivo za lokalno peritonealno ili plućno učešće. Pojedina istraživanja su pokazala da spori porast CEA obično ukazuje na recidiv u obližnjem regionu, dok brzi porast obično sugeriše na hepatičnu metastazu. Takođe je pokazano da intenzivno praćenje bolesti preko vrednosti CEA može biti od veće koristi kod rektalnog karcinoma pre nego kod karcinoma kolona, pošto je lokalni recidiv češći za rektalni karcinom.

Iako je hirurška intervencija najefektivnija terapija za kolorektalni karcinom, hemoterapija (npr. sa 5-fluorouracilom i levamisolom) ima sve veću primenu naročito kod pacijenata s uznapredovalom bolešću. CEA se može meriti radi procene odgovora na tretman i naročito je koristan za detekciju prisustva metastaza gde se teško mogu uočiti simptomi. Važno je naglasiti da može doći do privremenog porasta CEA posle davanja 5-fluorouracila/levamisola (21).

ASCO smatra da je CEA marker izbora za praćenje pacijenata s napredovalim kolorektalnim karcinomom, ali da on sam nije dovoljan za praćenje odgovora na tretman. ASCO i EGTM preporučuju da bi CEA trebalo meriti pre početka terapije i u redovnim intervalima dva do tri meseca posle, bar u toku prve dve godine posle inicijalne dijagnoze. Bolest u progresivnoj fazi se može dokumentovati sa dve uzastopne povišene vrednosti CEA (iznad bazalne) čak i u odsustvu potvrde drugim dijagnostičkim kriterijuma.

Primena CEA u praćenju pacijenata može produžiti interval između radioloških ispitivanja i može čak smanjiti broj ovih ispitivanja, ali ne i zameniti ih. Međutim, sledeće rizike treba stalno imati u vidu kada se prati pacijent s dijagnostikovanim kolorektalnim karcinomom:

- povišeni CEA se često nalazi samo kod pacijenata s uznapredovalom bolešću,
- neće svi pacijenti s recidivom kolorektalnog karcinoma imati povećane vrednosti,
- visoki nivoi se mogu naći i u stanjima koja nisu u vezi sa recidivom,
- pojedine citotoksične terapije mogu privremeno povećati koncentraciju CEA.

NACB i EGTM preporuke za primenu CEA kod kolorektalnog karcinoma

Određivanje CEA se ne preporučuje za *screening* kolorektalnog karcinoma.

CEA se može određivati pre hirurške intervencije kod pacijenata s kolorektalnim karcinomom kao pomoć pri utvrđivanju patološkog stadijuma bolesti i planiranju tretmana.

CEA ne treba koristiti u neposrednom postoperativnom periodu.

CEA se može meriti postoperativno ako je resekcija metastaza na jetri klinički indikovana.

CEA se može meriti za vreme tretmana radi praćenja odgovora na terapiju i dokumentovanja progresivne faze bolesti.

Neuroendokrini tumori

U neuroendokrine tumore spadaju feohromocitom, neuroblastom, medularni karcinom tiroidne žlezde, karcinom ćelija pankreasnih ostrvaca, karcinoidni tumor creva i tumori *Merkelovih ćelija*. Važna klinička osobina svih neuroendokrinih tumora je da oni stvaraju i izlučuju prekomerne količine fiziološki aktivnih jedinjenja koja se normalno nalaze u krvi i urinu, ali u nižim, nepatološkim, koncentracijama. U tabeli V su nabrojani tumorski markeri koji su u vezi s različitim neuroendokrinim tumorima.

Uzastopno normalne vrednosti tumorskog markera ne moraju obavezno isključiti prisustvo bolesti. Laboratorijski testovi daju važne i korisne dodatne podatke u dijagnozi neuroendokrinih tumora (22). Kod svih ovih tumorskih markera treba strogo voditi računa o sakupljanju uzorka, čuvanju uzorka i efektu interferencija.

Tabela V Neuroendokrini tumori i njima pridruženi tumorski markeri

Bolest	Laboratorijski testovi u dijagnozi i praćenju
Feohromocitom	Kateholamini u urinu i plazmi, adrenalin, noradrenalin, dopamin, vanilmandelična kiselina (VMA), homovanilinska kiselina (HVA)
Medularni karcinom tiroidee	Kalcitonin
Karcinom ćelija pankreasnih ostrvaca	Insulin* (nespecifičan)
Karcinoidni tumor creva	Hidroksiindolsirćetna kiselina (5-HIAA) u urinu
* Ne preporučuje se kao marker za ovaj tumor.	

Kateholamini

Za sakupljanje uzoraka krvi kao antikoagulans se koristi heparin. Pacijent bi trebao da bude smiren i u ležećem položaju 30 minuta pre uzorkovanja krvi. Uzorak posle sakupljanja staviti na led i što pre izdvojiti plazmu. Uzorak se mora odmah zamrznuti i tako čuvati do određivanja (na -70°C je stabilan 6–8 meseci).

Kateholamini u urinu mogu biti veoma povećani zbog primanja izvesnih lekova koji direktno ometaju određivanje (npr. alfa-metildopa) ili fiziološki interferiraju sa testom (npr. inhibitori monoamin-oksidge, MAO). Kateholamini u plazmi se ne mogu meriti ako pacijenti primaju izoproterenol, izoetarin ili labetalol. Referentne vrednosti za adrenalin, noradrenalin i dopamin zavise od starosne dobi.

*Vanilmandelična kiselina (VMA)
i homovanilinska kiselina (HVA)*

VMA i HVA se mogu određivati i u slučajnom uzorku urina; dobijena vrednost se izdaje u odnosu na vrednost kreatinina u urinu. Referentne vrednosti za VMA i HVA zavise od starosne dobi. Interferencija nekih lekova na određivanje VMA i HVA se ne može predvideti. Lekovi koji mogu interferirati su: amfetamini, bromokriptin, buspiron, levodopa, klonidin, deksametazon, diuretici, metildopa, inhibitori MAO, propafenon, vazodilatatori i dr.

Hidroksiindolsirćetna kiselina (5-HIAA)

Merenje 5-HIAA, glavnog metabolita serotonina u urinu, je osnovni laboratorijski test za dijagnozu prekomernog stvaranja serotonina kod karcinoidnih tumora (23). Serotonin je jedan od mnogobrojnih vazoaaktivnih supstanci koje dovode do karcinoidnog sindroma sa crvenilom, diarejom i kardijačnom valvularnom bolesti. Odsustvo 5-HIAA kod verovatno prisutnog tumora može biti usled njegove naizmenične sekrecije.

Pacijentima treba uputiti da izbegnu pojedine lekove i hranu bogatu u serotoninu i drugim indolima pre određivanja 5-HIAA. Vrednosti 5-HIAA snižavaju: aspirin, hlompromazin, kortikotropin, etanol, derivati hidrazida, levodopa, inhibitori MAO, fenotiazin, promazin i dr. Vrednosti 5-HIAA povećavaju: lekovi – acetaminofen, kafein, kumarinska kiselina, fluorouracil, glicerol, mefenesin, nikotin, fenacetin, fenobarbital, rezerpin, diazepam i dr.; i hrana – avokado, banane, kafa, šljive, ananas, paradajz, orasi i dr. Referentne vrednosti za 5-HIAA su 30 – 150 mg/L (HPLC).

Medularni karcinom tiroidne žlezde

Medularni karcinom tiroidne žlezde (MTC) je neoplazma njenih parafolikularnih ili C ćelija. Predstavlja približno 10% svih tiroidnih karcinoma. Folikularne ćelije tiroidne žlezde metabolišu jod i stvaraju i oslobađaju tiroidne hormone (T_3 i T_4), a C ćelije stvaraju i izlučuju kalcitonin.

Kalcitonin treba određivati kod pacijenata kod kojih postoji sumnja da imaju MTC, jer su povišeni nivoi visoko specifični za dijagnozu i praćenje MTC. Takođe postoji pozitivna korelacija između mase

tumora i cirkulišuće koncentracije kalcitonina. Posle tretmana MTC primenom totalne tiroidektomije, kalcitonin bi trebalo određivati radi praćenja pojave recidiva bolesti.

Kalcitonin se može meriti u serumu i plazmi (EDTA). Ako se uzorci odmah ne analiziraju treba ih čuvati na 2–8 °C najviše jedan dan ili zamrznute na –20 °C (u plastičnim epruvetama) do 15 dana.

Kalcitonin je jedini biohemijski marker koji se može koristiti za otkrivanje prisustva tumora pre pojave kliničkih simptoma kod pacijenata sa skrivenim karcinomom C ćelija ili sa suspektnim porodičnim MTC (24). Kod stimulirajućih testova sa pentagastrinom ili kalcijumom, četiri puta veće vrednosti kalcitonina od bazalnih ukazuju na prisustvo MTC. Utvrđivanje bazalnih nivoa kalcitonina pre terapije je važno za interpretaciju rezultata stimulirajućih testova.

Referentne vrednosti za kalcitonin variraju zbog razlika u metodologiji i specifičnosti antitela kao i zbog čistoće standarda. Tako su npr. vrednosti dobijene imunoodređivanjem koje koristi monoklonalna antitela niže nego kod radioimunološkog testa (RIA) koji koristi poliklonalna antitela. Generalno, bazalni nivo kalcitonina koristan za kliničku interpretaciju je 5–19 ng/L (RIA).

Pošto je i cirkulišući kalcitonin kao i antiserum iz reagensa heterogen, nije moguće utvrditi specifične kriterijume koji se mogu primeniti na sve procedure određivanja. Svaka laboratorija mora da utvrdi svoje kriterijume i koristi unutrašnje referentne standarde za praćenje kvaliteta određivanja.

Kalcitonin treba odrediti kod statistički značajnog broja zdravih dobrovoljaca starosnih dobi od 5–17, 18–30, 31–50 i preko 50 godina da bi se dobile približne normalne vrednosti. Ovo je posebno važno ako se kalcitonin meri posle stimulacije sekrecije pentagastrinom i kalcijumom.

NACB preporuke za primenu tumorskih markera kod neuroendokrinih tumora

Merenje kateholamina u plazmi je korisno za dijagnozu feohromocitoma, ali treba strogo voditi računa o načinu dobijanja uzorka za analizu. Takođe treba imati u vidu da merenje kateholamina u plazmi predstavlja trenutnu vrednost i nema isti efekat kao uzorak urina sakupljen u određenom vremenskom periodu. U urinu treba određivati frakcije kateholamina, radi doprinosa u dijagnozi feohromocitoma.

Sve lekove koji klinički nisu neophodni treba prekinuti najmanje 72 sata pre sakupljanja uzorka.

Trebalo bi određivati frakcije kateholamina. One imaju prednost u odnosu na vrednosti ukupnih kateholamina u dijagnozi feohromocitoma.

Uzorke treba čuvati na 2–8 °C da bi se održala stabilnost.

Visoko efikasna tečna hromatografija (HPLC) se preporučuje kao analitička metoda za određivanje kateholamina, VMA i HVA.

Kada je pacijent simptomatičan, u toku epizode bolesti, ako je moguće, trebalo bi redovno određivati 5-HIAA.

Uzorke urina (24-časovni) koji će se koristiti za određivanje kateholamina, VMA, HVA i 5-HIAA trebalo bi držati na 2–8 °C u toku perioda sakupljanja. Uzorci moraju biti zakišljeni da vrednost pH bude 2–4, pri čemu ne sme biti ispod 2 jer to može uticati na određivanje.

Tumori seminalnih ćelija

Tumori seminalnih ćelija, bez obzira što su retki, predstavljaju najčešći tip karcinoma kod muškaraca između 15 i 35 godina. Ova bolest je izlečiva, sa dugim periodom bez recidiva kod više od 90% pacijenata koji su tretirani hirurški, radiacionom terapijom, hemoterapijom ili kombinacijom ovih tretmana.

Preživljavanje i prognoza kod karcinoma seminalnih ćelija su visoko zavisne od stadijuma maligniteta (TNM klasifikacija), vaskularne invazije, broja i proširenja visceralnih metastaza (jetra, kosti, pluća, mozak) i od inicijalne koncentracije u serumu tumorskih markera: α -fetoproteina (AFP), humanog horionog gonadotropina (hCG) i/ili njegove β -subjedinice (hCG β), laktat-dehidrogenaze (LDH) i placentalne alkalne fosfataze (PALP). Svi ovi markeri utiču na izbor terapije (25).

Tumori seminalnih ćelija su podeljeni na seminome i neseminomske tumore seminalnih ćelija (NSGCT, *nonseminomatous germ cell tumors*). Za razliku od seminoma, NSGCT mogu sadržati bilo koju kombinaciju višestrukih tipova ćelija kao što su teratomi, karcinomi embrionalnih ćelija, horiokarcinomi i tumori endodermalnog sinusa. Obrazloženje za ovu klasifikaciju je da je ona u korelaciji sa kliničkim tretmanom: seminomi su visoko osetljivi na radiacionu terapiju, dok su NSGCT rezistentni na ovu terapiju. Prema tome tačna dijagnoza je kritična za optimalni ishod tretmana.

Rutinski pregled pacijenata kod kojih su prisutne testikularne mase uključuje kompjuterizovanu tomografiju (CT) abdomena, grudnog koša i karlice, kao i merenje tumorskih markera u serumu uključujući AFP, hCG i LDH. Tumor endodermalnog sinusa i embrionalni karcinom stvaraju AFP (samo je povećan kod NSGCT). Sinciotrofoblastne ćelije stvaraju hCG i povišene vrednosti hCG se mogu naći kod pacijenata (7–18%) sa seminomom kao i kod pacijenata (40%) sa NSGCT. Potrebno je određivati oba markera i hCG i hCG β , pošto neki tumori stvaraju samo hCG β . Važno je naglasiti da u nekim od komercijalno dostupnih testova antitela nisu u mogućnosti da prepoznaju obe ove forme.

EGTM takođe preporučuje merenje placentalne alkalne fosfataze (PLAP), temperaturno stabilnog izoenzima alkalne fosfataze, koji se normalno stvara u placentalnim sinciotrofoblastima (26). Aktivnost PLAP se ispoljava u normalnom tkivu (npr. testisima, cerviksu, timusu, plućima), kao i u malignom tkivu (npr. kod tumora seminalnih ćelija, ovarijuma i pluća). Povišene koncentracije PLAP pronađene su u seminomima (osetljivost 51–90%) i kod NSGCT (osetljivost 20–36%), kao i u tumorima ovarijuma. Merenje PLAP u serumu, sa poluvremenom života od 0,6 do 2,8 dana, ima prednost jer raste i do 80% kod testikularnih seminoma (stadijum I i metastazirajući stadijum), dok je hCG u porastu manje od 20%. Međutim, merenje PLAP se ne preporučuje kod pušača, jer kod njih ovaj izoenzim može biti povišen i do deset puta u odnosu na nepušače, uz značajnu inter-individualnu varijaciju.

Aktivnost LDH u serumu, posebno njene subjedinice LDH-1, je nezavistan prognostički faktor kod pacijenata s uznapredovalim tumorima seminalnih ćelija (27). Povećanje nivoa ovog enzima je primarno pod uticajem veličine i brzine rasta tumora, proliferacije ćelija i smrti ćelija. LDH je povišen kod približno 60% pacijenata s napredovalim NSGCT i kod 80% pacijenata s uznapredovalim seminomima.

Internacionalna kolaborativna grupa za karcinom seminalnih ćelija (IGCCCG, *International Germ Cell Cancer Collaborative Group*) je sprovedla ispitivanja na preko 5000 pacijenata sa tumorima seminalnih ćelija i potvrdila je da u pre-tretmanu nivoi LDH, hCG i AFP, mesto primarnog tumora (medijastinalni nasuprot testikularnom ili retroperitonealni) i prisustvo nepulmonarnih visceralnih metastaza su nezavisni prognostički faktori.

Određivanje poluvremena života AFP i hCG se preporučuje za praćenje tretmana, i brza normalizacija oba markera (za AFP treba da je do 5 dana, a za hCG do 1–2 dana) ukazuje na povoljnu prognozu. Poluvremena života se mogu izračunati upotrebom linearne regresije, koja zahteva minimum tri dobro raspoređena merenja u toku desetodnevnog perioda posle orhidektomije. Posle dva ciklusa hemoterapije, pacijenti kod kojih je poluvreme života za AFP veće od 7 dana i/ili za hCG više od 3 dana, imaju značajno smanjen period preživljavanja (28).

Pacijentima sa zaostalim masama posle hemoterapije treba hirurški ukloniti rezidualne karcinome i teratome. Veoma je važno da samo kod onih pacijenata, kod kojih su tumorski markeri normalni, može da se uradi post-hemoterapijska hirurška intervencija. Kod većine pacijenata sa stalno visokim vrednostima AFP i hCG posle hemoterapije, hirurška intervencija neće ukloniti bolest. Ove pacijente treba uputiti na ponovnu hemoterapiju.

Primena tumorskih markera kod tumora seminalnih ćelija je jedinstvena po sledećem:

- serologija preovladava nad histologijom u izboru tretmana; prisustvo AFP kod pacijenata sa seminomima zahteva da se pacijent tretira kao kod NSGCT čak iako je seminom utvrđen histološki;
- veličina porasta tumorskog markera definiše prognostičku klasifikaciju metastazirajućih tumora seminalnih ćelija;
- normalizacija tumorskog markera je potrebna da bi se procenio odgovor na hemoterapiju;
- mogućnost povratka bolesti mesecima posle hemoterapije može se predvideti brzinom snižavanja serumskih vrednosti AFP i hCG u toku prvih šest nedelja terapije;
- posle hemoterapije, ako treba hirurški ukloniti rezidualne mase, potrebna je normalizacija tumorskih markera u serumu.

NACB i EGTM preporuke za primenu tumorskih markera kod tumora seminalnih ćelija

AFP, hCG i LDH treba odrediti pre orhidektomije kao pomoćne markere u proceni i utvrđivanju stadijuma tumora seminalnih ćelija.

Može se smatrati da svaki pacijent sa seminomom i povišenim AFP ima neseminomski tumor i prema tome ga treba tretirati.

Tumorske markere treba odmah određivati pre orhidektomije, i ako su povišeni, treba ih onda meriti redovno posle orhidektomije. Brzina sniženja njihove koncentracije treba da se uporedi sa normalnom brzinom nestajanja AFP (poluvreme života manje od 7 dana) i hCG (poluvreme života manje od 3 dana). Kod svih pacijenata, stadijum tumora seminalnih ćelija treba odrediti primenom novog TNMS sistema koji obuhvata i rezultate tumorskih markera.

Procedura nadzora pacijenta treba da uključi i određivanje AFP, hCG i LDH svakog meseca u toku prve godine i naizmeničnih meseci u toku druge i treće godine. Klinička ispitivanja treba da obuhvate fizički pregled, rentgen grudnog koša i ultrasonografiju ili CT abdomena i karlice u intervalima 2–3 meseca u toku prve tri godine posle terapije.

Pacijenti sa stadijumom IIA i stadijumom IIB, koji nisu primili hemoterapiju odmah posle hirurške intervencije treba da budu pod nadzorom koji uključuje određivanje AFP, hCG i LDH, fizički pregled i rentgen grudnog koša svakog meseca u toku prve godine, svakog drugog meseca u drugoj godini i svakog trećeg meseca u trećoj godini.

Monoklonalne gamopatije (mijelomi)

Monoklonalne gamopatije čine grupu poremećaja koja se karakterišu proliferacijom jednog klona plazma ćelija koje stvaraju homogeni, monoklonalni

(M) protein. Svaki M-protein se sastoji od dva teška polipeptidna lanca iste klase [gama (γ) u IgG, alfa (α) u IgA, mi (μ) u IgM, delta (δ) u IgD i epsilon (ϵ) u IgE] i dva laka polipeptidna lanca [kapa (κ) ili lambda (λ)] istog tipa.

Uzorak treba sakupljati posle perioda gladovanja da bi se izbegla hiperlipemija; ako su prisutni krioglobulini, uzorak treba držati na 37 °C; treba izbegavati hemolizu jer prisustvo haptoglobina-hemoglobina kompleksa dovodi do pojave pika u α_2 - β zoni na elektroferogramu; ukoliko se ne uradi odmah analiza, uzorak treba zamrznuti na -20 °C. Za detekciju monoklonalnih lakih lanaca (*Bence-Jones* proteina) potrebna je porcija 24-časovnog urina bez konzervanasa.

Količina proteina u urinu je direktna mera mase tumora i zato je korisna za praćenje kliničkog toka pacijenata.

Elektroforeza je korisna kao *screening* test i kao pomoćna metoda za dijagnozu multiplog mijeloma (MM) ili srodnih poremećaja. Takođe je korisna za praćenje kliničkog toka pacijenata sa MM ili *Waldenström-ovom makroglobulinemijom* (WM) zato što veličina M-proteina direktno odražava masu tumora i može se utvrditi da li pacijent reaguje na terapiju ili je došlo do progresije bolesti (29). Povećanje ili smanjenje u veličini M frakcije od 5 g/L ukazuje na značajnu promenu.

Imunofiksacija (ili imunoelektroforeza) je neophodna za utvrđivanje prisustva ili tipa M-proteina. Naročito je od pomoći za detekciju malih M-proteina kod pacijenata sa primarnom sistemskom amiloidozom (AL) ili u praćenju pacijenata sa pojedinačnim plazmocitomima ili ekstramedularnim plazmocitomima. Imunofiksacija je od velike pomoći u prepoznavanju biklonalnih ili triklonalnih gamopatija.

Imunoglobulini se kvantitativno mogu odrediti nefelometrijski.

Znaci i simptomi hiperviskoznosti krvi su: oronazalno krvarenje, zamagljenje ili gubitak vida, vrtoglavica, nistagmus, gluvoća, ataksija, parestezija, diplopija, pospanost, stupor i koma. Postoji segmentalna dilatacija retinalnih vena i retinalne hemoragije. WM je najčešći uzrok hiperviskoznosti, ali se takođe može naći i kod pacijenata sa IgA ili ređe sa IgG mijelomom. Viskozitet se može meriti sa *Ostwald-ovim* viskozimetrom, ili još boljim, *Wells-Brookfield-ovim* viskozimetrom.

Krioglobulini su proteini koji se talože ako se ohlade, a rastvaraju ako se zagreju. Mogu se klasifikovati kao tip I (monoklonal IgM, IgG, IgA ili ređe monoklonalni laki lanci); tip II (mešani; dva ili više imunoglobulina od kojih je jedan monoklonalni) i tip III (poliklonalan, gde M-protein nije nađen). Uzorak se mora sakupljati na 37 °C, staviti u termos na 37 °C i transportovati do laboratorije. Uzorak treba pustiti da koaguliše na 37 °C i zatim ga centrifugirati takođe na

toj temperaturi. Serum se drži u frižideru ili ledenom kupatilu i čita posle 24 časa. Ako ne dođe do precipitacije uzorak treba čuvati na 0 °C sedam dana. Precipitat se ispere i imunoelektroforetski sa monospecifičnim antiserumima se odredi tip imunoglobulina u krioprecipitatu.

Kapilarna zonska elektroforeza omogućava brzo razdvajanje proteina. Zbog bolje rezolucije ovom tehnikom se dobija tačnija kvantifikacija M-proteina. Kapilarnom elektroforezom se takođe može utvrditi i tip M-proteina, ali imunofiksacija je još uvek metoda izbora za detekciju monoklonalnih proteina. Kapilarna elektroforeza nije još dostupna za evaluaciju M-proteina u urinu.

NACB preporuke za laboratorijsko testiranje kod multiplih gamopatija (mijeloma)

1. Elektroforetsko ispitivanje uvek treba uraditi kada se sumnja na MM, WM ili AL.
2. Veoma je važno izdiferencirati monoklonalan od poliklalnog porasta u imunoglobulinima. Imunofiksaciju treba uraditi kada je prisutan oštar pik ili traka na agaroznom elektroforetogramu ili kada se sumnja na MM, WM, AL ili njima srodne poremećaje.
3. Kvantifikacija imunoglobulina radijalnom imunodifuzijom se ne preporučuje.
4. Treba ostaviti uzorak krvi da potpuno koagulise zato što fibrinogen smeta pri elektroforezi – pojavljuje se kao uska traka između β i γ frakcije, pa može biti pogrešno identifikovan kao M-protein.
5. Analiza urina je jako važna kod pacijenata sa monoklonalnim gamopatijama.
6. Viskozitet seruma treba odrediti kada je vrednost IgM monoklalnog proteina >30 g/L ili kada je vrednost IgA ili IgG proteina >40 g/L. Takođe ga treba odrediti kod svakog pacijenta sa oronazalnim krvarenjem, zamućenim vidom ili neurološkim simptomima koji ukazuju na sindrom hiperviskoziteta.

Karcinom pluća

Generalno, loša prognoza pacijenata s karcinomom pluća i nedostatak efektivne terapije za recidive bolesti ograničavaju primenu tumorskih markera.

Većina primarnih tumora pluća klasifikuje se u četiri glavna histološka tipa: karcinomi skvamoznih ćelija, adenokarcinomi, makrocelularni i mikrocelularni karcinomi pluća (SCLC, *small-cell lung cancer*). SCLC obuhvata 20–25% slučajeva bronhijalnih karcinoma i klinički i biološki se razlikuju od druga tri tipa koji se zajedno uopšteno nazivaju »nemikrocelularni karcinomi pluća« (NSCLC, *non-small-cell lung cancer*). Do sada je pokazano da i SCLC i NSCLC

predstavljaju heterogene grupe jer postoji preklapanje glavnih tipova karcinoma pluća.

Tumorski markeri koji se najčešće koriste kod karcinoma pluća su: neuron specifična enolaza (NSE), karcinoembrionalni antigen (CEA), antigen karcinoma skvamoznih ćelija (SCCA, *squamous cell carcinoma antigen*), CYFRA21-1 i pro-gastrin-oslobađajući peptid (ProGRP, *pro-gastrin-releasing peptide*).

Glikolitički enzim (2-fosfo-D-glicerat hidrolaza, EC 4.2.1.11) postoji u vidu nekoliko dimernih izoenzima ($\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\alpha\gamma$, $\beta\beta$ i $\gamma\gamma$). Izoenzimi $\gamma\gamma$ - i $\alpha\gamma$ -enolaza su poznati kao *neuron specifična enolaza (NSE)* pošto se stvaraju u centralnim i perifernim neuronima i malignim tumorima neuroektodermalnog porekla (npr. SCLC, neuroblastomi, intestinalni karcinoid).

CYFRA 21-1 je relativno novi tumorski marker kod čijeg se određivanja koriste dva monoklonalna antitela usmerena protiv fragmenta citokeratina 19. Imunohistohemijska ispitivanja su pokazala da je citokeratin 19 bogato prisutan u karcinomima pluća, tako da je CYFRA 21-1 najosetljiviji marker za NSCLC. Pošto CYFRA 21-1 prestavlja samo fragmente citokeratina 19, test za CYFRA 21-1 pokazuje veću specifičnost nego za tkivni polipeptidni antigen (TPA), koji uključuje citokeratine 8, 18 i 19.

Pro-gastrin-oslobađajući peptid (ProGRP) je relativno stabilan prekurzor hormona gastrin-oslobađajućeg peptida (GRP). U humanom organizmu, GRP je pronađen pretežno u gastrointestinalnom i respiratornom traktu, kao i u centralnom nervnom sistemu. Izvesna ispitivanja su pokazala da GRP oslobađaju tumorske ćelije SCLC i može čak stimulisati rast SCLC ćelija. ProGRP još nije uključen u preporuke EGTM.

Dijagnoza karcinoma pluća generalno zahteva neku od imidžing tehnika, endoskopiju, intra-operativne nalaze i histologiju. Mada merenje tumorskih markera ne može zameniti histološki rezultat, može biti veoma od pomoći gde nije moguće biopsijom ustanoviti konačnu dijagnozu (u približno 20% slučajeva). Na primer, oslobađanje NSE u tkivu i u serumu kod pacijenata bez histološkog dokaza može pomoći u dijagnozi SCLC (30). Slično tome visok nivo SCCA u serumu ukazuje na moguće prisustvo NSCLC i to naročito karcinoma skvamoznih ćelija. Generalno, CYFRA21-1 ima najveću osetljivost za karcinom pluća.

Mada su nivoi CYFRA21-1, TPA, NSE i CEA u izvesnoj korelaciji sa veličinom tumora, ne postoji dosledna veza između stvaranja ovih markera i stadijuma tumora. Uopšteno visoke koncentracije tumorskih markera ukazuju na uznapredovali stadijum tumora i lošu prognozu. Niske ili umereno povišene vrednosti ne isključuju malignitet ili progresiju bolesti. Marker koji su povišeni pre početka terapije verovatno će kasnije biti pogodni za praćenje.

U literaturnim podacima postoje protivurečni rezultati za sve ispitivane parametre kod pacijenata sa NSCLC i SCLC (zbog heterogenosti ispitivanih populacija, različitih procedura, različitih načina određivanja *cut-off* vrednosti i dr.). Međutim pronađeno je da je CYFRA21-1 kod NSCLC značajan prognostički marker.

Smanjenje nivoa tumorskih markera posle primarne hirurške intervencije je prvi znak uspešnog uklanjanja tumora i dobre prognoze. Ako se koncentracije sporo snižavaju i ne dostignu referentni nivo, to ukazuje na zaostalu bolest.

Rizik od recidiva karcinoma pluća je visok (70–90%) i praćenje pacijenata primenom tumorskih markera je jedino opravdano ako postoji mogućnost efikasne terapije. Kod pacijenata sa SCLC, vrednosti NSE odražavaju odgovor na hemoterapiju (31). Važno je znati da za vreme hemoterapije, može doći do privremenog povećanja NSE u toku 24 do 72 sata posle tretmana (npr. zbog sindroma lize tumora) i to se interpretira kao prvi znak efektivne terapije. Tamo gde je dobar odgovor na hemoterapiju, povećane vrednosti NSE pre tretmana generalno brzo opadaju u toku jedne nedelje ili na kraju prvog terapijskog ciklusa.

EGTM preporuke za primenu tumorskih markera kod karcinoma pluća

1. CYFRA21-1, CEA i NSE ne bi trebalo koristiti u *screening*-u bilo kod asimptomatične populacije ili kod onih sa visokim rizikom za nastanak karcinoma pluća (npr. pušači).

2. Zavisno od histologije, CYFRA21-1, CEA i/ili NSE se mogu određivati kod pacijenata sa karcinomom pluća pre prve terapije. Ako se histološki nalaz ne može dobiti pre hirurške intervencije, merenje sva ova tri markera je neophodno za utvrđivanje vodećeg markera (obično je to onaj koji je prisutan u najvišoj koncentraciji).
3. Kada postoji sumnja na prisustvo karcinoma pluća koji se ne može operisati, pa nije histologija moguća, povišena NSE u serumu ukazuje na mikrocelularni karcinom.
4. Praćenje asimptomatičnih pacijenata posle primarne terapije kod karcinoma pluća je sporno. Međutim, serijsko određivanje vodećeg markera može pomoći u proceni da li je tumor potpuno uklonjen i može da pomogne u ranom otkrivanju povratka bolesti.
5. NSE se može meriti za vreme sistemskog tretmana SCLC radi praćenja odgovora na terapiju, kao i radi dokumentovanja progresivne bolesti.
6. Posebno treba obratiti pažnju na preanalitičke faktore. Uzorak za određivanje NSE treba odvojiti od koaguluma u roku od 60 minuta posle vađenja krvi i treba izbegavati hemolizu (NSE je prisutan normalno u eritrocitima). Snažno mešanje uzorka seruma posle odleđivanja treba izbegavati kod merenja citokeratina (može da dođe do njegove adhezije na zid epruvete). Kontaminacija uzoraka sa kožom ili salivom mora se izbegavati kod određivanja SCCA. Bubrežna insuficijencija može značajno uticati na vrednosti SCCA i CYFRA21-1.

Uzorci se mogu čuvati na 4 °C (u kraćem vremenskom periodu) ili na –70 °C (u dužem vremenskom periodu).

GUIDELINES AND RECOMMENDATIONS FOR CLINICAL USE OF TUMOR MARKERS

Marijana Dajak

Institute of Medical Biochemistry, Clinical Centre of Serbia, Belgrade

Summary: Throughout the past twenty years numerous tumor markers have been introduced, but for majority of them specific clinical applications have been limited and only a few markers have been approved by health organizations. This study reviews consensus recommendations made by the National Academy of Clinical Biochemistry (NACB) in the United States and the European Group on Tumor Markers (EGTM). The approach of both the NACB and EGTM groups has been similar, each group considering appropriate use of tumor marker for specific types of cancer. The current guidelines developed by the two groups are considered as follows: quality requirements and control, breast cancer, gynecological cancer, prostate cancer, colorectal cancer, neuroendocrine tumors, germ cell tumors, monoclonal gammopathies and lung cancer.

Key words: CA15-3, HER-2/neu oncoprotein, CA125, CEA, hCG, CYFRA21.1, calcitonin, AFP, PALP, NSE

Literatura

1. Fleisher M, Dnistrian AM, Sturgeon CM, Lamerz R, Wittliff JL. Practice guidelines and recommendations for use of tumor markers in the clinic. In: Diamandis EP, Fritsche HA, Lilja H, Chan DW, Schwartz MK. eds. Tumor markers. Physiology, pathobiology, technology and clinical applications. Washington, AACCC Press, 2002: 33–63.
2. Maligne bolesti: karcinom dojke, pluća, kolorektuma, testisa, ovarijuma. Nacionalni komitet za izradu Vodiča kliničke prakse, Radna grupa za maligne bolesti, Beograd, Ministarstvo zdravlja Republike Srbije, Grafika Jovšić, 2002: 1–36.
3. Sturgeon C, Dati F, Duffy MJ, Hasholzner U, Klapdor R, Lamerz R, et al. Quality requirements and control: EGTM recommendations. *Anticancer Res* 1999; 19: 2791–4.
4. Sturgeon CM. Tumor markers in the laboratory: closing the guideline-practice gap. *Clin Biochem* 2001; 34: 353–9.
5. Bast RC, Radvin O, Hayes DF, Bates S, Fritsche H, Jessup JM, et al. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1865–78.
6. Duffy MJ. Biochemical markers as prognostic indices in breast cancer. *Clin Chem* 1990; 36: 188–91.
7. Wittliff JL, Miseljić S, Cumminis JA, Pasić R. Does menopausal status influence sex-steroid receptor content and specific binding capacity? *J Clin Ligand Assay* 1996; 19: 203–7.
8. Jarvinen TA, Pelto-Huikko M, Holli K, Isola J. Estrogen receptor beta is co-expressed with ER-alpha and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer. *Am J Pathol* 2000; 156: 29–35.
9. Molina R, Duffy MJ, Aronsson AC, Lamerz R, Stieber P, Van Dalen A, et al. Tumor markers in breast cancer: EGTM Recommendations. *Anticancer Res* 1999; 19: 2803–5.
10. Dnistrian AM, Schwartz MK, Greenberg EJ, Schwartz DC. BR27.29 as a marker in breast cancer. *J Tumor Marker Oncol* 1995; 10: 91–7.
11. Klijn JG, Berns PM, Schmitz PI, Foekens JA. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocr Rev* 1992; 13: 3–17.
12. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244: 2807–10.
13. Shaheen RM, Miseljić S, Wiehle RD, Wittliff JL. Relation between cathepsin D expression and other prognostic factors in breast carcinomas. *Clin Chem* 1995; 41: 1585–91.
14. Look MP, van Putten WLJ, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, et al. Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Nat Cancer Inst* 2002; 94: 116–28.
15. Bonfrer JMG, Duffy MJ, Radtke M, Segurado O, Torre GC, van Dalen A, et al. Tumor markers in gynecological cancers: EGTM recommendations. *Anticancer Res* 1999; 19: 2807–10.
16. Markman M. The role of CA-125 in the management of ovarian cancer. *Oncologist* 1997; 2: 6–9.
17. Price FV, Chambers SK, Carcangui ML, Kohorn EI, Schwartz PE, Chambers JT. CA125 may not reflect disease status in patients with uterine serous carcinoma. *Cancer* 1998; 82: 1720–5.
18. Smith RA, von Eschenbach AC, Wender R, Levin B, Byers T, Rothenberg D, et al. American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer: update of early detection guidelines for prostate, colorectal, and endometrial cancers. Also: Update 2001 – testing for early lung cancer detection. *CA Cancer J Clin* 1001; 51: 38–75.
19. Winawer SJ, Zauber AG, Gerdes H, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, et al. Risk of colorectal cancer in families of patients with adenomatous polyps. National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1996; 334: 82–7.
20. Klapdor R, Aronsson AC, Duffy MJ, Hansson LO, Khalifa R, Lamerz R, et al. Tumor markers in gastrointestinal cancer: EGTM recommendations. *Anticancer Res* 1999; 19: 2811–5.
21. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA. Hepatic toxicity associated with fluorouracil plus levamisole adjuvant therapy. *J Clin Oncol* 1993; 11: 2386–90.
22. Gitlow SE, Bertani LM, Rausen A, Gribetz D, Dziedzic SW. Diagnosis of neuroblastoma by qualitative and quantitative determination of catecholamine metabolites in urine. *Cancer* 1970; 25: 1377–83.
23. Feldman JM. Urinary serotonin in the diagnosis of carcinoid tumors. *Clin Chem* 1986; 32: 840–4.
24. Lips CJ, Hoppener JW, Thijssen JH. Medullary thyroid carcinoma: role of genetic testing and calcitonin measurement. *Ann Clin Biochem* 2001; 38: 168–79.
25. Norgaard-Pedersen B, Raghavan D. Germ cell tumors: a collaborative review. *Oncodev Biol Med* 1980; 1: 327–58.
26. Albrecht W, Bonner E, Jeschke K, Stoiber F, Schmidt P, Scheiber K, et al., and the Austrian Uro-Oncology Group. PLAP as a marker in germ cell tumors. In: Jones WG, Appleyard I, Harnden P, Joffe JK, eds. Germ cell tumors IV. London: John Libbey & Co. Ltd., 1998; 105–9.

27. Von Eyben FE. A systematic review of lactate dehydrogenase isoenzyme I and germ cell tumors. *Clin Biochem* 2001; 34: 441–54.
28. Mazumdar M, Bajorin DF, Higgins G, Motzer RJ, Bosl GJ. Predicting outcome to chemotherapy in patients with germ cell tumors: the value of the rate of decline of human chorionic gonadotrophin and alpha-fetoprotein during therapy. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2534–41.
29. Whicher JT, Calvin J, Riches P, Warren C. The laboratory investigation of paraproteinemia. *Ann Clin Biochem* 1987; 24: 119–32.
30. Paone G, De Angelis G, Munno R, Pallotta G, Bigioni D, Saltini C, et al. Discriminant analysis on small-cell lung cancer and non-small-cell lung cancer by means of NSE and CYFRA 21-1. *Eur Respir J* 1995; 8: 1136–40.
31. Bonner JA, Sloan JA, Rowland KM Jr, Klee GG, Kugler JW, Mailliard JA, et al. Significance of neuron-specific enolase levels before and during therapy for small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 597–601.

Rad primljen: 10. 03. 2006.

Prihvaćen za štampu: 25. 03. 2006.