

PREPORUKE ZA PRIMENU TUMORSKIH MARKERA KOD KANCERA PLUĆA

RECOMMENDATIONS FOR CLINICAL USE OF TUMOR MARKERS IN LUNG CANCER

Sanja Stanković

Institute for Medical Biochemistry, Clinical Center of Serbia and University School of Pharmacy, Belgrade, Serbia

Kratak sadržaj: Kancer pluća predstavlja jedan od najozbiljnijih problema moderne onkologije. Uprkos kontinuiranom napretku u dijagnostičkim metodama, kod 50–70% pacijenata s kancerom pluća, bolest se dijagnostikuje u uznapredovalom stadijumu, isključujući na taj način mogućnost radikalne terapije. Određivanje tumorskih markera kod kancera pluća može biti od pomoći u postavljanju dijagnoze, praćenju pacijenta i terapije, a takođe može da pruži dodatne informacije u prognostičke svrhe. U daljem tekstu opisani su odgovarajući serumski markeri kod dve glavne forme tumora pluća–mikrocelularnog i nemikrocelularnog (SCLC i NSCLC), kao i abnormalne supstance identifikovane u tumorima pluća ili njihovim metastazama, kao što su molekularni markeri, markeri prognoze u primeni neoadjuvantne ili adjuvantne terapije i mikrometastazama koštane srži ili limfnom čvoru.

Ključne reči: tumorski markeri, kancer pluća, mikrocelularni kancer pluća, nemikrocelularni kancer pluća

Summary: Lung cancer presents one of the most serious problems of modern oncology. Despite the continual improvement and development of diagnostic methods, in 50–70% of lung cancer patients the disease is still diagnosed in advanced stages, excluding the possibility of radical therapy. The determination of tumor markers in lung cancer could be helpful in recognizing disease, follow-up, and treatment; and also provide additional information for a patient's prognosis. The currently relevant serum markers are discussed for the two major forms of lung cancer: small-cell and non-small cell lung cancer (SCLC and NSCLC), but also abnormal parameters identified in lung tumors or their metastases, such as molecular markers, response prediction markers in neoadjuvant or adjuvant settings, and bone marrow or lymph node micrometastasis.

Keywords: tumor markers, lung cancer, small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer

Uvod

Kancer pluća je najfrekventniji kancer u svetu kao i vodeći uzrok smrtnosti od kancera kod oba pola. Preživljavanje kod kancera pluća zavisi uglavnom od tipa ćelija i stadijuma bolesti u momentu otkrivanja bolesti prema TNM (tumor-node-metastasis) sistemu klasifikacije (tumor-node-metastasis). WHO histološka klasifikacija kancera pluća opisuje dva glavna entiteta koja zavise od tipa ćelija: mikrocelularni kancer pluća (SCLC) i nemikrocelularni kancer pluća (NSCLC). SCLC je veoma agresivna bolest sa lošom kliničkom prognozom i čini oko 15–25% svih kancera pluća. Bez medicinskog tretmana, medijana dužine preživljavanja je od

1 do 3 meseca. Dobri rezultati se postižu hemoterapijom i radioterapijom. NSCLC se sastoji iz 3 glavna histološka tipa: karcinom skvamoznih ćelija (SCC), adenokarcinom (AC) i gigantocelularni karcinom (LC), koji čine ukupno 75% svih slučajeva kancera pluća (1). Radikalna hirurgija sa kompletnom resekcijom tumora samo je osnova za lečenje pacijenata sa NSCLC i verovatnoća preživljavanja uglavnom zavisi od stadijuma tumora. Uprkos kontinuiranom napretku u dijagnostičkim metodama, kod 50–70% pacijenata s kancerom pluća, bolest se dijagnostikuje u uznapredovalom stadijumu, isključujući na taj način mogućnost radikalne terapije. Određivanje tumorskih markera kod kancera pluća može biti od pomoći u postavljanju dijagnoze, praćenju pacijenta i terapije, a takođe može da pruži dodatne informacije u prognostičke svrhe.

Termin tumorski marker obuhvata ne samo one supstance koje se mogu meriti u krvi pacijenata (serumski markeri), već i abnormalne supstance identifikovane u tumorima pluća ili njihovim metastazama, kao što su molekularni markeri, markeri prognoze na-

Adresa autora:

Sanja Stanković
Institut za medicinsku biohemiju,
Klinički centar Srbije i Farmaceutski fakultet
Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija
Tel./fax: +381 11 361 56 31
e-mail: sanjast@EUnet.yu

kon primene neoadjuvantne ili adjuvantne terapije i mikrometastaze u koštanoj srži ili limfnom čvoru.

Serumski markeri kod kancera pluća

Antigen karcinoma skvamoznih ćelija (SCC-Ag). SCC-Ag je glikoprotein koga sintetišu NSCLC, molekulske mase 48 kDa, ranije poznat kao sa tumorom povezan antigen 4. Subfrakcije SCC-Ag mogu se razdvojiti izoelektričnim fokusiranjem u neutralnim i kiselim frakcijama Mr 42-48 kDa. I maligne i nemaligne skvamozne ćelije sadrže neutralnu frakciju, dok se kisela frakcija nalazi uglavnom u malignim ćelijama. Kisela frakcija je ta koja se oslobađa u cirkulaciju. Normalne vrednosti u serumu su manje od 3 ng/mL kod 95% zdravih osoba. Povećane vrednosti SCC-Ag javljaju se u nekim tipovima NSCLC, a takođe se javljaju i zajedno sa insuficijencijom jetre ili bubrega. Pušenje ne utiče na koncentraciju SCC-Ag u serumu. U skvamoznim ćelijama karcinoma, 35% svih pacijenata ima povećane vrednosti SCC-Ag. SCC-Ag nije marker diseminacije bolesti. Vrednosti SCC-Ag u serumu imaju malu dijagnostičku ulogu u NSCLC. Preoperativno i postoperativno smanjenje vrednosti SCC-Ag ima manji prognostički značaj u odnosu na stadijum bolesti. Ekspresija SCC-Ag korelira sa stadijumom diferencijacije karcinoma skvamoznih ćelija (2–7).

Anti-p53 antitela u serumu. Utvrđeno je da pojava autoantitela specifičnih za p53 u serumu pacijenata sa NSCLC zavisi od tipa mutacija p53. Oko 21% NSCLC pacijenata sadrži autoantitela na p53 i pozitivan titar ovih antitela značajno korelira sa pozitivnim inunohistohemijskim bojenjem p53. Autoantitela na p53 u serumu su statistički značajno udružana sa histološkim tipom tumora. Autoantitela na p53 u serumu mogu ukazivati na prisustvo mutacije na p53 i povećane ekspresije kod pacijenata sa NSCLC. Dok su p53 antitela detektovana u serumu pacijenata sa različitim vrstama kancera, uključujući i kancer pluća, prisustvo p53 antitela u serumu zdravih osoba je ekstremno retko. Mala osetljivost autoantitela na p53 u serumu povezana je sa većom specifičnošću i dijagnostičkom tačnošću (100% i 69%). Određivanje p53 autoantitela je jednostavan i jeftin test sa velikom specifičnošću i dijagnostičkom tačnošću i može da se koristi kod pacijenata s kancerom pluća (8, 9).

Citokeratin 19 (CK 19) fragment i CYFRA 21-1. Citokeratini su velika grupa od oko 20 proteina koji čine intermedijarne filamente citoskeleta epitelnih ćelija i ćelija epitelnog porekla, kako normalnih tako i ćelija kancera. Citokeratini se dele u dve grupe: tip1-manji i kiselij, tip2 veći i neutralni do bazni. Klinički korisni članovi ove familije su tkivni polipeptidni antigen (TPA), tkivni polipeptidni-specifični antigen (TPS) i fragmenti citokeratina 19 (CYFRA 21-1). Nakon smrti ćelije, oslobađa se u serumu u obliku rastvorljivih fragmenata. CYFRA 21-1 je fragment CK 19 koji se meri ELISA tehnikom. Poluvreme života CYFRA 21-1 je 12h, a

vrednosti do 1,8 ng/mL nađene su kod zdravih osoba bez obzira na godine starosti, pol i pušačke navike. On je takođe povećan kod kancera (urološki, gastrointestinalni, ginekološki) kao i kod različitih benignih bolesti. Povećanje koncentracije CYFRA 21-1 utvrđeno je u renalnoj insuficijenciji, cirozi jetre, traumi citokeratinom bogatih tkiva i benignim bolestima pluća kao što su fibroza, tuberkuloza i hronična opstruktivna bolest pluća. Ukoliko su prisutni ovi faktori referentne vrednosti su između 2,1 i 3,6 ng/mL sa 95% intervalom pouzdanosti. CYFRA 21-1 je važan marker kod pacijenata sa NSCLC. Koncentracija CYFRA 21-1 ne razlikuje se značajno kod pušača i nepušača i značajno je povećana kod kancera pluća, bez obzira na tip ćelija. CYFRA 21-1 je značajno povećan kod karcinoma skvamoznih ćelija i adenokarcinoma sa najvećim povećanjem kod skvamoznog tipa ćelija. Kod kancera pluća specifičnost i osetljivost CYFRA 21-1 su 92,3% i 52,2%. Osetljivost je 65,5% za sve NSCLC, sa 70,5% za skvamozne ćelije i 45,5% za različite adenokarcinome; najveća osetljivost utvrđena je u stadijumu IIIA/IIIB (87,5%) i IV (75%) kancera pluća skvamoznih ćelija. Koncentracija CYFRA 21-1 se značajno smanjuje nakon lečenja kod pacijenata sa NSCLC. CYFRA 21-1 je vodeći serumski tumorski marker kod NSCLC zbog velike specifičnosti i osetljivosti u detekciji recidiva bolesti. Glavna indikacija za određivanje CYFRA 21-1 je praćenje toka kancera pluća (NSCLC). CYFRA 21-1 pokazuje dobru specifičnost u odnosu na benigne bolesti pluća (upala pluća, sarkoidoza, tuberkuloza, hronični bronhitis, bronhijalna astma, emfizem). Blago povišene vrednosti (do 10 ng/mL) retko se nalaze kod izraženih benignih oboljenja jetre i insuficijencije bubrega. Nije utvrđena korelacija sa polom, starosnom dobi ili pušenjem. Trudnoća takođe ne utiče na vrednosti CYFRA 21-1. Primarnu dijagnozu karcinoma pluća treba postaviti na osnovu kliničke simptomatologije, imidžinga ili endoskopskih procedura i intraoperativnih nalaza. Nejasno žarište u plućima zajedno sa vrednostima CYFRA 21-1 > 30 ng/mL ukazuje s velikom verovatnoćom na postojanje primarnog bronhijalnog karcinoma. Visoki nivo CYFRA 21-1 u serumu ukazuje na uznapredovali stadijum tumora i lošu prognozu. Normalna ili samo blago povišena vrednost ne isključuje prisustvo tumora. Uspešna terapija se dokumentuje naglim padom nivoa CYFRA 21-1 u serumu. Konstantna vrednost CYFRA 21-1 ili blago opadanje vrednosti CYFRA 21-1 ukazuje na nepotpuno odstranjen tumor ili prisustvo više tumora. Napredovanje bolesti često se može utvrditi ranije na osnovu rastućih vrednosti CYFRA 21-1 pre nego na osnovu kliničke simptomatologije i procedura imidžinga. CYFRA 21-1 je povećana kod svih tipova kancera pluća, mada je najosetljivija za NSCLC i SCC. Vrednosti CYFRA 21-1 pozitivno koreliraju sa povećanjem stadijuma bolesti i korisne su u praćenju toka bolesti, kao i u post-hirurškom praćenju. Brojne studije ukazuje da veće vrednosti CYFRA 21-1 koreliraju s uznapredovanim stadijumom tumora, kao i sa veličinom tumora i uključenošću limfnih čvorova. Kod pacijenata podvrg-

nutih resekciji tumora ili hemoterapiji, povećanje vrednosti CYFRA 21-1 u serumu je rani indikator recidiva bolesti. Analiza podataka sakupljenih iz 9 centara pokazala je da je CYFRA 21-1 nezavisan prediktor ranih i kasnijih stadijuma NSCLC, kao i SCLC. CYFRA 21-1 ima potencijal za praćenje lečenja NSCLC u uznapredovalom stadijumu bolesti, kao i za detekciju recidiva nakon primarne terapije, naročito kod kancera skvamoznih ćelija pluća. Kod pacijenata s uznapredovalim stadijumom NSCLC koji su podvrgnuti lečenju hemoterapijom, trendovi u CYFRA 21-1 tokom inicijalne faze lečenja predviđaju odgovor na dalju terapiju. Kada se zamrznuti uzorci odmrznu i koriste za analizu citokeratina, uzorak se nesme jako promešati, pošto ciokeratini mogu da adheriraju na zidove epruveta. Na vrednosti CYFRA 21-1 značajno mogu da utiču oboljenja bubrega, pa se u takvim slučajevima mogu dobiti lažno povećane vrednosti (10–21).

Tkivni polipeptidni antigen (TPA). TPA je jedolčanani polipeptid izolovan iz ćelijske membrane i glatkog endoplazmatičnog retikuluma malignih ćelija. Benigni uzroci povećanja TPA su hepatitis, ciroza jetre, diabetes mellitus, holecista. Pacijenti sa NSCLC s povećanim koncentracijama TPA, definisanim kao vrednosti veće od 100 U/L, povezane su sa skraćenim preživljavanjem. TPA ukazuje na recidiv ili progresiju bolesti. On nije specifičan tumorski marker. TPA može da se identifikuje antitelima koja reaguju sa citokeratinima 8, 18 i 19. TPA produkuju normalne i cancerogene ćelije. Povećane vrednosti TPA u serumu povezane su sa proliferativnom aktivnošću i turnoverom ćelija, što omogućava da se koristi kao marker proliferacije. U većini slučajeva, visoke koncentracije TPA ukazuju na uznapredovali stadijum tumora i na lošu prognozu. On je koristan za praćenje pacijenata na hemoterapiji (22–24).

Tkivni polipeptidni-specifični antigen (TPSA). TPSA je antigen TPA kompleksa koga specifično prepoznaje M3 monoklonsko antitelo. Ovaj epitop je specifičan marker ćelijske proliferacije i može da se detektuje u serumu koristeći specifičan RIA test. TPS korelira sa proliferativnom aktivnošću tumora pluća, bez obzira na histologiju i veličinu tumora, sa povećanjem TPS u odmaklim stadijumima bolesti. Povećane vrednosti TPS koreliraju sa lošijom prognozom što je procenjeno univarijantnom analizom (25–31).

Monoklonska antitela 5E8, 5C7 i 1F10. Antitelo 5E8 plus 5C7 plus 1F10 značajno premašuje SCC-Ag plus CEA u smislu osetljivosti i dokazano je da su najpouzdanija kombinacija markera. Među pojedinačnim markerima, 5E8 su najspecifičniji, 5C7 najosetljiviji i 5C7 i 1F10 najtačniji, ali razlike u odnosu na CEA nisu značajne. Analiza podgrupa prema histološkom tipu i stadijumu bolesti pokazala je slične nalaze, a kombinacija markera dala je malu dodatnu dijagnostičku korist. 5E8, 5C7 i 1F10 pokazali su se boljim od CEA i SCC-Ag kod pacijenata sa novodijagnostikovanim NSCLC (32).

Nespecifični ukršteno-reagujući antigen 50/90 (NCA 50/90). NCA 50/90 pripada familiji CEA gena. Drugi članovi familije su CEA, NCA95 i za trudnoću specifičan beta glikoprotein. Osetljivost od 70%, 39% i 42% utvrđena je kod kancera pluća, kancera kolona i leukemije. Osetljivost za NSCLC bila je 85% u poređenju sa 50% za SCLC. Ovi rezultati ukazuju na kliničku korist u lečenju pacijenata sa NSCLC (33).

Progastrin-oslobađajući peptid (ProGRP). ProGRP je stabilan prekursori peptid sastavljen od 27 aminokiselina gastrin oslobađajućeg peptida, koji je prvo izolovan iz svinjskih gastrinih ćelija i može da se nađe u humanim gastrointestinalnim, bronhoalveolarnim ćelijama i neuronima. ProGRP je specifičan tumorski marker kod pacijenata sa SCLC i njegove vrednosti su retko povećane kod pacijenata sa NSCLC (manje od 3%). On je retko povećan u drugim malignim stanjima, i u tim slučajevima samo je umereno povećan. Bubrežna oboljenja mogu da uzrokuju povećanje do 300 ng/mL, ali povećane koncentracije nisu utvrđene kod drugih benignih oboljenja. Koncentracije proGRP >200 ng/mL su visoko suspektne na kancer pluća, a koncentracije >300 ng/L za SCLC ako je bubrežna funkcija narušena. ProGRP oslobađa se u merljivim količinama u ranom stadijumu SCLC i ne korelira s veličinom tumora. Nekoliko studija ukazuje da on može biti koristan u praćenju SCLC ili detekciji recidiva nakon primarne terapije. Vrednosti proGRP takođe mogu da budu značajno povećane usled renalne insuficijencije (34–38).

Gastrin-oslobađajući peptid (GRP). GRP je peptid koji reguliše rast, karakteriše se sposobnošću da oslobađa gastrointestinalne hormone. Sekvenca GRP peptida locirana je na N-terminalnom kraju GRP prekursorne molekule. C-terminalni kraj prekursora se sekretuje u najmanje dve glavne forme, koje rezultiraju stabilnim proizvodom u plazmi. Povećane koncentracije GRP u serumu utvrđene su kod 7–76% SCLC (standardna vrednost <50 pg/mL). Utvrđeno je da su koncentracije GRP u plazmi povećane kod 71% pacijenata sa ograničenim SCLC i kod 80% onih sa ekstenzivnim tipom bolesti. I GRP i C-terminalni prekurzorni fragment GRP koreliraju sa kliničkim stadijumom tokom hemoterapije. Promene u vrednosti GRP pokazale su dobru korelaciju sa terapijskim odgovorom. Povećane koncentracije GRP nađene su u cerebrospinalnoj tečnosti kod 75% SCLC pacijenata koji imaju meningealnu karcinomatozu (34).

Neuron-specifična enolaza (NSE). NSE je glikolitički neurospecifični izoenzim enolaze koji obezbeđuje komponente neophodne za aerobnu glikolizu. Humana enolaza pripada familiji enolaza gena sa različitim genskim produktima: α , β i γ izoenzimima sa 82% homologije u sekvenci. U neuronima i tumorima sa neuroendokrinom diferencijacijom (NE), identifikovane su povećane koncentracije NSE, pa se NSE klasifikuje kao neuroendokrini tumorski marker (NE TM) i marker za tumore sa NE fenotipom, posebno SCLC. γ enolaza se

primarno nalazi u centralnom i perifernom nervnom tkivu, u tumorima sa neuroendokrinim karakteristikama (npr. SCLC, neuroblastomi, intetinalni karcinoid). Mada je nespecifičan za SCLC, ekspresija NSE u serumu je perzistentnija u ovom tipu tumora nego kod NSCLC. NSE nije dovoljno osetljiv i specifičan da bi se koristio za skrining, ali brojne studije ukazuju da se koristi u dijagnozi SCLC. Visoke vrednosti NSE ($>100 \mu\text{g/L}$) kod pacijenata koji su suspektni na malignitet ukazuju na prisustvo SCLC sa velikom verovatnoćom, sa diferencijalnom dijagnozom uključujući neuroendokrine tumore jetre, limfome i seminome. Umerena povećanja NSE takođe su nađena kod pacijenata sa benignim bolestima pluća kao i kod kancera pankreasa, želuca, kolorektalnih i kancera dojke. Nekoliko grupa istraživača utvrdilo je da kombinacija NSE i proGRP pruža veću mogućnost diskriminacije tumora. NSE ima značajan potencijal u praćenju SCLC kao i u detekciji recidiva bolesti SCLC nakon primarne terapije. NSE se opisuje kao marker izbora u praćenju mikrocelularnog bronhijalnog karcinoma, dok je CYFRA 21-1 bolji marker od NSE za nemikrocelularni karcinom bronha. Povišena koncentracija NSE nalazi se u 60–81% slučajeva mikrocelularnog bronhijalnog karcinoma. Nije utvrđena korelacija NSE i mesta gde se nalaze metastaze ili sa cerebralnim metastazama, ali postoji dobra korelacija sa kliničkim stadijumom. U pogledu reakcije na hemoterapiju, dolazi do privremenog porasta nivoa NSE u periodu od 24–72 sata posle prvog ciklusa terapije što je rezultat citolize ćelija tumora. Nakon toga, u roku od nedelju dana ili krajem prvog ciklusa terapije dolazi do naglog pada vrednosti u serumu (koje su pre terapije porasle). Suprotno tome, kod pacijenata koji ne reaguju na terapiju, taj nivo konstantno raste ili opada do referentnog opsega. Tokom remisije, kod 80–96% pacijenata vrednosti su normalne. Rastuće vrednosti NSE javljaju se u slučajevima recidiva. Ovaj porast vrednosti javlja se u slučajevima sa latentnim periodom od 1–4 meseca, često je eksponencijalan (s vremenom udvostučenja od 10–94 dana) i u tesnoj je vezi sa periodom preživljavanja. NSE je korisan kao jedini prognostički faktor i marker tokom praćenja terapije i tokom bolesti kod mikrocelularnog bronhijalnog karcinoma: diagnostička osetljivost je 93%, pozitivna prediktivna vrednost 92%. Kod NSCLC visoke vrednosti NSE prediktori su loše prognoze, reflektujući heterogenost tumora. NSE je nezavisan prognostički faktor od velikog značaja u SCLC. Povećanje NSE tokom terapije ukazuje na progresiju bolesti. Određivanje NSE ne može da zameni kliničku evaluaciju tokom ili nakon hemoterapije. Povećane vrednosti NSE su nađene kod 80% svih pacijenata. Osetljivost NSE kod SCLC je između 55–99% u poređenju sa 5–21% za NSCLC. Tumorski marker s najvećom osetljivošću u SCLC je NSE, a zatim LDH. NSE korelira pozitivno sa brojem metastatskih mesta, ali ne i sa metastazama u specifičnim oblastima i na njega ne utiču metastaze mozga. NSE nema ulogu u proceni stadijuma bolesti (39–45). Kako je NSE prisutan u eritrocitima, plazma ćelijama i trombocitima, serum ili plazma moraju da se odvoje od

eritrocita u toku 60 minuta nakon venepunkcije kako bi se izbegli lažno visoki rezultati. Uzorci seruma trebalo bi da se čuvaju na $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ ili na $-70 \text{ }^\circ\text{C}$. NSE se određuje NSE-RIA testom (gornja granica referentnog intervala iznosi $12,5 \mu\text{g/L}$), NSE-DELFIJA (95% intervali pouzdanosti kod zdravih žena i muškaraca su 2,9–9,6 i 3,4–11,7 $\mu\text{g/L}$).

Tumor M2-PK. Značajno povećane koncentracije tumorskog markera koreliraju sa uznapredovalim stadijumom tumora. Najbolja korelacija sa stadijumom tumora dobijena je za M2-PK i CYFRA 21-1. Generalno, veća osetljivost za NSCLC bila je 65% za tumor M2-PK, 42% CEA i 58% CYFRA 21-1. Zbog toga tumor M2-PK i CYFRA 21-1 mogu da se koriste za praćenje bolesti, utvrđivanje progresije tumora ili regresije tokom hemoterapije (46–48).

Anti-Hu antitela. Pacijenti sa SCLC sa paraneoplastičnim neurološkim manifestacijama (periferna neuropatija, cerebelarna degeneracija) imaju mnogo indolentniji tok bolesti nego oni bez ovih manifestacija. Veći titar antineuronskih antitela (anti-Hu) nađen je u serumu i cerebrospinalnoj tečnosti SCLC pacijenata sa paraneoplastičnim encefalomijelitisom/senzornom neuronopatijom. Kod pacijenata koji su dobijali terapiju, anti-Hu su povezana sa ograničenim stanjem bolesti, kompletnim odgovorom na lečenje i dužim preživljavanjem. Anti-Hu je nezavisan prediktor kompletnog odgovora na terapiju, ali ne i preživljavanja pomoću multivarijantne analize (49).

Karcinoembriogeni antigen (CEA). CEA je transmembranski jednonačani glikoprotein sastavljen od 641 aminokiseline, molekulske mase 180–200 kDa. On funkcioniše kao homotipska ćelijska adhezijska molekula i heterotropni hemoatraktant za neutrofile. CEA je jedan od onkofetalnih antigena koji se sintetišu tokom razvoja embriona i fetusa. Poluživot CEA je nekoliko nedelja. CEA familija gena sastoji se od oko 17 aktivnih gena svrstanih u dve podgrupe. Prva podgrupa sadrži CEA i nespecifične unakrsno-reaktivne antigene (NCA); druga sadrži glikoproteine specifične za trudnoću (PSG). CEA je povećan kod 45% kancera pluća. Kod kancera pluća, određivanje CEA je vrlo važno u dijagnostici NSCLC (više od 65% pacijenata ima povećan CEA) i u praćenju kancera pluća. CEA ima relativno veliku osetljivost za mnoge uznapredovale adenokarcinome (primarno kolon, dojka, želudac i kancer pluća). Referentne vrednosti CEA, kao jednog od najispitivanijih tumorskih markera u onkologiji, uključujući i kancer pluća, su do 5 ng/mL. Osetljivost merenja CEA i koncentracija CEA u serumu je najveća kod adenokarcinoma i makrocelularnih karcinoma. Primena CEA kao markera kod SCLC je ograničena. Mada testovi za određivanje CEA imaju malu osetljivost i specifičnost za postavljanje dijagnoze tumora pluća, nekoliko izveštaja ukazuje da su povećane preoperativne vrednosti CEA povezane sa uznapredovalom bolešću i sa veoma kratkim preživljavanjem. Nije utvrđena korelacija koncentracije CEA, veličine primarnog tumora,

stadijuma TNM, broja uključenih organa ili mesta pojave metastaza. Egzaktni mehanizam povećanja koncentracije CEA u serumu kod karcinoma pluća ostaje nerazjašnjen. CEA može da se koristi u diferencijalnoj dijagnostici NSCLC, posebno u kombinaciji sa CYFRA 21-1. CEA može da pruži prognostičke informacije u NSCLC, naročito kod adenokarcinoma pluća, a ima ulogu i u praćenju terapije u uznapredovalim stadijumima i detekciji recidiva NSC adenokarcinoma. CEA ima značajnu ulogu u određivanju metastatske bolesti, pošto su povećane vrednosti CEA utvrđene kod neresektibilnih NSCLC pacijenata sa udaljenim metastazama. Kod pacijenata podvrgnutih hemoterapiji, a koji reaguju na terapiju utvrđeno je smanjenje vrednosti CEA. Zbog toga je CEA koristan indikator napredovanja bolesti, koristan klinički terapijski marker i može imati potencijalno prognostičku vrednost.

Povećanje koncentracije CEA utvrđeno je kod 13,6% pušača u poređenju sa 1,8% nepušača. Povećane vrednosti CEA utvrđene su kod pacijenata sa hroničnom opstruktivnom bolešću pluća (COPD) i infekcijom pluća, uključujući i tuberkulozu. Povećane koncentracije CEA utvrđene su i kod hepatitisa, ciroze jetre, pankreatitisa, ulcerativnog kolitisa i u Chronovoj bolesti. Vrednosti CEA su niže u ranijim stadijumima kod pacijenata sa NSCLC u poređenju sa neoperabilnim ili metastatskim bolestima. Vrednosti CEA su značajno veće kod pacijenata sa adenokarcinomom (50–57).

CA125. Vrednosti CA125 povećane su u cirozi jetre, hepatitisu, akutnom pankreatitisu i endometriozii, kao i kod 38% pacijenata s kancerom pluća. U poređenju sa pacijentima kod kojih su utvrđene normalne vrednosti CA125, pacijenti sa povećanim koncentracijama CA125 imaju lošiju prognozu. Vrednosti CA125 su niže kod pacijenata sa NSCLC u ranom stadijumu bolesti u poređenju sa pacijentima sa neoperabilnom ili metastatskom bolešću. Nije utvrđena statistički značajna povezanost između vrednosti CA125 i histološkog nalaza, ali je utvrđena korelacija između vrednosti CA125 i veličine tumora. Kod pacijenata koji reaguju na hemoterapiju utvrđeno je smanjenje vrednosti CA125. Zbog toga je CA125 koristan indikator napredovanja bolesti, operabilnosti i uspeha terapije; takođe može biti i prognostički marker. CA125 pripada porodici hibridoma-definisanih tumor markera. Izmerene vrednosti definisane su korišćenjem monoklonskog antitela (MAb) OC125. Antigenska determinanta CA125 smeštena je na glikoproteinu velike molekulske težine (200–1000 kD) izolovanom iz ćelijske kulture ili seruma. Antigenska determinanta CA125 ima proteinsku strukturu povezanu sa lancima ugljenih hidrata. Blago povećane vrednosti ovog markera takođe se mogu javiti u ranoj trudnoći i različitim benignim bolestima (npr. akutni i hronični pankreatitis, benigna gastrointestinalna oboljenja, bubrežna insuficijencija, autoimune bolesti itd.). Izrazito povišene vrednosti utvrđene su kod benignih oboljenja jetre kao što su ciroza i hepatitis. Ekstremno povišene vrednosti javljaju se u prisustvu

ascita nastalog kod malignih i benignih oboljenja (58–61).

Laktat dehidrogenaza (LDH). LDH je glikolitički enzim koji katalizuje reverzibilnu oksidaciju laktata u piruvat. Distribuiran u brojnim tkivima, posebno u miokardu, bubregu, jetri, mišićima i eritrocitima. Enzim LDH prisutan je u SCLC tumorskim ćelijama; ukazuje na zahvaćenost jetre. Metastaze u jetri utvrđene su kod 25% pacijenata sa SCLC. LDH je dobar nezavisan prognostički faktor u SCLC. Veliki procenat pacijenata sa povećanom aktivnošću enzima jetre ne odgovara adekvatno na terapiju. Serijska merenja LDH često odslikavaju klinički odgovor. U poređenju sa LDH, NSE je superiorniji. Vrednosti LDH su retko normalne kod pacijenata kod kojih je zahvaćena koštana srž. Preporuka je da pacijenti sa normalnom vrednošću LDH ne treba da se podvrgavaju invazivnom pregledu koštane srži. LDH se oslobađa kao rezultat oštećenja ćelija. Povećanje aktivnosti LDH kod maligniteta nije specifično. Utvrđeno je da nivoi LDH u serumu koreliraju sa masom tumora kod čvrstih tumora i mogu biti prognostički indikator progresije bolesti. Nije utvrđena specifična povezanost izoformi LDH s kancerom pluća (34).

Kreatin kinaza BB (CK-BB). Povećane vrednosti CK-BB (standardna vrednost <10 ng/mL) mogu da se nađu u serumu pacijenata sa SCLC. On se povećava sa uznapredovalim stadijumom, zavisno od veličine tumora. Utvrđena je korelacija između broja metastaza i nivoa CK-BB (19% pacijenata sa jednom metastazom i 100% sa više metastaza imaju povećan CK-BB). Neki autori su utvrdili korelaciju sa odgovorom na hemoterapiju, kao i prognostičku vrednost ovog markera u predikciji toka bolesti (nedovoljno ispitana) (34).

Hromogranin A (CgA). CgA je 68 kDa protein sekretornih granula u normalnim tkivima i u APUD (definisanim) tumorima. Koncentracije CgA su povećane kod 65% SCLC pacijenata. CgA je manje koristan u diskriminaciji između kancera pluća i benignih bolesti pluća. On je naročito značajan za detekciju neuspeha lečenja, za koje je on superiorniji u odnosu na druge markere. Kod većine pacijenata koji inicijalno ne odgovaraju na hemoterapiju primećeno je povećanje koncentracije CgA tokom lečenja i 78% pacijenata je imalo povećane vrednosti u vreme recidiva (62–65).

Neuronska adhezijska molekula (NCAM). NCAM je 140–180 kDa sialoglikoprotein koji pripada superfamiliji imunoglobulina (standardna vrednost <20 IU/mL). Učestvuje u mehanizmima procesa adhezije i agregacije koji su uključeni u metastatsko ponašanje kancera. Velike koncentracije NCAM su detektovane u serumu 21–51% SCLC pacijenata, dok serumski NSCLC pacijenata ili zdravih osoba nisu bili pozitivni. Pacijenti kod kojih je povećan NCAM imaju značajno kraće preživljavanje u odnosu na pacijente sa normalnim vrednostima. Serijska merenja NCAM mogu da budu od važnosti u praćenju terapije kod pacijenata sa SCLC čiji su nivoi pre terapije bili u patološkom opsegu (34).

Atrijalni natriuretički peptid (ANP). ANP je prisutan u nekoliko tkiva, uključujući SCLC. Povećane koncentracije ANP u plazmi utvrđene su kod pacijenata s neadekvatnom sekrecijom antidiuretičkog hormona (SIADH) zbog SCLC (standardna vrednost <33 ng/L). Neki autori utvrdili su povezanost između ektopične produkcije ANP, natrijuma u serumu i ishoda kod pacijenta u SCLC. Pacijenti sa ekstenzivnim SCLC i hiponatrijemijom imaju kraće preživljavanje od pacijenata sa ekstenzivnim stadijumom SCLC i normalnim vrednostima natrijuma u serumu (34).

Molekularni markeri kod kancera pluća

Dve klase gena su uključene u razvoj kancera: onkogeni (geni ćelijske aktivacije) i supresorni geni (geni uključeni u prepoznavanje i reparaciju oštećene DNK). Onkogeni nastaju iz protoonkogeni koji mogu da se aktiviraju dominantnim mutacijama, kao što su tačkaste mutacije, insercije, delecije, translokacije ili inverzije. Većina onkogeni kodira proteine koji funkcionišu na određenom stadijumu aktivacije proliferacije ćelija i njihova aktivacija dovodi do deobe ćelija. Supresorni geni su izolovani uglavnom iz čvrstih tumora. Onkogenost supresornih gena potiče od gubitka gena pre nego od aktivacije onkogenima. Delecija ili monozomija mogu da dovedu do gubitka tumor supresornih gena. Glavni tumor supresorni gen, p53, funkcioniše u reparaciji oštećene DNK u apoptozi. Reparacija je posredovana aktivacijom produkcije p21, koji blokira ćelijski ciklus u kasnoj G1 fazi kako bi omogućio reparaciju. Gubitak funkcije ovog gena uzrokovan mutacijom može rezultirati nemogućnošću procesa reparacije DNK i vodi razvoju tumora.

p53. Tumor supresorni gen p53 nalazi se na hromozomu 17p13.1 i kodira 53-kDa nuklearni fosfoprotein koji ima ulogu u regulaciji transkripcije u ćelijskom jedru, naročito kao odgovor na dejstvo agenasa koji oštećuju DNK. On je najfrekventniji mutirani gen u NSCLC. Mutacije u p53 genu utvrđene su kod 32–52% NSCLC pacijenata. Glavni tip tačkaste mutacije je GC u TA transverzija, uzrokujući misens mutacije i smatra se da je povezana sa benzo (a) pirenom-indukovanim oštećenjem uzrokovanim pušenjem duvana. p53 misens mutacije vode povećanju poluživota proteina, tj. povećanju nivoa proteina p53 koji se može detektovati imunohistohemijski. Neke studije ukazale su da su promene u ekspresiji p53 povezane s lošijom prognozom, dok velika studija na 871 osobi s kancerom pluća nakon resekcije nije potvrdila ovu povezanost. Prekomerna ekspresija p53 u SCLC nađena je kod 50% svih uzoraka SCLC.

c-erbB-2. c-erbB-2 gen (poznat kao HER2/neu) kodira 185 kDa protein-transmembranski receptor koji pripada EGF (epidermalni faktor rasta) familiji tirozin kinaznih receptora. Ovaj protein se eksprimira u malim koncentracijama u normalnom cilijarnom bronhijalnom epitelu. Povećana ekspresija HER2/neu utvrđena

je kod 13–80% adenokarcinoma, 2–45% skvamoznih ćelija karcinoma i 0–20% makrocelularnih karcinoma. Različiti rezultati su publikovani po pitanju uticaja HER2/neu prekomerne ekspresije u NSCLC. Korišćenjem RT-PCR, veoma osetljivog i specifičnog za kvantifikaciju iRNK HER2/neu, povećana ekspresija HER2/neu detektovana je kod 34,9% NSCLC pacijenata. Povećana ekspresija se navodi kao nezavisni prognostički faktor preživljavanja u NSCLC. Prekomerna ekspresija EGFR u NSCLC od 32–47% u NSCLC određena je u različitim studijama koristeći imunohistohemijske metode (66–68).

Ras. Članovi ras familije (H-ras, K-ras i N-ras) kodiraju protein udružen sa membranom, 21kDa GTP vezujući protein uključen u transdukciju signala. Ovi proteini su obično aktivni samo kada je GTP vezan i inaktivira se kada GTP hidrolizuje u GDP. Dominantni mutant onkogeni postaju aktivni usled mutacija u 12, 13 ili 61 kodonu. Kontinuirano aktivan ras protein uzrokuje neregulisanu interakciju sa efektornim proteinima što rezultira nekontrolisanom signalnom kaskadom. Tačkaste mutacije ras gena nađene su kod 30% NSCLC slučajeva. Specifični tip mutacije varira između različitih histoloških tipova. Mutacije u K-ras onkogeni detektovane su kod 30–80% NSCLC slučajeva, u zavisnosti od korišćene metodologije. K-ras mutacije povezane su sa adenokarcinomima, a posebno mutacija u kodonu 12 K-rasa za koju je utvrđena povezanost sa rizikom od nastanka adenokarcinoma kod pušača. Postojeći podaci razmatraju uticaj K-ras mutacija na preživljavanje, ali su dobijeni rezultati kontradiktorni. Prisustvo K-ras mutacija u tumorima može da se koristi kao skrining marker u budućnosti. Kod osoba sa NSCLC adenokarcinomom koje sadrže K-ras mutaciju u 12. kodonu, identične mutacije mogu biti detektovane u 45% uzoraka sputuma (34).

Bcl-2. Produkt BCL-2 protoonkogeni eksprimira 25 kDa protein od 239 aminokiselina lokalizovan primarno u membrani mitohondrija i u drugim ćelijskim membranama koji inhibira apoptozu i doprinosi preživljavanju ćelija kancera. Inhibicijom se sprečava oslobađanje citohroma C iz mitohondrija kao i inhibicija proteina, aktivirajućeg faktora 1 proteaza u apoptozi od iniciranja protin kaspazne kaskade koja vodi ka degradaciji DNK u apoptotičnim ćelijama. Imunohistohemijske studije su pokazale da se BCL-2 protein eksprimira kod 75–90% SCLC u poređenju sa 10–35% NSCLC, gde je ekspresija veća u skvamoznim ćelijama karcinoma nego u adenokarcinomima. BCL-2 ekspresija je razmatrana kao značajan marker za preživljavanje pacijenata sa SCLC, ali ne korelira značajno sa preživljavanjem pacijenata sa SCLC (69).

Retinoblastoma (Rb) gen. Prvi otkriveni tumor supresorni gen bio je Rb gen koji uslovljava familijarne dečije retinoblastome. Ovaj gen lociran je na 13q.14.11 hromozomu i kodira 105kDa nuklearni fosfoprotein koji je uključen u kontrolu ćelijskog ciklusa tokom G0/G1 faze. Rb protein je deo p16/ciklin

D1/CDK4/Rb puta za koji se veruje da je povezan sa kancerom pluća. Skoro svi tumori imaju abnormalnosti u jednoj komponenti ovog puta; abnormalnosti Rb proteina utvrđene su kod 15–30% NSCLC. Utvrđeno je da je odsustvo ekspresije Rb proteina povezano sa lošom prognozom. Ovi rezultati nisu potvrđeni u drugim kliničkim studijama. Kod više od 90% SCLC tumora detektovane su abnormalnosti Rb proteina sa delecijom ii mutacijom »pocket« domena kao i hipofosforilacijom. SCLC Rb protein-negativan nalaz utvrđen je u više od 90% slučajeva, a karcinoidi pluća su Rb-protein pozitivni kod 92% slučajeva. Nije utvrđena korelacija između Rb ekspresije i proliferacije ćelija kancera pluća. Analiza kliničkih podataka nije ukazala na asocijaciju između Rb statusa i širenja bolesti, kliničkog odgovora na hemoterapiju, ukupnog preživljavanja ili metastaza limfnih čvorova (34).

Ciklin E. Progresija kroz G1-S tranziciju i S fazu ćelijskog ciklusa posredovana je ciklin-zavisnom kinazom 2 (cdk2), koja interaguje sa nekoliko ciklina. Dva od njih, ciklin E i ciklin A2 (poznat i kao ciklin A), ekspimiraju se povećano u mnogim kancerima. Ciklin E2 i ciklin A1 su nedavno otkriveni cdk2-interagujući ciklini koji su nađeni u liniji malignih tumorskih ćelija i u akutnoj mijeloidnoj leukemiji. Takođe su analizirane ekspresija i prognostički značaj sa cdk2 povezanim ciklinima kod NSCLC koristeći sveže zamrznute biopsije nakon kompletne resekcije tumora sa stadijumom I do IIIA NSCLC. Ekspresija gena analizirana je kvantitativnim RT-PCR. Nivoi ekspresije ciklina E i A2 su značajno veći u uzorcima tumora nego kod zdravih kontrola. Nivoi ekspresije ciklina A1, ciklina A2 i ciklina E2 nemaju prognostički značaj za preživljavanje. Ciklin E povezan je sa razvojem metastaza, a imunohemijskim analizama potvrđeno je da je ekspresija iRNK ciklina E povezana sa ekspresijom proteina ciklina E. Ciklin D1 i ciklin E pokazivali su se značajnim u prognozi SCC ali ne i kod drugih tipova ćelija. Za ciklin E, stadijumi I i II SCC sa manje od 50% imunopozitivnosti imali su lošiju prognozu (70).

Myc. Myc onkogeni: c-myc (ćelijski), N-myc (ili MYCN, inicijalno izolovan iz ćelija neuroblastoma), L-myc (ili MYCL, prvo izolovan iz SCLC ćelija) kodiraju nuklearne DNK vezujuće proteine, koji su uključeni u regulaciju transkripcije. Njihov protoonkogeni produkt aktivira nishodno gene koji stimulišu deobu ćelije posle heterodimerizacije. Od svih gena myc familije, c-myc je najčešće aktiviran u NSCLC i SCLC, dok se abnormalnosti N-myc i L-myc obično javljaju samo u SCLC. Generalno, samo jedan član myc familije aktivira se u svakom individualnom tumoru. Aktivacija myc gena rezultira povećanom ekspresijom kroz multiplikovanu amplifikaciju gena (20 do 115 kopija po ćeliji). Studije su pokazale da amplifikacija c-myc gena u primarnim tumorima korelira sa skraćenim preživljavanjem i da myc amplifikacija DNK u tumorskoj ćelijskoj liniji dobijenih od pacijenata lečenih hemoterapijom povezana sa značajno smanjenim preživljavanjem. DNK amplifikacija myc familije javlja se mnogo češće kod uzoraka

pacijenata na hemoterapiji u poređenju sa pacijentima koji nisu na hemoterapiji (34).

Koristeći RDA (representational difference analysis) tehniku identifikovano je još šest gena koji se prekomerno ekspimiraju kod adenokarcinoma pluća: Lc19, kristalin-mu, hijaluronan vezujući protein 2, ceruloplazmin, integrin alfa-11, kolagen tip XI alfa 1. Lc19, kristalin-mu, hijaluronan vezujući protein 2 su mnogo specifičniji za adenokarcinom, dok su integrin alfa-11, kolagen tip XI alfa 1 povećani i kod adenokarcinoma i kod karcinoma skvamoznih ćelija (71).

Markeri metilacije kod tumora pluća

Promene u metilaciji DNK su česte promene kod humanih kancera. Ona može imati implikacije na poremećaje genske ekspresije, strukturu hromozoma i organizaciju hromatina. Aberantna metilacija normalno nemetiliranih CpG-bogatih oblasti, poznatih kao CpG ostrvca, koje su locirane u ili u blizini promotorskog regiona mnogih gena, udružene su sa inaktivacijom transkripcije definisanih tumor supresornih gena (TSGs) u humanom kanceru. Aberantna metilacija može da služi kao alternativa genetskom gubitku funkcije TSG delecijom ii mutacijom.

Aberantna metilacija promotora opisana je za nekoliko gena u različitim malignim bolestima, uključujući kancer pluća. U NSCLC metilacija je detektovana za: receptor β -2 za retinoičnu kiselinu (RAR β) u 40%, tkivni inhibitor metaloproteinaze 3 (TIMP3) kod 26%, P16^{INK4a} kod 25%, O⁶-metilguanin-DNA-metiltransferaza (MGMT) kod 21%, DAPK u 19%, E-kaderin (ECAD) u 18%, P14ARF u 8%, glutation S-transferazu P1 (GSTP1) u 7% primarnih tumorskih tkiva. Nasuprot NSCLC, uloga metilacije CpG ostrvaca u SCLC manje je ispitivana. Utvrđena je aberantna metilacija P2 promotora RAR beta receptora kod 72% ispitivanih SCLC i metilacija APC promotora 1A kod 26% SCLC ispitivane ćelijske linije. Visoka frekvencija metilacije tumor supresornog gena RASSF1A kod SCLC dobijena je kod nekoliko različitih nezavisnih ispitivanih grupa. RASSF1A metilacija utvrđena je kod 72%, 100% i 79% prema različitim studijama kod pacijenata sa SCLC. Aberantna metilacija APC promotora 1A, RAR beta promotora P2, RASSF1A promotora povezana je sa gubitkom njegove genske ekspresije kod SCLC, ukazujući na fundamentalnu ulogu epigenetskih promena u patogenezi ove maligne bolesti. Implikacija ovih epigenetskih promena za dijagnozu i lečenje SCLC nije još uvek određena (72–77).

Mikrometastaze kod kancera pluća

Mikrometastaze limfnih čvorova. Kod pacijenata sa kancerom pluća koji nemaju znake sistemskog širenja tumora, najznačajniji prognostički faktor je prisustvo ili odsustvo metastaza u regionalnim limfnim čvorovima. Patolog ima mogućnost samo 1% da utvrdi male

metastatske fokuse kancera. Nekoliko studija je utvrdilo da je detekcija diseminovanih tumorskih ćelija u limfnim čvorovima imunohistohemijski nezavisan prediktor ranog recidiva kod pacijenata sa NSCLC. Za detekciju mikrometastaza u limfnim čvorovima korišćena su anti-citokeratin antitela, anti-epitelijalnih antitela Ber-EP-4 u regionalnim limfnim čvorovima, primarno monoklonsko antitelo CAM 5.2 za detekciju okultnih metastaza u limfnim čvorovima kod pacijenata sa stadijumom I NSCLC, monoklonsko anticitokeratin antitelo AE1/3 kod T1 adenokarcinoma. Pacijenti sa p53 pozitivnim limfnim čvorovima imali su značajno kraće preživljavanje nego pacijenti bez okultnih metastaza limfnih čvorova. Najnoviji testovi zasnivaju se na RT-PCR i služe za detekciju metastaza u limfnim čvorovima. Osetljivost i specifičnost iRNK transkripta za klasifikaciju limfnih čvorova u NSCLC nije još uvek utvrđena. (78)

Mikrometastaze u koštanoj srži kod kancera pluća. Koštana srž je jedan od najčešćih metastatskih mesta u SCLC. Koristeći imunohemijske tehnike koje imaju osetljivost da detektuju jednu u 10000 ćelija, detektovane su mikrometastaze u koštanoj srži kod 13–54% novodijagnostifikovanih pacijenata sa ograničenom bolešću i kod 44–77% pacijenata sa uznapredovalim SCLC. Korišćenjem antitela usmerenih na ćelijske antigene kod SCLC utvrđeno je da su rezidualne tumorske ćelije u koštanoj srži pacijenata sa SCLC u fazi remisije prediktori recidiva. Za detekciju metastaza u koštanoj srži korišćeno je monoklonsko antitelo koje prepoznaje adhezivne molekule neurona (NCAM/CD56), a detekcija mikrometastaza u koštanoj srži poboljšana je korišćenjem monoklonskog antitela MluC1 na Le^Y antigen eksprimiranog na ćelijskoj membrani SCLC ćelija. Detekcija mikrometastaza u koštanoj srži kod pacijenata sa SCLC može da pomogne u definisanju stadijuma bolesti, kao i bolesnika kojima bi se moglo pomoći hirurškom intervencijom ili kombinovanom terapijom koja bi uključivala operaciju. Nekoliko studija ispitivalo je prisustvo okultnih metastaza u koštanoj srži operisanih NSCLC pacijenata. Detekcija okultnih metastaza u koštanoj srži bila je značajno povezana sa veličinom i histološkim tipom primarnog tumora. Studije u kojima je korišćena imunohistohemija i CK2, dva specifična antitela na keratin AE1 i CAM 5.2 u kombinaciji, kombinacija imunohistohemije i monoklonskog antitela CK2, kao i imunobojenje p53 proteina, korišćenjem antitela AE1/AE3, Ber-EP-4 i klon MNF116, dale su različite rezultate u smislu identifikacije tumora i prisustva mikrometastaza u koštanoj srži, povezanosti recidiva kancera, kao i preživljavanja kod ovih pacijenata. Postoje brojni dokazi koji ukazuju da prisustvo mikrometastatskih ćelija u koštanoj srži ima klinički značajan efekat kod pacijenata sa NSCLC. Potrebno je utvrditi standardizovani protokol kako bi rezultati različitih studija mogli da se upoređuju (79–81).

Slobodne ćelije kancera u krvi pacijenata sa kancerom pluća. Cirkulišuće ćelije kancera mogu da ukažu na prisustvo kancera (u dijagnostičke svrhe) ili diseminaciju kancera (za prognozu i praćenje terapije). Veliki

broj studija bavio se detekcijom cirkulišućih tumorskih ćelija u krvi pacijenata sa NSCLC tehnikama koje se zasnivaju na PCR. Ove tehnike zasnivaju se na činjenici da se specifični transkripti iRNK selektivno ekspimiraju u ćelijama kancera koje su od značaja, ali ne i u netransformisanim normalnim ćelijama. Prisustvo takvih transkripta uzima se kao indirektan dokaz prisustva intaktnih tumorskih ćelija u uzorku, pošto se RNK brzo degradira po oslobađanju iz ćelije. U iste svrhe korišćena je i tehnologija flow citometrije sa magnetnom separacijom ćelija kancera. Utvrđeno je da su pacijenti sa uznapredovalim stadijumom kancera mnogo češće pozitivni na cirkulišuće ćelije kancera i da količina ćelija kancera ima prognostički značaj. Korišćenjem nested RT-PCR amplifikovana je CK19 iRNK i otkrivena je kod oko 40% pacijenata sa adenokarcinomom i karcinomom skvamoznih ćelija, iRNK CEA kod 80% pacijenata sa udaljenim metastazama, EGFR-iRNK kod 57% pacijenata sa stadijumom IV NSCLC, iRNK pre-progastrin-oslobađajućeg peptida za detekciju okultnih ćelija kancera u perifernoj krvi pacijenata sa NSCLC. Uticaj slobodnih tumorskih ćelija u perifernoj krvi pacijenata sa SCLC nije detaljno evaluiran. U literaturi se nalazi mali broj studija o detekciji tumorskih ćelija u krvi pomoću RT-PCR ili o prisustvu genetskih alteracija DNK. Korišćenjem RT-PCR iRNK citokeratina 19 utvrđeno je da 27% SCLC pacijenata ima cirkulišuće ćelije kancera. Amplifikacijom iRNK neuromedin B receptora (NMB-R) utvrđeno je da je 32% pacijenata bilo pozitivno na NMB-R, a pacijenti sa proširenom bolešću pokazali su veći stepen NMB-R u odnosu na one sa ograničenom bolešću (44% prema 19%). Preživljavanje NMB-R pozitivnih pacijenata bilo je značajno kraće u odnosu na NMB-R negativne pacijente. Preprogastrin-oslobađajući peptid RT-PCR testom nađeno je da je on osetljiv za detekciju ćelija kancera u perifernoj krvi i sputumu SCLC i NSCLC pacijenata. Krv SCLC kod 50% pacijenata bila je pozitivna na diseminovani kancer. 69% pacijenata sa proširenom bolešću bilo je pozitivno u poređenju sa 31% pacijenata sa ograničenom bolešću. Teško je utvrditi pouzdani iRNK marker za detekciju mikrometastaza u perifernoj krvi pacijenata sa SCLC koje koreliraju sa preživljavanjem. Uprkos brojnim ograničenjima navedene tehnologije (varijabilnost u pripremi uzorka i kvantifikaciji), smatra se da će se ova metoda u budućnosti koristiti za postavljanje dijagnoze, prognozu i praćenje terapije (82, 83).

Slobodne nukleinske kiseline

Cirkulišuće DNK i RNK poznate su od 1970 tih, ali su neoplastične karakteristike DNK prepoznate tek 1980-tih. Cirkulišuće DNK i RNK su markeri određenih tipova kancera. Da bi koristili DNK kao marker kancera, mora da postoji način diferenciranja normalne od neoplastične DNK. Ovo se postiže detekcijom mutacija u cirkulišućoj DNK ili detekcijom hromozomskih translokacija koje uzrokuju kancer. Epigenetske promene

ne u cirkulišućoj DNK, takođe mogu biti detektovane. Mada je ova tehnologija relativno nova, tokom sledećih decenija detekcija cirkulišuće DNK trebalo bi da se pridoda velikom broju klinički korisnih markera. Pitanja koja su još uvek nepoznanica su izvori slobodne DNK, tj. postojeće forme DNK ili RNK (84–88).

Prognostički markeri multimodalitetne terapije kod tumora pluća

Terapija NSCLC kod oko 80% svih tumora pluća je operativni zahvat. Polovina pacijenata sa NSCLC javlja se u inoperabilnom stadijumu bolesti (IIIb ili IV). Ovi pacijenti su kandidati za hemioterapiju i radioterapiju. Oko 25% pacijenata sa NSCLC ima lokalno uznapredovali stadijum bolesti IIIa. Ovi pacijenti tretiraju se hemoterapijom ili radiohemoterapijom nakon operativnog zahvata.

Nasuprot SCLC, pacijenti sa NSCLC samo su ograničeno osetljivi na hemoterapiju, 20–40%, uglavnom zbog rezistencije na lekove. Noviji podaci ukazuju da multimodalitetna terapija može produžiti preživljavanje, te je zbog toga vrlo važno identifikovati pacijente koji odgovaraju na hemioterapiju ili radioterapiju kako bi im se omogućilo što adekvatnije lečenje.

Serumski tumorski markeri CEA i CA125. CEA i CA125 su serumski tumorski markeri koji mogu da se koriste za praćenje odgovora na terapiju kod pacijenata sa različitim čvrstim tumorima. Vrednosti CEA i CA125 sa novodijagnostikovanim NSCLC korelirali su sa stadijumom, histopatologijom i odgovorom na hemoterapiju. Vrednosti CEA i CA125 su manje kod pacijenata u ranim stadijumima bolesti u poređenju sa pacijentima sa neoperabilnim tumorima ili sa metastazama. Vrednosti CEA su znatno veće kod pacijenata sa adenokarcinomom, ali nije utvrđena statistički značajna povezanost između histološkog tipa tumora i CA125. Postoji korelacija vrednosti CEA i CA125 i veličine tumora. Pad vrednosti CEA i CA125 ukazuje na uspešan odgovor na hemoterapiju.

NSE i LDH. Neuron specificna enolaza i laktat dehidrogenaza su serumski tumorski markeri kod SCLC. Određivanje serumske vrednosti NSE i LDH koristi se pre početka lečenja u cilju predikcije odgovora na hemoterapiju kod SCLC. Korišćenjem dipiridamolom modulirane Tc-99m sestamibi (dipirimadolMibi) foton emisione kompjuterizovane tomografije (SPECT) evaluiran je kapacitet predviđanja odgovora na hemoterapiju kod SCLC pacijenata. Studija je pokazala da je promena odnosa tumor/normalni plućni odnos (T:NL) nakon infuzije dipirimadola bila statistički značajno veća kod onih koji odgovaraju na terapiju u poređenju sa onim koji ne odgovaraju na terapiju. Vrednosti NSE i LDH u serumu pre početka lečenja nisu korelirale sa odgovorom na hemoterapiju. Povećanje T:NL nakon infuzije dipirimadola je jak negativan prediktor hemoterapeutskog odgovora kod SCLC pacijenata.

p53, c-erbB-2 i neuroendokrini markeri. Nekoliko studija pokazalo je da pacijenti sa NSCLC sa neuroendokrinim tumorima mogu bolje da reaguju na hemoterapiju. Dodatno, povećana ekspresija p53 i c-erbB-2 može da doprinese relativnoj rezistenciji na hemoterapiju i skraćenom preživljavanju.

Topo II α -, topo II β -, Ki-67 i MRP. In vitro studije su pokazale da postoji povezanost između ekspresije topozimeraze i rezistencije na hemoterapiju kod ćelijske linije kancera pluća. Pacijenti sa NSCLC koji imaju povećano ekspimiranu topo II α imaju značajno kraće preživljavanje u poređenju sa pacijentima koji imaju manju ekspresiju topo II α . Kod pacijenata sa SCLC sledeći faktori se navode kao prediktori kratkog preživljavanja: povećana ekspresija topo II α , Ki-67 i BCL-2 (89, 90).

Zaključak

Pojedinačne tumorske markere ne treba koristi za skrining asimptomatskih pacijenata ili visokorizičnih grupa pacijenata (npr. pušača).

Nije utvrđen nijedan tumorski marker koji bi bio specifičan isključivo za kancer pluća ili tkivo pluća. Zavisno od istorije bolesti, određivanje CYFRA 21-1, CEA, NSE i/ili proGRP može biti korisno kod pacijenata s kancerom pluća pre prve terapije. Ukoliko se histološki nalaz ne može dobiti pre operacije, merenje sva četiri markera je neophodno kako bi se identifikovao vodeći tumorski marker (obično onaj koji je prisutan u najvećoj koncentraciji). Ukoliko se sumnja na neoperabilni tumor, a histološki nalaz nije moguće dobiti, povećane vrednosti NSE u serumu i posebno proGRP ukazuju na mikrocelularni karcinom, dok povećane vrednosti SSC-Ag ukazuju na kancer skvamoznih ćelija. Preporuke NACB (National Academy of Clinical Chemistry) za korišćenje serumskih tumorskih markera kod karcinoma pluća prikazane su u tabeli 1. Smanjenje

Tabela 1 Preporuke za korišćenje markera prema histologiji kancera pluća i forme aplikacije

Histološki tip tumora pluća	Pre terapije	Praćenje posle terapije
Nepoznat	CYFRA 21-1, CEA, NSE, ProGRP	Nakon operacije: nakon histologije U uznapredovalo bolesti: koristeći vodeći marker
Adenokarcinom	CYFRA 21-1 i CEA	CYFRA 21-1 i/ili CEA
Karcinom skvamoznih ćelija	CYFRA 21-1 i CEA (SCC-Ag)	CYFRA 21-1 i/ili CEA (SCC-Ag)
Gigantocelularni karcinom	CYFRA 21-1 i CEA	CYFRA 21-1 i/ili CEA
Mikrocelularni karcinom	NSE i ProGRP	NSE i/ili ProGRP

vrednosti tumorskih markera nakon primarnog operativnog zahvata prvi je znak uspešne operacije. Nakon kratkotrajnog porasta neposredno nakon hirurške intervencije, zbog oslobađanja markera iz operativno oštećenog normalnog i tumorskog tkiva, očekuje se da se vrednosti CYFRA 21-1, TPA i SCC-Ag ($t_{1/2}$ 1,5–3h) brzo smanjuju dostižući vrednosti koje se nalaze u opsegu referentnih vrednosti u roku od 1–2 dana, dok CEA opada sporije jer mu je $t_{1/2}$ 1–4 dana. Ukoliko se isključujući disfunkcija bubrega ili jetre koje mogu uticati na produženje poluživota tumorskih markera, usporen klirens markera i/ili produžen plato indikatori su prisustva rezidualnih tumorskih ćelija i prediktori su ranog recidiva bolesti. Ukoliko se koncentracije tumorskih markera sporo smanjuju to takođe može ukazivati na rezidualni tumor. Tokom praćenja terapije, svako povećanje koncentracije tumorskih markera može biti prvi znak recidiva bolesti. Ovo povećanje se može evidentirati i do 12 meseci pre nego što se progresija bolesti detektuje imidžing tehnikama ili ispolji u obliku

kliničkih simptoma. Ovakva vrednost tumorskih markera je korisna u ranom iniciranju primene imidžing tehnika i sekundarnih intervencija. Posebnu pažnju kod praćenja terapije i toka bolesti određivanjem tumorskih markera, treba obratiti na preanalitičke faktore. Serijska određivanja tumorskog markera treba vršiti uvek sa testom istog proizvođača, koj moraju biti naznačeni na laboratorijskom izeštaju i dokumentovani u medicinskoj istoriji pacijenta. Poslednjih decenija učinjen je značajan pomak na polju istraživanja tumorskih markera. Primena tehnika molekularne biologije, uključujući i čip tehnologiju, trebalo bi da u godinama koje dolaze omogući veliki napredak na polju kliničke aplikacije tumorskih markera. Neophodno je sprovođenje prospektivnih i randomiziranih studija u budućnosti u smislu postavljanja dijagnoze, praćenja terapije i prognostičke svrhe kod pacijenata sa karcinomom pluća.

Zahvalnost. Rad je finansiran na osnovu ugovora br. 145010B sa MNTR Srbije.

Literatura

- Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 2000; 50: 7–33.
- Stieber P, Dienemann H, Hasholzner U, Fabricius PG, Schambeck C, Weinzierl M, et al. Comparison of CYFRA 21-1, TPA, and TPS in lung cancer, urinary bladder cancer, and benign diseases. *Int J Biol Markers* 1994; 9: 82–8.
- Ebert W, Dienemann H, Fateh-Moghadam A, Scheulen M, Konietzko N, Schleich T, et al. Cytokeratin 19 fragment CYFRA 21-1 compared with carcinoembryonic antigen, squamous cell carcinoma antigen and neuron specific enolase in lung cancer. Results of an international multicentre study. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994; 32: 189–99.
- Molina R, Filella X, Auge JM, Fuentes R, Bover I, Rifa J, et al. Tumor markers (CEA, CA 125, CYFRA 21-1, SCC and NSE) in patients with non-small cell lung cancer as an aid in histological diagnosis and prognosis. Comparison with the main clinical and pathological prognostic factors. *Tumour Biol* 2003; 24: 209–18.
- Sanchez De Cos J, Masa F, de la Cruz JL, Disdier C, Vergara C. Squamous cell carcinoma antigen (SCC Ag) in the diagnosis and prognosis of lung cancer. *Chest* 1994; 105: 773–6.
- Vassilakopoulos T, Troupis T, Sotiropoulou C, Zacharatos P, Katsaounou P, Parthenis D, et al. Diagnostic and prognostic significance of squamous cell carcinoma antigen in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001; 32: 137–44.
- Takeuchi S, Nonaka M, Kadokura M, Takaba T. Prognostic significance of serum squamous cell carcinoma antigen in surgically treated lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 9: 98–104.
- Ignacio I, Wistuba AF, Minna JD. Molecular genetics of small-cell lung carcinoma. *Sem Oncol* 2001; 28 (2, S4): 3–13.
- Cioffi M, Vietri MT, Gazerro P, Magnetta R, D'auria A, Durante A, et al. Serum anti-p53 antibodies in lung cancer: comparison with established tumor markers. *Lung Cancer* 2001; 33: 163–9.
- Schalthorn A, Fuerst H, Stieber P. Tumor markers in lung cancer. *J Lab Med* 2001; 25: 353–61.
- Kulpa J, Wojcik E, Reinfuss M, Kolodziejski L. Carcinoembryonic antigen, squamous cell carcinoma antigen, CYFRA 21-1, and neuron-specific enolase in squamous cell lung cancer patients. *Clin Chem* 2002; 48: 1931–7.
- Barlesi F, Gimenez C, Torre JP, Doddoli C, Mancini J, Greillier L, et al. Prognostic value of combination of Cyfra 21-1, CEA and NSE in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Respir Med* 2004; 98: 357–62.
- Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R. Clinical utility of cytokeratins as tumor markeres. *Clin Biochem* 2004; 37: 529–40.
- Stieber P, Hasholzner U, Bodenmüller H, Nagel D, Sunder-Plassmann L, Dienemann H, et al. CYFRA 21-1 – A new marker in lung cancer. *Cancer* 1993; 72: 707–13.
- Molina R, Agusti C, Filella X, Jo J, Joseph J, Gimenez N, et al. Study of a new tumor marker, CYFRA 21-1, in malignant and nonmalignant diseases. *Tumour Biol* 1994; 15: 318–25.
- Nakayama M, Satoh H, Ishikawa H, Fujiwara M, Kamma H, Ohtsuka M, et al. Cytokeratin 19 fragment in patients with nonmalignant respiratory diseases. *Chest* 2003; 123: 2001–6.
- Pujol JL, Quantin X, Jacot W, Boher JM, Grenier J, Lamy PJ. Neuroendocrine and cytokeratin serum markers as

- prognostic determinants of small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2003; 39: 131–8.
18. Ando S, Suzuki M, Yamamoto N, Iida T, Kimura H. The prognostic value of both neuron-specific enolase (NSE) and Cyfra21-1 in small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2004; 24: 1941–6.
 19. Van der Gaast A, Schoenmakers CH, Kok TC, Blijenberg BG, Cornillie F, Splinter TA. Evaluation of a new tumour marker in patients with non-small-cell lung cancer: CYFRA 21-1. *Br J Cancer* 1994; 69: 525–8.
 20. Takei Y, Minato K, Tsuchiya S, Takise A, Nakano H, Ezawa K, et al. CYFRA 21-1: an indicator of survival and therapeutic effect in lung cancer. *Oncology* 1997; 54: 43–7.
 21. Yeh JJ, Liu FY, Hsu WH, Wang JJ, Ho ST, Kao A. Monitoring cytokeratin fragment 19 (CYFRA 21-1) serum levels for early prediction of recurrence of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in the lung after surgical resection. *Lung* 2002; 180: 273–9.
 22. Buccheri G, Torchio P, Ferrigno D. Clinical equivalence of two cytokeratin markers in non-small cell lung cancer: a study of tissue polypeptide antigen and cytokeratin 19 fragments. *Chest* 2003; 124: 622–32.
 23. Kulpa J, Wojcik E, Radkowski A, Kolodziejski L, Stasik Z. CYFRA 21-1, TPA-M, TPS, SCC-Ag and CEA in patients with squamous cell lung cancer and in chemical industry workers as a reference group. *Anticancer Res* 2000; 20: 5035–40.
 24. Foa P, Fornier M, Miceli R, Seregini E, Santambrogio L, Nosotti M, et al. Tumour markers CEA, NSE, SCC, TPA and CYFRA 21.1 in resectable non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 1999; 19: 3613–8.
 25. Nisman B, Lafair J, Heching N, Lyass O, Baras M, Peretz T, et al. Evaluation of tissue polypeptide specific antigen, CYFRA 21-1 and carcinoembryonic antigen, in nonsmall cell lung carcinoma. Does the combined use cytokeratin marker give any additional information? *Cancer* 1998; 82: 1850–9.
 26. Boher JM, Pujol JL, Grenier J, Daures JP. Markov model and markers small cell lung cancer: assessing the influence of reversible serum NSE, CYFRA 21-1 and TPS levels on prognosis. *Br J Cancer* 1999; 79: 1419–27.
 27. Ho YJ, Hsieh JF, Tasi SC, Lee JK, Kao CH. Tissue polypeptide specific antigen and squamous cell carcinoma antigen for early prediction of recurrence in lung squamous cell carcinoma. *Lung* 2000; 178: 75–80.
 28. Sun SS, Hsieh JF, Tsai SC, Ho YJ, Kao CH. Tissue polypeptide-specific antigen and carcinoembryonic antigen for early prediction of recurrence in lung adenocarcinoma. *Am J Clin Oncol* 2000; 23: 605–8.
 29. Stieber P, Dienemann H, Hasholzner U, Muller C, Poley S, Hofmann K, et al. Comparison of cytokeratin fragment 19 (CYFRA 21-1), tissue polypeptide antigen (TPA) and tissue polypeptide specific antigen (TPS) as tumour markers in lung cancer. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1993; 31: 689–94.
 30. Giovanella L, Ceriani L, Bandera M, Beghe B, Roncari G. Evaluation of the serum markers CEA, NSE, TPS and CYFRA 21.1 in lung cancer. *Int J Biol Markers* 1995; 10: 156–60.
 31. Ebert W, Hoppe M, Muley T, Drings P. Monitoring of therapy in inoperable lung cancer patients by measurement of CYFRA 21-1, TPA- TP CEA, and NSE. *Anticancer Res* 1997; 17: 2875–8.
 32. Lim SC, Park KO, Kim YC, Na KJ, Song H, Bom HS. Comparison of Tc-99m sestamibi, serum neuron-specific enolase, and lactate dehydrogenase as predictors of response to chemotherapy in small-cell lung cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 2000; 14: 381–6.
 33. Allard WJ, Neaman IE, Elting JJ, Barnett TR, Yoshimura H, Fritsche HA, et al. Nonspecific cross-reacting antigen 59/90 is elevated in patients with breast, lung, and colon cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 1227–34.
 34. Stieber P, Yamaguchi K. ProGRP enables diagnosis of small-cell lung cancer. In: *Tumor markers; physiology, pathobiology, technology, and clinical applications*. Eds: Diamandis EP, Frische HA, Lilja H, Chan DW, Schwartz MK. AACR press 2002, 1st edition, Washington DC: 517–21.
 35. Lamy P, Grenier J, Kramar A, Pujol JL. Pro-gastrin-releasing peptide, neuron specific enolase and chromogranin A as serum markers of small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2000; 29: 197–203.
 36. Sunaga N, Tsuchiya S, Minato K, Watanabe S, Fueki N, Hoshino H, et al. Serum pro-gastrin-releasing peptide is a useful marker for treatment monitoring and survival in small-cell lung cancer. *Oncology* 1999; 57: 143–8.
 37. Niho S, Nishiwaki Y, Goto K, Ohmatsu H, Matsumoto T, Hojo F, et al. Significance of serum pro-gastrin-releasing peptide as a predictor of relapse of small cell lung cancer: comparative evaluation with neuron-specific enolase and carcinoembryonic antigen. *Lung Cancer* 2000; 27: 159–67.
 38. Okusaka T, Eguchi K, Kasai T, Kurata T, Yamamoto N, Ohe Y, et al. Serum levels of pro-gastrin-releasing peptide for follow-up of patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 123–7.
 39. Pinson P, Joos G, Watrion P, Brusselle G, Pauwels R. Serum neuron-specific enolase as a tumor marker in the diagnosis and follow-up of small-cell lung cancer. *Respiration* 1997; 64: 102–7.
 40. Shibayama T, Ueoka H, Nishii K, Kiura K, Tabata M, Miyatake K, et al. Complementary roles of pro-gastrin-releasing peptide (ProGRP) and neuron specific enolase (NSE) in diagnosis and prognosis of small-cell lung cancer (SCLC). *Lung Cancer* 2001; 32: 61–9.
 41. Satoh H, Ishikawa H, Kurishima K, Yamashita YT, Ohtsuka M, Sekizawa K. Cut-off levels of NSE to differentiate SCLC from NSCLC. *Oncol Rep* 2002; 9: 581–3.
 42. Jorgensen LG, Osterlind K, Genolla J, Gomm SA, Hernandez JR, Johnson PW, et al. Serum neuron-specific enolase (S-NSE) and the prognosis in small-cell lung cancer (SCLC): a combined multivariable analysis on data from nine centers. *Br J Cancer* 1996; 74: 463–7.
 43. Fizazi K, Cojean I, Pignon JP, Rixe O, Gatineau M, Hadeif S, et al. Normal serum neuron specific enolase (NSE) value after the first cycle of chemotherapy: an early predictor of complete response and survival in patients with small cell lung carcinoma. *Cancer* 1998; 82: 1049–55.

44. 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.
45. Schneider J, Philipp M, Salewski L, Velcovsky HG. Progastrin-releasing peptide (ProGRP) and neuron specific enolase (NSE) in therapy control of patients with small-cell lung cancer. *Clin Lab* 2003; 49: 35–42.
46. Schneider J, Velowsky HG, Morr H, Katz N, Neu K, Eigenbrodt E. Comparison of the tumor markers, tumor M2-PK, CEA, CYFRA 21-1, NSE and SCC in the diagnosis of lung cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 5053–8.
47. Mahnert B, Oberneder R, Hofmann K, Lamerz R, Fürst H, Stieber P. Tumor M2-PK in benign and malignant diseases. *Tumor Biol* 2000; 21(S1): 114.
48. Schneider J, Neu K, Velcovsky HG, Morr H, Eigenbrodt E. Tumor M2-pyruvate kinase in the follow-up of inoperable lung cancer patients: a pilot study. *Cancer Lett* 2003; 193: 91–8.
49. Wu J, Ohta Y, Minato H, Tsunozuka Y, Oda M, Watanabe Y, et al. Nodal occult metastasis in patients with peripheral lung adenocarcinomas of 2.0 cm or less in diameter. *Ann Thorac Surg* 2001; 71: 1772–8.
50. Muley T, Dienemann H, Ebert W. Increased CYFRA 21-1 and CEA levels are negative predictors of outcome in p-stage I NSCLC. *Anticancer Res* 2003; 23: 4085–93.
51. Muley T, Dienemann H, Ebert W. CYFRA 21-1 and CEA are independent prognostic factors in 153 operated stage I NSCLC patients. *Anticancer Res* 2004; 24: 1953–6.
52. Okada M, Nishio W, Sakamoto T, Uchino K, Yuki T, Nakagawa A, et al. Prognostic significance of perioperative serum carcinoembryonic antigen in non-small cell lung cancer: analysis of 1,000 consecutive resections for clinical stage I disease. *Ann Thorac Surg* 2004; 78: 216–21.
53. Sawabata N, Maeda H, Yokota S, Takeda S, Koma M, Tokunaga T, et al. Postoperative serum carcinoembryonic antigen levels in patients with pathologic stage IA non-small cell lung carcinoma: subnormal levels as an indicator of favorable prognosis. *Cancer* 2004; 101: 803–9.
54. Tomita M, Matsuzaki Y, Edagawa M, Shimizu T, Hara M, Onitsuka T. Prognostic significance of preoperative serum carcinoembryonic antigen level in lung adenocarcinoma but not squamous cell carcinoma. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 10: 76–80.
55. Salgia R, Harpole D, Herndon JE, Pisick E, Elias A, Skarin AT. Role of serum tumor markers CA 125 and CEA in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2001; 21: 1241–6.
56. Massacesi C, Rocchi MB, Marcucci F, Piloni A, Galeazzi M, Bonsignori M. Serum lung cancer may precede instrumental response to chemotherapy in patients with metastatic cancer. *Int J Biol Markers* 2003; 18: 295–300.
57. Kao CH, Hsieh JF, Ho YJ, Ding HJ. Cytokeratin fragment 19 (CYFRA 21-1) and carcinoembryonic antigen for early prediction of recurrence of lung adenocarcinoma. *Lung* 1999; 177: 333–7.
58. Diez M, Torres A, Maestro ML, Ortega MD, Gomez A, Pollan M, et al. Prediction of survival and recurrence by serum and cytosolic levels of CEA, CA125 and SCC antigens in resectable non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 1996; 73: 1248–54.
59. Ando S, Kimura H, Iwai N, Yamamoto N, Iida T. Positive reactions for both Cyfra21-1 and CA125 indicate worst prognosis in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*. 2003; 23: 2869–74.
60. Trape J, Buxo J, Perez de Olaguer J, Vidal C. Tumor markers as prognostic factors in treated non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2003; 23: 4277–81.
61. Gaspar MJ, Diez M, Rodriguez A, Ratia T, Martin Duce A, Galvan M, et al. Clinical value of CEA and CA125 regarding relapse and metastasis in resectable non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2003; 23: 3427–32.
62. Nobels FR, Kwekkeboom DJ, Coopmans W, Schoenmakers CH, Lindemans J, De Herder WW, et al. Chromogranin A as serum marker for neuroendocrine neoplasia: comparison with neuron-specific enolase and the alpha-subunit of glycoprotein hormones. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2622–8.
63. Giovanella L, Ceriani L, Bandera M, Garancini S. Immunoradiometric assay of chromogranin A in the diagnosis of small cell lung cancer: comparative evaluation with neuron-specific enolase. *Int J Biol Markers* 2001; 16: 50–5.
64. Seregini E, Ferrari L, Bajetta E, Martinetti A, Bombardieri E. Clinical significance of blood chromogranin A measurement in neuroendocrine tumours. *Ann Oncol* 2001; 12 (S2): S69–72.
65. Ferrari L, Seregini E, Bajetta E, Martinetti A, Bombardieri E. The biological characteristics of chromogranin A and its role as a circulating marker in neuroendocrine tumours. *Anticancer Res* 1999; 19: 3415–27.
66. Molina R, Jo J, Filella X, Bruix J, Castells A, Hague M, et al. Serum levels of C-erbB-2 (HER-2/neu) in patients with malignant and non-malignant diseases. *Tumour Biol* 1997; 18: 188–96.
67. Jacot W, Pujol JL, Boher JM, Lamy PJ. Serum EGF-receptor and HER-2 extracellular domains and prognosis of non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 2004; 91: 430–3.
68. Ardizzoni A, Cafferata MA, Paganuzzi M, Filiberti R, Marroni P, Neri M, et al. Study of pretreatment serum levels of HER-2/neu oncoprotein as a prognostic and predictive factor in patients with advanced non-small cell lung carcinoma. *Cancer* 2001; 92: 1896–904.
69. Strauss GM, Skarin AT. Use of tumor markers in lung cancer. *Hemat Oncol Clin North Am* 1994; 8: 507–32.
70. Anton RC, Coffey DM, Gondo MM, Stephenson MA, Brown RW, Cagle PT. The expression of cyclins D1 and E in predicting short-term survival in squamous cell carcinoma of the lung. *Mod Pathol* 2000; 13 (11): 1167–72.
71. Wang K, Liu N, Radulovich N, Wigle DA, Johnston MR, Shepard FA, et al. Novel candidate tumor marker genes for lung adenocarcinoma. *Oncogenes* 2002; 21: 7598–604.
72. Yip D, Harper PG. Predictive and prognostic factors in small-cell lung cancer: current status. *Lung Cancer* 2000; 28: 173–85.
73. Eijdens EWHM, de Haas M, Timmermann AJ. Reduced topoisomerase II activity in multi-drug-resistant human

- non-small-cell lung cancer cell lines. *Br J Cancer* 1995; 71: 40–7.
74. Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccmanno G, Gabrielson E, et al. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 11891–6.
75. Dammann R, Takahashi T, Pfeifer GP. The GpG island of the novel tumor suppressor gene RASSF1A is intensely methylated in primary small-cell lung carcinomas. *Oncogene* 2001; 20: 3563–7.
76. Agathangelou A, Honorio S, Macartney DP, Martinez A, Dallol A, Rader J, et al. Methylation-associated inactivation of RASSF1A from region in 3p21.3 in lung, breast, and ovarian tumors. *Oncogene* 2001; 20: 1509–18.
77. Virmani AK, Rathi A, Zochbauer-Muller S, Sacchi N, Fukuyama Y, Bryant D, et al. Promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor- β gene in lung carcinomas. *J Nat Cancer Inst* 2000; 92: 1303–7.
78. Cote RJ, Hawes D, Chaiwun B, Beattie EJ. Detection of occult metastases in lung carcinomas: progress and implication for lung cancer staging. *J Surg Oncol* 1998; 69: 265–74.
79. Cote RJ, Beattie EJ, Chaiwun B, Shi SRS, Harvey J, Chen SC, et al. Detection of occult metastases in patients with operable lung carcinoma. *Ann Surg* 1995; 222: 415–25.
80. Ohgami A, Mitsudomi T, Sugio K, Tsuda T, Oyama T, Nishida K, et al. Micrometastatic tumor cells in the bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1997; 64: 363–7.
81. Pasini F, Pelosi G, Mostacci R, Santo A, Masotti A, Spagnolli P, et al. Detection at diagnosis of tumor cells in bone marrow aspirates of patients with small-cell lung cancer (SCLC) and clinical correlations. *Ann Oncol* 1995; 6: 86–8.
82. Peck K, Sher YP, Shih JY, Roffler SR, Wu CW, Yang PC. Detection and quantification of circulating cancer cells in the peripheral blood of lung cancer patients. *Cancer Res* 1998; 58: 2761–5.
83. Bessho A, Tabata M, Kiura K, Takata I, Nagata T, Fujimoto N, et al. Detection of occult tumor cells in peripheral blood from patients with small-cell lung cancer by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Anti-cancer Res* 2000; 20: 1149–54.
84. Gautschi O, Bigosch C, Huegli B, Jermann M, Marx A, Chasse E, et al. Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4157–64.
85. Fournie GJ, Courtin JP, Laval F, Chale JJ, Pourrat JP, Pujazon MC, et al. Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours. *Cancer Lett* 1995; 91: 221–7.
86. Holdenrieder S, Stieber P, von Pawel J, Raith H, Nagel D, Feldmann K, et al. Circulating nucleosomes predict the response to chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5981–7.
87. Sozzi G, Conte D, Mariani L, Lo Vullo S, Roz L, Lombardo C, et al. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res* 2001; 61: 4675–8.
88. Sozzi G, Conte D, Leon M, Ciricione R, Roz L, Ratcliffe C, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3902–8.
89. Dingemans AM, van Ark-Otte J, Span S, Scagliotti GV, van der Valk P, Postmus PE, et al. Topoisomerase II alpha and other drug resistance markers in advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001; 32: 117–28.
90. Dingemans AM, Witlox MA, Stallaert RA, van der Valk P, Postmus PE, Giaccone G. Expression of DNA topoisomerase IIalpha and topoisomerase IIbeta genes predicts survival and response to chemotherapy in patients with small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2048–58.

Rad primljen: 15. 01. 2007.

Prihvaćen za štampu: 16. 03. 2007.