

PREPORUKE ZA PRIMENU I ODREĐIVANJE TUMORSKIH MARKERA KOD KARCINOMA TESTISA

RECOMMENDATION FOR APPLICATION AND DETERMINATION TUMOR MARKERS OF TESTICULAR CANCER

Duško Mirković

*Institute of Medical Biochemistry, Clinical Centre of Serbia and School Pharmacy,
University of Belgrade, Belgrade, Serbia*

Kratak sadržaj: Tumori reproduktivnih ćelija su morfološki karakteristična grupa neoplazija sa različitim kliničkim ispoljavanjem. Devedeset pet procenata ovih tumora nastaje u testisima i raspolaže značajnim malignim potencijalom. Testikularni karcinomi predstavljaju 1% malignih proliferacija kod muškaraca. Serumski tumorski markeri imaju važnu ulogu u tretiranju pacijenata sa sumnjom ili dijagnozom karcinom testisa. Određivanje tumorskih markera kod karcinoma testisa je važno pri postavljanju dijagnoze, određivanju stadijuma bolesti, odnosno merenju učinka terapije. Najvažniji tumorski markeri su: α -fetoprotein, humani horioni gonadotropin i laktat dehidrogenaza.

Ključne reči: Karcinom testisa, tumorski markeri, α -fetoprotein, humani horioni gonadotropin, laktat dehidrogenaza

Summary: Germ cell tumors are a morphologically distinct group of neoplasms, with different clinical presentation. Ninety five percent of these tumors are arising in the testes, and have important malignant potential. Testicular cancers represents 1% malignancies in males. Serum tumor markers have important roles in management patients with suspicion, or with diagnosis testicular cancer. Those kind of determinations are important for contributing to diagnosis, staging and evaluating of response to therapy. The most important type of those kind tumor markers are α -fetoprotein, human chorionic gonadotropin and lactate dehydrogenase.

Keywords: Testicular cancer, tumor markers, α -fetoprotein, human chorionic gonadotropin, lactate dehydrogenase

Uvod

Više od 95% malignih tumora testisa vode poreklo iz reproduktivnih ćelija, a ostali spadaju u limfome, tumore Lajdigovih, Sertolijevih ćelija, odnosno u mezoteliome. Testikularni kanceri predstavljaju oko 1% maligniteta kod muškaraca. Najčešće se javljaju u dobi 15.–35. godine starosti. Značajan su uzrok smrti kod pomenute populacije, iako se smatra da se u više od 90% slučajeva, bolest može uspešno lečiti (1).

U 95% slučajeva tumor se razvija u gonadama, a u ostalim slučajevima u ekstragonadnalnom tkivu, najčešće medijastinumu i sakrumu. Lociranje u sakrumu je karakteristično za mladu populaciju (2).

Podaci o učestalosti ove vrste tumora variraju od populacije do populacije. Tako je u USA 5,2/100 000, sa 4 puta većom incidencom kod bele populacije u odnosu na crnu. Za istu populaciju važi povećanje incidence od 52% od sredine sedamdesetih do sredine

devedesetih godina prošlog veka. Kod Evropskih populacionih grupa najveća incidenca je kod Danaca, 9,2/100 000 (3).

Uzrok javljanja maligne proliferacije reproduktivnih ćelija je nepoznat, ali postoje indikacije da je prisutan uticaj naslednog faktora, kriptorhidizma i Klinefelterovog sindroma (1).

Otečen testis, koji se tvrdo pipava i bol su najčešći simptomi koji uključuju mogućnost pojave malignog tumora testisa. Povećanje mase testisa, ali bez pojave bola se takođe može javiti. Ako tretman antibioticima kod ovih simptoma ne daje rezultat pribegava se dijagnostičkim postupcima koji uključuje kompjuterizovanu tomografiju (CT). Od ovog momenta i određivanje karakterističnih serumskih tumorskih markera može biti uključeno u dijagnostički tretman (1). Određivanje serumskih tumorskih markera kada je u pitanju tretman obolelih od kancera testisa, odnosno onih osoba kod kojih postoji sumnja na isti je značajno sa stanovišta:

Tabela I Trenutno raspoloživi serumski i tkivni markeri karcinoma testisa.

Tumorski marker	Preporučeno korišćenje	Nivo dokaza	Faza u razvoju
Serumski tumorski markeri u rutinskoj praksi			
AFP	Dijagnoza Prognoza Stadijum Praćenje terapije	IA	Raspoloživ u rutinskoj praksi
HCG	Dijagnoza Prognoza Stadijum Praćenje terapije	IA	Raspoloživ u rutinskoj praksi
Praćenje terapije	Dijagnoza Prognoza Stadijum Praćenje terapije	IA	Raspoloživ u rutinskoj praksi
Potencijalno korisni serumski tumor markeri			
β -HCG	Dijagnoza Praćenje terapije	IV	U eksperimentu
LD-1	Dijagnoza Određivanje rizika	IV	U eksperimentu
PLAP	Dijagnoza	IV	U eksperimentu
NSE	Dijagnoza	IV	U eksperimentu
Tkivni markeri			
PLAP	Histološka tipizacija	IIA	Antitela za imunohistohemiju raspoloživi u rutinskoj praksi
c-KIT	Tipizacija tumora	IIA	Antitela za imunohistohemiju raspoloživi u rutinskoj praksi
CD30	Tipizacija tumora	IV	Antitela za imunohistohemiju raspoloživi u rutinskoj praksi
Uvećanje 12p	Dijagnoza	II	Ograničena upotreba
Vaskularna invazivnost	Određivanje rizika	II	Ograničena upotreba
Eksperimentalni tkivni markeri			
OCT3/4 POUF1	Određivanje rizika	IV	U eksperimentu

postavljanja dijagnoze, određivanja stadijuma bolesti, postavljanja prognoze, kao i merenja efekata terapije. Opšte prihvaćeni tumorski markeri ovog tipa su: α -feto-protein, horioni gonadotropin i laktat dehidrogenaza. Ostali markeri koji se ređe koriste su u fazi ispitivanja i za sada daju manje kliničkih informacija. U Tabeli I je dat prikaz trenutno raspoloživih serumskih i tkivnih markera karcinoma testisa.

Histološke karakteristike kancera testisa

Za bolje razumevanje tretmana kancera testisa, neophodno je uzeti u obzir osnovnu podelu ovih tumora, na seminome i neseminome (4–5). Seminomi vode

poreklo iz nezrelih reproduktivnih ćelija. Obično su jasno diferencirani, te se u tom slučaju vode kao »čisti«. Javljaju se obično u četvrtoj dekadi života. U ređem broju slučajeva se radi o »mešanom« tipu, poznatom kao spermatocidni oblik, koji se javlja kod starije populacije.

Neseminomi nastaju iz zrelih reproduktivnih ćelija. Javljaju se obično u trećoj dekadi života. Sa histološkog aspekta predstavljaju mešani tip tumora, koji mogu biti embrionalni karcinom, infantilni embrionalni karcinom, horiokarcinom, teratom, ili orhidoblastom. Teratomi se dalje mogu podeliti na zrele i nezrele. U 10–20% slučajeva neseminomi imaju i neke karakteristike seminoma (6–7).

Genetske aberacije i tkivni markeri

Povećanje 12_p sekvence je prisutno kod tumora reproduktivnih ćelija, kako testikularnog, tako i ekstragonadalnog porekla. Kod ekstragonadalnog tumora, ima indicija da ova genetska aberacija ima presudnu ulogu u razvoju ove vrste karcinoma. Nivo ekspresije 12_p ne korelira sa stadijumom i tretmanom bolesti (8).

Druga vrsta genetske aberacije se odnosi na čimbenicu da većina invazivnih seminoma i neseminoma, raspolaže dodatnom kopijom X hromozoma. Kod ovog tipa tumora se javlja X-inaktivacija, za koju je »X-inactive specific transcript (XIST)«, regulatorni gen. Zato je određivanje nemetilovane XIST DNK u plazmi predloženo kao koristan parametar za praćenje testikularnog karcinoma (9).

Od tkivnih markera za otkrivanje i potvrdu dijagnoze intratubularnih neklasifikovanih neoplazija reproduktivnih ćelija, se koristi c-KIT. CD30 je poznat kao potencijalni marker embrionalnih karcinoma. Skorašnja ispitivanja ukazuju na značaj ispitivanja OCT3/4, poznatog kao POU5F1 (10–12).

Vaskularna invazivnost

Posebna pažnja se mora skrenuti na prisustvo, ili odsustvo vaskularne invazivnosti kao prognostičkog faktora za širenje, odnosno postojanje skrivenih metastaza. Razlikovanje venske od limfne invazivnosti nije bitno kao prognostični elemenat za pojavu skrivenih metastaza. Pored vaskularne invazivnosti visoka proliferativna invazivnost, procenjena na osnovu monoklonskih antitela (MIB-1), a u manjem broju slučajeva, prisustvom embrionalnog karcinoma u primarnom tumoru su prognostički faktori za sistemsko širenje metastaza u stadijumu I neseminoma (13).

Prospektivna procena faktora za klinički relaps u stadijumu I neseminoma ukazuje da vaskularna invazivnost ima najveći prediktivni potencijal. Prediktivni nivo se uvećava uključivanjem MIB-1 i prisustvom embrionalnog karcinoma. Optimalno korišćenje pomenutih parametara, kao i dobar patološki nalaz, ukazuju da jedna trećina pacijenata sa stadijumom II ili relapsom neće imati metastatsko širenje bolesti. Kod pacijenata sa manjim rizikom prognostička tačnost je do 86% (14).

Serumski markeri karcinoma testisa

α -fetoprotein

α -fetoprotein (AFP), albuminu sličan glikoprotein, molekulske mase oko 70 000 daltona, se sintetise u ćelijama jetre, i u gastrointestinalnom sistemu fetusa. U fetalnoj plazmi postiže koncentraciju od 3 g/L, u 12.-14. nedelji trudnoće, a zatim opada do 10-200 mg/L do kraja trudnoće. Nakon rođenja koncentracija konstantno opada sa poluzivotom od 5 dana i dostiže nakon 8.–10. meseca nivo karakterističan za odraslu osobu. Ova činjenica već ističe značaj detekcije povi-

šenih vrednosti AFP kod najmlađe populacije, kao markera tumora testisa. Za odraslu populaciju važi osnovna premisa da povećane vrednosti AFP ukazuju na eventualno prisustvo neseminoma. Takođe za odraslu populaciju važi da se povećane vrednosti istog mogu javiti i kod seminoma sa elementima neseminoma. Povećane vrednosti AFP mogu da ukažu na postojanje tumora reproduktivnih ćelija i u odsustvu pozitivnog radiološkog nalaza (15–17).

Specifičnost ovog markera je sigurno ograničena činjenicom da se povišene vrednosti javljaju kod većine hepatocelularnih tumora, te kod 10–30% drugih gastrointestinalnih kancera. Nakon hemioterapije primenjene iz različitih razloga odnosno kod benignih oboljenja jetre, detektuju se umereno povećane vrednosti AFP koje mogu postepeno da rastu (18–20).

Određivanje AFP

Rutinsko određivanje ovog tumorskog markera u serumu, plazmi, ili amnionskoj tečnosti se danas vrši primenom dvostepenog imunoodređivanja. Koriste se monoklonska ili kombinacija monoklonskih i poliklonskih antitela. Osetljivost metode je na zavidnom nivou zbog primene hemiluminoscentnog fenomena, te se u celini radi o hemiluminoscentnom određivanju na mikropartikula (CMIA). Rezultati su uglavnom uporedljivi sa RIA metodom koja je ranije imala presudnu ulogu u ovom segmentu analitike. Veliki značaj ima i postojanje standarda Svetske zdravstvene organizacije 72/225, u kome jedna Internacionalna jedinica odgovara 1,21 ng AFP. Referentne vrednosti se kreću od 10–15 μ g/L i sa starenjem normalne vrednosti imaju tendenciju blagog porasta (21).

Humani horioni gonadotropin

Humani horioni gonadotropin (HCG) je sijalo glikoprotein sa molekulskom masom od oko 46 000 daltona. Sintetiše se u trofoblastima placente, neposredno nakon implantacije oplodene jajne ćelije u zid materice. Ovaj placentalni hormon ima dosta sličnosti sa lutenizirajućim (LH), folikulo stimulirajućim (FSH) i tiroidno stimulirajućim hormonom (TSH). Svi su glikoproteini sa po dve različite, nekovalentno vezane subjediniče, koje se označavaju kao α i β . Alfa subjediniče ovih hormona su izrazito slične, za razliku od β subjediniče, koje određuju specifičnu biološku i imunohemijsku aktivnost. Postoji evidentna sličnost između β subjediniče LH i HCG, ali su male razlike ipak dovoljne za ispoljavanje imunohemijske specifičnosti, što je sa analitičkog aspekta vrlo značajno (22–25).

Određivanje HCG

Specifično određivanje HCG se bazira na imunohemijskoj interakciji na različitim epitopima na β subjediniči, odnosno na ostatku molekule hormona. Speci-

fično određivanje HCG se u najvećem broju slučajeva svodi na imunohemijsku reakciju odgovarajućih antitela sa β lancima HCG. Često se javlja konfuzija jer nazivi reagens testova obeleženi kao » β -HCG«, »HCG+ β « »HCG« nisu dovoljno jasni, da li se radi o određivanju na gore pomenuti način, ili je u pitanju proces koji u imunohemijski proces uključuje i ostale delove hormonske molekule. Zato se preporučuje nomenklatura IFCC, po kojoj oznaka $\alpha\beta$ označava određivanje heterodimera, HCG β određivanje β subjedinice, a HCG α , određivanje slobodne β subjedinice (26–27).

Kao i kod AFP, danas najzastupljeniji princip imunohemijskog određivanja je dvostepeni, a kao indikatorski princip, hemiluminoscentni.

Kalibratori koji se koriste su proizvedeni prema trećem internacionalnom standardu (IS 75/537) u kojem je koncentracija izražena u Internacionalnim jedinicama (U). Svetska zdravstvena organizacija je postavila vrednosti standarda u molarnim jedinicama, što će olakšati poređenje rezultata (27–29).

HCG je specifičniji tumorski marker za neseminom tip karcinoma testisa. Specifičnost je značajna i kod horiokarcinoma. U 10–20% slučajeva, seminomi su takođe okarakterisani između ostalog i povećanim vrednostima HCG. Kod ovih pacijenata se pribegava određivanju ukupne vrednosti HCG, kao zbira vrednosti β subjedinice i ostatka molekula. To je moguće realizovati korišćenjem reagens testova koji sadrže antitela prema epitopima na C-terminalnom peptidu α subjedinice (30–31).

Neophodno je da se vodi računa da umereno povećanje vrednosti β HCG daju pojedini tumori: ovarijuma, intestinuma, žučne kese, ili pluća. Lažno pozitivan rezultat može biti prouzrokovan prisustvom heterofilnih antitela. Do skoro su ovi slučajevi bili registrovani samo kod žena. Hemioterapija često uzrokuje gonadnu supresiju, koja se manifestuje povećanjem nivoa HCG. Umereno povećanje vrednosti HCG, može takođe bit uzrokovan i povećanom pitutarnom aktivnošću, praćenom vrednostima LH i FSH, koje premašuju 30–50 U/L (32–33).

Gornja granica referentnih vrednosti u granicama 5–10 U/L uključuje i žensku populaciju. Zato se preporučuje korišćenje nižih »cut-off« vrednosti kod muške populacije, pogotovu kod pacijenata sa karcinomom testisa, ili sumnjom na isti. Kada se koriste molarne koncentracione jedinice, 5 U/L HCG odgovara 15 pmol/L. Gornja granica referentnih vrednosti za β HCG je 2 pmol/L i ne zavisi od starosti i pola (34).

Laktat dehidrogenaza (LDH)

LDH u cirkulaciji postoji kao tetramer, sa različitim kombinacijama LDH-A i LDH-B subjedinica, koje određuju 5 izoenzimskih formi. Dokazano je da kod svih invazivnih seminoma i neseminoma postoji udvojen hromozomski nastavak na hromozomu 12, koji je normalno mesto kodiranja sinteze B subjedinice (35–38).

U praksi je prema tome važno određivanje LDH₁ elektroforezom, odnosno imunoprecipitacijom. Rutinsko enzimsko određivanje ukupne aktivnosti LDH, takođe daje zadovoljavajuće rezultate. I u ovom slučaju hemoliza se mora izbeći, jer daje lažno pozitivne rezultate.

Ostali markeri

U ostale markere karcinoma testisa se ubrajaju: neuron-specifična enolaza, specifični β -1 glikoprotein i placentalna alkalna fosfataza (PLAP). Za prva dva pomenuta markera se ne može reći da postoje iscrpni podaci o masovnijoj primeni u kliničkoj praksi dok PLAP zaslužuje veću pažnju (39–41).

Humana alkalna fosfataza je dimerni molekul čija ukupna enzimsko aktivnost potiče od 4 izoenzimске forme. Dve od njih su placentalna alkalna fosfataza i placentalna alkalna fosfataza reproduktivnih ćelija GCPLAP. Obe izoforme su stabilne na 65 °C i imaju visoku homologiju od 98%. Placentalna alkalna fosfataza se sintetiše u placentalnim sinciotrofoblastima. Nakon 12. nedelje trudnoće GCPLAP se primarno sintetiše u testisima, cerviksu i timusu, a samo u tragovima u placenti i plućima. Kod zdravih nepušača enzimsko aktivnost PLAP i GCPLAP predstavlja oko 1% enzimsko aktivnosti humane alkalne fosfataze (42–45).

Ektopička ekspozicija PLAP je udružena sa pojavom kancera ovarijuma, testisa, pluća, kolorektalnog trakta, a GCPLAP sa karcinomom testisa, intratubularnog karcinoma reproduktivnih ćelija, embrionalnog karcinoma i horiokarcinoma. Kod tumora testisa prevladuje seminom tip, a učestalost povišenih vrednosti GCPLAP je 22–89%. Postoje podaci koji ukazuju da određivanje serumske PLAP ili GCPLAP ima veću osetljivost od određivanja HCG i LDH kod pacijenata sa seminomom (43–49).

Određivanje PLAP i GCPLAP je: imunohemijsko, enzimsko, ili elektroforetsko. Glavna prepreka za masovnije korišćenje ovih tumorskih markera je u relativno velikoj homologiji u strukturi svih ALP izoenzima, a pogotovo u ranije pomenutoj činjenici da je homologija između PLAP i GCPLAP čak 98%. Pored pomenutog i činjenica da vrednosti PLAP rastu i do 10 puta kod pušača i da idu u prilog trenutnom stanju da ima mnogo manju primenu kao tumorski marker u odnosu na AFP, HCG i LDH (50).

Postavljanje dijagnoze i određivanje stadijuma bolesti

Pacijenti sa početnim stadijumom karcinoma testisa se mogu pojaviti sa simptomima koji ne podrazumevaju pojavu bola. Situacija je drugačija kod odmaklih stadijuma bolesti, odnosno kod pojave metastaza. Obično prihvaćena podela toka bolesti, po stadijumima izgleda ovako:

– Stadijum I – proces ograničen na testise i epididimus

- Stadijum II – proces proširen na retroperitonealne limfne čvorove
- Stadijum IIA – limfni čvorovi sa promerom do 2 cm
- Stadijum IIB – limfni čvorovi sa promerom 2–5 cm
- Stadijum IIC – limfni čvorovi veći od 5 cm
- Stadijum III – metastaze u supradijafragmalne limfne čvorove

Postavljanje dijagnoze podrazumeva: fizički pregled pacijenta, ultrazvučni pregled testisa, odnosno pregled kompjuterizovanom tomografijom celog tela, kao i određivanje AFP, HCG i LDH.

Pre započinjanja terapije predlaže se ponovno određivanje tri pomenuta tumorska markera. Koncentracije pojedinih markera zavise od histološkog tipa, veličine tumorske mase i stadijuma bolesti. Kod seminoma u stadijumu I se obično registruju povećane vrednosti HCG, a kod neseminoma u istom stadijumu je dominantno povećanje AFP i HCG, a nešto je ređe povećanje koncentracije samo AFP ili samo HCG. Kod seminoma vrednosti koncentracije HCG retko prelaze 300 U/L. Više vrednosti ovog markera, koje prelaze i 1 000 U/L su karakteristične za neseminome. Vrednosti više od 10 000 U/L su karakteristične za horiokarcinome. Povišene vrednosti LDH su prisutne kod 60% pacijenata sa seminomima i neseminomima. (51–52).

Klasifikacija tumora se prvenstveno vrši na osnovu rezultata histoloških ispitivanja, ali ako se utvrdi povišena vrednost serumskog AFP tumor prvenstveno klasifikovan u seminom se reklasifikuje u neseminom i dalje tretira kao ovaj tip karcinoma testisa (53).

Kontrola efekata terapije i prognoza bolesti

Ako je nivo AFP i HCG u serumu povećan pre početka terapije, nivo pada vrednosti nakon terapije, odslikava njenu uspešnost. Održavanje povišenih vred-

nosti AFP i HCG nakon hemoterapije, ukazuje na dalje prisustvo bolesti, koje zahteva nastavak terapije. Sama hemioterapija može prouzrokovati prolazno povećanje vrednosti koncentracija tumorskih markera u toku prve nedelje tretmana. Zato treba uzeti u obzir da je poluživot HCG 1,5, AFP 5 dana. Ako su vrednosti HCG povišene posle četiri, a AFP posle sedam dana po završetku terapije, prognoza bolesti je loša (54).

Posle uspešno primenjene terapije, svi pacijenti moraju biti pod periodičnim fizičkim i CT pregledima, odnosno periodičnom kontrolom nivoa AFP, HCG i LDH. Pri ovakvom tretmanu, pojava eventualnog recidiva bolesti se otkriva pre ispoljavanja klasičnih kliničkih simptoma. Recidivi bolesti se javljaju uglavnom tokom prve godine, mnogo ređe nakon dve, a ima i slučajeva da se jave tek nakon deset godina (55).

Stepen povećanja vrednosati AFP, HCG i LDH je u inverznoj vezi sa prognozom bolesti. Smatra se da ovo naročiti važi za HCG te se ovaj marker smatra najboljim kada je u pitanju izjašnjavanje o prognozi bolesti. Tumori testisa, slično ostalim grupama tumora se kada je upitanju prognoza klasifikuju na one sa: dobrom, umereno dobrom i lošom prognozom. Kriterijumi se utvrđuju na osnovu: nivoa tumorskih markera, primarne lokalizacije tumora i prisustva ili odsustva metastaza (56).

Zaključak

Tumorski markeri karcinoma testisa imaju izuzetnu važnost pri: postavljanju dijagnoze, određivanju stadijuma bolesti, praćenju efekata terapije i predviđanju javljanja recidiva bolesti. Za sada je aktuelna rutinska primena: AFP, HCG i LDH. Očekuju se i uključivanje u kliničku praksu novih markera ovog tipa, prvenstveno placentalne alkalne fosfataze.

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

Literatura

1. Bosl GJ, Motzer RJ. Testicular germ-cell cancer. *N Engl J Med* 1997; 337: 242–53.
2. Chaganti RS, Rodriguez E, Mathew S. Origin of adult male mediastinal germ-cell tumours. *Lancet* 1994; 343: 1130–2.
3. McGlynn KA, Devesa SS, Sigurdson AJ, Brown LM, Tsao RE. Trends in the incidence of testicular germ cell tumors in the United States. *Cancer* 2003; 97: 63–70.
4. Mostofi FK, Sesterhen IA, Davis CJ. Developments in histopathology of testicular germ cell tumors. *Semin Urol* 1988; 6: 71–78.
5. Huyghe E, Matsuda T, Tonneau P. Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review. *J Urol* 2003; 170: 5–11.
6. Pugh R. Combined tumors. In: Pugh R, editor. *Pathology of the testis*. Oxford: Blackwell; 1976. 245–258.
7. Mostofi FK, Sasterhenn IA, Davis CJ. J Immunopathology of germ cell tumor of the testis. *Semin Diagn Pathol* 1987; 4: 320–41.
8. Motzer RJ, Rodriguez E, Reuter VE, Saminiego F, Dmitrovsky E, Bajorin DF. Genetic Analysis as an aid in diagnosis for patients with midline carcinomas of uncertain histologies. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 341–6.
9. Rao PH, Houldsworth J, Palanisamy N, Murty VV, Reuter VE, Motzer RJ. Chromosomal amplification is associated with cisplatin resistance of human male germ cell tumors. *Cancer Res* 1998; 58: 4260–3.
10. Roelofs H, Mostert MC, Pompe K, Zafarana G, van

- Oorschot M, Van Gurp RJ. Restricted 12p amplification and RAS mutation in human germ cell tumors of the adult testis. *Am J Pathol* 2000; 157: 1155–66.
11. Looijenga LH, Gillis AJ, Van Gurp RJ, Verkerk Aj, Oosterhuis JW. X inactivations in human testicular tumors. XIST expression and androgen receptor methylation status. *Am J Pathol* 1997; 151: 581–90.
12. Fan s Chang JK Smith ML, Duba D, Fornace AJ, O'Conor PM. Cells Lacking CIP1/WAF1 genes exhibit preferential sensitivity to cisplatin and nitrogen mustard. *Oncogene* 1997; 14: 2127–36.
13. Jones TD, Ulbright TM, Eble JN, Baldrige LA, Cheng L. OCT4 staining in testicular tumors: a sensitive and specific marker for seminoma and embryonal carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 935–40.
14. Rajpert-De, Meyets E, Hanstein R, Jorgensen N, Graem N, Vogt PH, Skakkebaek NE. Developmental Expression of POU5F1 in normal and dysgenetic Human gonads. *Hum Reprod* 2004; 19: 1338–44.
15. Bergstrand CG, Csar B. Demonstration of a New Protein Fraction In Serum from the Human Fetus. *Scand J Clin Lab Invest* 1956; 8: 174.
16. Ruoslahti E, Engvall E, Kessler MJ. Chemical Properties of Alfa-Fetoprotein. In: Herberman RB, McIntire KR. *Immunodiagnostic of Cancer*. New York: Marcel Dekker, Inc, 1979: 101–17.
17. Ruoslahti E, Seppala M. Studies of Carcino-fetal Proteins: Physical and Chemical Properties of Human Alpha-fetoprotein. *Int J Cancer* 1971; 7: 218–25.
18. Beck SD, Patel MI, Shienfeld J. Tumor marker levels on post-chemotherapy cystic masses: clinical implication for patients with germ cell tumors. *J Urol* 2004; 171: 168–71.
19. Germa JR, Lianos M, Taberneo JM, Mora J. False elevations of alfa-fetoprotein associated with liver dysfunction in germ cell tumors. *ancer* 1993; 72 (8): 2491–4.
20. Morris MJ, Bosl GJ. Recognizing abnormal marker results that do not reflect disease in patients with germ cell tumors. *J Urol* 2000; 163: 796–801.
21. Christiansen M, Hogdall CK, Andersen JR, Norgaard-Pedersen B. Alfa-fetoprotein in plasma and serum of healthy adults: Preanalytical, analytical, and biological sources of variation and Construction of age-dependent reference intervals. *Scand J Clin Lab Invest* 2001; 61: 205–15.
22. Thomas CNG, Reijnders FJL, Segers FG, Doesberg WH, Rolland R. Human Ghonadotropin (HCG): Comparison between Determinations of Intact HCG, Free β -Subunit, and Total HCG + β in Serum during the First Half of High-Risk Pregnancy. *Clin Chem* 1990; 36: 651–655.
23. 16. Hoerman R, Berger P, Spoetti G, Gillesberger F, Kardana A, Cole LA, Mann K. Immunological Recognition and Clinical Significance of Nicked Human Chorionic Gonadotropin in Testicular Cancer. *Clin Chem* 1994; 40: 2306–2312.
24. Schwarz S, Berger P, Zick G. The Antigenic Surface of Human horionic Gonadotropin as Mapped by Murine Monoclonal Antibodies. *Endocrinology* 1986; 118: 189–197.
25. Bablok W. A General Regression Procedure for Method Transformation. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988; 26: 783–90.
26. Butler Sa, Ikram MS, Mathieu S, Iles RK. The increase in bladder carcinoma cell population induced by the free beta subunit of human chorionic gonadotropin is a result of an anti-apoptosis effect and not cell proliferation. *Br J Cancer* 2000; 82; 1553–6.
27. Vaitukaitis JL. Human chorionic gonadotropin as a tumor marker. *Ann Clin Lab Sci* 1974; 4: 276–280.
28. Birken S, Berger P, Bidard JM, Weber M, Bristow A, Norman R. Preparation and Characterization of New WHO Reference Reagents for Human Chorionic Gonadotropin and Metabolites. *Clin Chem* 2003; 49: 144–154.
29. Bristow A, Berger P, Bidart JM, Birken S, Norman R, Stenman UH. Establishment, value Assignment, and Characterization of new WHO Reference Reagents for Six Molecular Forms of Human Chorionic Gonadotropin. *Clin Chem* 2005; 51: 77–82.
30. MannK, Salle B, Hoerman R. Clinical use of HCG and hCG beta determinations. *Scand J Cli Lab Invest Suppl* 1993; 216: 97–104.
31. Berger P, Sturgeon C, Bidard JM, Paus E, Gerth R, Niang M. The ISOBM TD-7 and Related Molecules. *Tumor Biol* 2002; 23: 1–38.
32. Catalona WJ, Vaitukaitis JL, Fair WR. Falsely positive specific human chorionic gonadotropin assays in patients with testicular tumors: conversion to negative with testosterone administration. *J Urol* 1979; 122: 126–8.
33. Stenman UH, Altfhan H, Hotakainen K. Human Chorionic Gonadotropin in Cancer. *Clin Biochem* 2004; 37: 549–61.
34. Altfhan H, HauglundC, Debek J, Stenman UH. Concentrations of human chorionic gonadotropin, its β -subunit and the core fragment of β -subunit in serum of men and non pregnant women. *Clin Chem* 1992; 38; 1981–7.
35. Li SS Luedemann M, Sharief FS, Takano T, Deaven LL. Mapping of human lactate dehydrogenase-A, B and C genes and their related sequences: the gene for LDH is located with that for LDHA on chromosome 12. *Cytogenet Cell Genet* 1988; 48: 16–18.
36. Looijenga LH, Zafarana G, Grygalewicz B, Summersgill B, Debiec -Rychter M, Veltman J. Role of gain of 12p in germ cell tumor development. *Apmis* 2003; 111: 161–71.
37. Rosenberg C, Van Gurp RJ, Geelen E, Ooesterhus JW, Looijenga LH. Overrepresentation of the short arm of chromosome 12 is related to invasive growth of human testicular seminomas and nonseminomas. *Oncogene* 2000; 19: 5858–62.
38. Summersgill B, Osin P, Lu YJ, Huddart R, Shipley J. Chromosomal imbalance associated testicular germ cell tumors of adolescents and adults. *Br J Cancer* 2001; 85: 213–20.
39. Mosselman S, Looijenga LH, Gillis AJ, van Rooijen MA, Kraft HJ, van Zoelen EJ. Abberant platelet-derived growth factor alpha-receptor transcript as a diagnostic

- marker for early human germ cell of adult testis. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 2884–8.
40. de Bruijn, Sleifer DT, Schraffordt Koops H, Suurmeijer AJ, Marrink J, Ockhuizen T. Significance of human chorionic gonadotropin, alpha-fetoprotein, and pregnancy-specific beta-1-glycoprotein in the detection of tumor relapse and partial remission in 126 patients with non-seminomatous testicular germ cell tumor. Cancer 1985; 55: 829–35.
 41. Kuzmits R, Scherthaner G, Krisch K. Serum neuron-specific enolase. A marker for responses to therapy in seminoma. Cancer 1987; 60: 1017–21.
 42. Lehto MT, Sharom FJ. Proximity of the protein moiety of a GPI-anchored protein to the membrane surface: a FRET study. Biochemistry 2002; 41: 8368–76.
 43. Moss DW. Perspectives in alkaline phosphatase research. Clin Chem 1992; 38: 2486–92.
 44. Lozw MG, Prasad ARS. A Phospholipase D specific for the phosphatidylinositol anchor of cell-surface proteins is abundant in plasma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1988; 85: 980–984.
 45. Posen S, Neale FC, Clubb JS. Heat inactivation in the study of human alkaline phosphatases. Annals of Internal Medicine 1965; 62: 1234–1243.
 46. Fishman L, Miyayama H, Driscoll SG, Fishman WH. Developmental phase specific alkaline phosphatase isoenzymes of human placenta and their occurrence in human cancer. Cancer Research 1976; 36: 2268–2273.
 47. de Broe ME, Pollet DE. Multicenter evaluation of human placental alkaline phosphatase as a possible tumor-associated antigen in serum. Clin Chem 1988; 34: 1995–9.
 48. Germa-Liuch JR, Garcia del Muro X, Maroto P, Paz-Ares L, Arranz JA, Guma J. Clinical Pattern and therapeutic results achieved in 1940 patients with germ-cell tumors of testis: the experience of the Spanish Germ-Cell Cancer Group (CG). Eur Urol 2002; 42: 553–62.
 49. Bosl GJ, Lange PH, Fraley EE, Goldman A, Nochomovitz LE, Rosai J. Human chorionic gonadotropin and alpha-fetoprotein in the staging of nonseminomas testicular cancer. Cancer 1981; 47: 328–32.
 50. International Germ Cell Cancer Collaborative Group. International Germ Cell Consensus Classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers. International Germ Cell Cancer Collaborative Group. J Clin Oncol 1997; 15: 594–603.
 51. Vogelzang NJ. Prognostic factors in metastatic testicular cancer. Int J Androl 1987; 10: 225–37.
 52. Stenman UH, Alfthan H. Markers for testicular cancer. Diamandis E, Frische H, Lilja H, Chan D, Schwartz M. Tumor Markers, Physiology, Pathobiology, Technology and Clinical Application. Washington: AACCC; 2002: 351–9.
 53. Toner G. Serum tumor-marker half-life during chemotherapy allows early prediction of complete response and survival in nonseminomatous germ cell tumors. Cancer Res 1990; 50: 5904–10.
 54. Coogan CL, Foster RS, Rowland RG, Bihle R, Smith ER, Einhorn LH. Postchemotherapy retroperitoneal lymph node dissection is effective therapy in selected patients with elevated tumor markers after primary chemotherapy alone. Urology 1997; 50: 957–62.
 55. Vogelzang NJ, Lange PH, Goldman A, Vessela RH, Fraley EE, Kennedy BJ. Acute changes of alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin during induction chemotherapy of germ cell tumors. Cancer Res 1982; 42: 4855–61.
 56. Schmoll HJ, Souchon R, Krege S, Albers P, Beyer J, Kollmannsberger C. European consensus on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the European Germ Cell Cancer Consensus Group. Ann Oncol 2004; 15: 1377–99.

Rad primljen: 15. 02. 2008.

Prihvaćen za štampu: 04. 03. 2008.