

KAKO PRIMJENJIVATI TUMORSKE BILJEGE U KLINIČKOJ PRAKSI

How to use tumor markers in clinical practice

Lorena Honović

Summary: Tumor markers are substances, usually proteins that are produced by the body in response to cancer growth or by the cancer tissue itself and they may be detected in blood, urine, or tissue samples. Some tumor markers are specific for a particular type of cancer, while others are seen in several cancer types. Most of the well-known markers may also be elevated in non-cancerous conditions. Tumor markers provide information that can be used to: diagnose, stage, determine prognosis, guide treatment, monitor treatment and determine recurrence. However, numerous clinical trials have shown that the diagnostic value of tumor markers in early detection and diagnosis of disease is overvalued. In the past few years, the awareness of the limitations of the tumor marker analysis, in particular tumor markers for non-cancerous diseases leading to possible value increases (false positives), is also indispensable. All of this led to the definition of guidelines for good practice, including the design of quality control, rules for requesting, validation and interpretation of results, and the setting up of a serum library.

Key words: tumor markers, guidelines

UVOD

Značaj određivanja tumorskih biljega proizlazi iz epidemiologije malignih bolesti, koja su po učestalosti smrtnog ishoda u razvijenim zemljama na drugom mjestu. Pri tome svakako treba napomenuti porast oboljevanja u korelaciji s dobi stanovništva. Tumorski biljezi predstavljaju skupinu heterogenih bioloških tvari koje mogu nastati iz samih tumorskih stanica ili nastaju kao odgovor na tumorski rast, pri čemu mogućnost postojanja i upotrebe biljega kojeg izravno izlučuju tumorske stanice značajno doprinosi pri razlikovanju normalnog tkiva od tumorskog rasta.

Kako ne postoji dovoljno specifičan i osjetljiv tumorski biljeg za probiranje u zdravoj populaciji, tumorski biljezi se najčešće koriste za procjenu rizika malignih tumora, za rano otkrivanje bolesti, dijagnozu, prognozu i predviđanje uspješnosti terapije, praćenje napredovanja i otkrivanja recidiva bolesti. Međutim, brojna su klinička istraživanja pokazala da je dijagnostička vrijednost tumorskih biljega u ranom otkrivanju i dijagnostici bolesti precijenjena. Većina tumorskih biljega ima nisku specifičnost i za organ i za maligni tumor. Nalaze se u povišenim koncentracijama u krvi pacijenata s različitim malignim tumorima iste vrste tkiva, ali i u krvi pacijenata s benignim bolestima i zdravih osoba. Samo se nekoliko tumorskih biljega može primijeniti za probiranje rizičnih skupina ili za primarnu dijagnozu, dok je najveća vrijednost većine od njih u praćenju uspješnosti terapije i ranom otkrivanju recidiva primarne bolesti ili metastaza. (1, 2)

Premda su mnogobrojne međunarodne, regionalne i

nacionalne stručne skupine i organizacije objavile svoje kliničke i laboratorijske smjernice temeljene na dokazima za dijagnostiku malignih bolesti, kao npr. Europska grupa za tumorske biljege (EGTM), Europsko društvo za medicinsku onkologiju (ESMO), Američko društvo za kliničku onkologiju (ASCO) i druge, njihova primjena u svakodnevnoj kliničkoj praksi nije dobila značaj koji im pripada. Značajno mjesto zauzimaju praktične smjernice s preporukama za upotrebu tumorskih biljega u kliničkoj praksi Nacionalne akademije kliničke biokemije (NACB) Američkog društva za kliničku kemiju, koje su nastale razvojem već ranije objavljenih smjernica NACB i EGTM. Upravo su te smjernice preporučene od strane Hrvatske komore medicinskih biokemičara za primjenu u rutinskom radu specijalističkih laboratorija. Određivanje tumorskih biljega može imati značajne posljedice na smjer zdravstvene skrbi za pacijenta, pa je stoga pri određivanju tumorskih biljega od izuzetne važnosti poštivanje svih načela i zahtjeva kvalitete za upotrebu tumorskih biljega koji se odnose na sve dijelove laboratorijskog procesa: predanalitički, analitički i poslijeanalitički. Predanalitički zahtjevi obuhvaćaju izbor tumorskog biljega, vrstu uzorka, vrijeme uzorkovanja i rukovanje uzorkom. U području analitičkog dijela, smjernice se odnose na standardizaciju analize, provođenje unutarnje i vanjske kontrole kvalitete, te interferencije koje se mogu javiti pri određivanju tumorskih biljega. Smjernice poslijeanalitičkog dijela obuhvaćaju referentne intervale, interpretaciju i izvještavanje o tumorskim biljezima. (3)

METODE ODREĐIVANJA TUMORSKIH BILJEGA

Tumorski biljezi su molekule koje se mogu pronaći u promijenjenim koncentracijama u krvi, mokraći ili tkivima ljudi s nekim određenim vrstama malignih tumora. Zahvaljujući razvoju tehnologija određivanje tumorskih biljega danas je moguće na svim razinama medicinsko-biokemijske dijagnostike pri čemu se najčešće određuju imunokemijskim metodama i metodama molekularne dijagnostike. U rutinskom radu najčešće se određuju kvantitativnim neinvazivnim *in vitro* postupcima. Određuju se histološkim, citološkim i imunokemijskim metodama kao što su enzimске (EIA – *Enzym Immuno Assay*), fluorometrijske (FEIA – *Fluoro Enzyme Immuno Assay*), luminometrijske (LIA – *Luminometric Immuno Assay*), masena spektrofotometrija, a samo iznimno radiometrijskim metodama (RIA – *Radioimmuno Assay*). Osnovno svojstvo svih imunokemijskih metoda je da reagens sadrži antitijelo kojim se ciljano određuje analit koji je po svojim svojstvima antigen. Premda je veza antigena i antitijela specifična, mnogobrojni su potencijalni čimbenici povezani uz sve dijelove laboratorijskog procesa koji mogu utjecati ograničavajuće na određivanje tumorskih biljega. (4, 5)

PREPORUKE ZA ODREĐIVANJE TUMORSKIH BILJEGA

Godine 2009. NACB objavila je preporuke koje su od osobite važnosti u području dijagnostike i primjene tumorskih biljega u testikularnom karcinomu, karcinomu prostate, kolorektalnom karcinomu, karcinomu dojke, karcinomu jajnika (6). Godinu dana kasnije, objavljene su i preporuke za upotrebu tumorskih biljega u karcinomu jetre, mokraćnog

Tablica 1. Razine dokaza i snaga preporuka korišteni za stupnjevanje NACB smjernica za tumorske biljege

Razina dokaza (LOE)	Kriteriji
I	Dokaz iz prospektivnog kontroliranog istraživanja posredno oblikovanog za ispitivanje tumorskog biljega ili dokaz iz meta-analize, <i>pooled</i> analiza ili pregleda istraživanja razine II ili III
II	Dokaz iz prospektivnog istraživanja hipoteze o terapiji i koje nije posebno oblikovano za ispitivanje korisnosti tumorskog biljega
III	Dokaz iz velikih prospektivnih istraživanja
IV	Dokaz iz malih retrospektivnih istraživanja
V	Dokaz iz malih pokusnih istraživanja
Snaga preporuke (SOR)	
A – Jaka	Nije vjerojatno da će sljedeće ispitivanje promijeniti povjerenje u procjenu učinka
B – Umjerena	Vjerojatno će sljedeće ispitivanje imati važan utjecaj na povjerenje u procjenu učinka i vjerojatno će promijeniti procjenu
C – Mala	Velika vjerojatnost da će sljedeće ispitivanje imati veliki utjecaj na povjerenje u procjenu učinka i vjerojatno će promijeniti procjenu
D – Vrlo mala	Bilo koja procjena učinka je vrlo nepouzdana

mjehura, vrata maternice i želuca (7). Jedna od značajnijih preporuka u traženju tumorskih biljega u svakodnevnoj kliničkoj i laboratorijskoj praksi zahtjevi su kvalitete za upotrebu tumorskih biljega. Svim preporukama za upotrebu tumorskih biljega pripisana je razina dokaza (LOE – *Level of Evidence*) za njihovu kliničku primjenu prema TMUG sustavu (*Tumor Marker Utility Grading system*) kao i snaga preporuke (SOR – *Strenght Of Recommendation*), tablica 1. Način procjene tumorskih biljega prema navedenim kategorijama trebao bi pomoći procjeni postojećih podataka o tumorskim biljezima i olakšati njihovu primjenu. Krajnji cilj je osiguravanje pravilne kliničke odluke koja će dovesti do povoljnijeg kliničkog ishoda u pacijenta, odnosno primjene tumorskih biljega koja će utjecati na ukupno preživljavanje, preživljenje bez prisutnosti bolesti, na kvalitetu života i smanjenje ukupnih troškova liječenja.

PREDANALITIČKI ČIMBENICI PRI ODREĐIVANJU TUMORSKIH BILJEGA

Kao i pri određivanju drugih analita, najčešće predanalitičke pogreške pri određivanju tumorskih biljega odnose se na nepravilno uzimanje uzoraka krvi, rukovanje uzorkom, nepoštivanje uvjeta pravilnog transporta do laboratorija, stabilnost uzorka. NACB preporuke (3) za predanalitičke zahtjeve kvalitete pri određivanju tumorskih biljega općenito se odnose na preporuke usmjerene na uzorak i one koje su usmjerene na pacijenta.

Preporuke o **vrsti uzorka** ukazuju da su vrste uzorka najčešće serum ili plazma. **Stabilnost tumorskih biljega** općenito je vrlo dobra i nakon odvajanja seruma ili plazme od staničnog dijela krvi mogu se čuvati kratkotrajno pri +4°C, dugotrajno pri -30°C, te dugotrajnije pri -70°C. Stabilnost pri zamrzavanju i odmrzavanju ovisna je o tumorskom biljevu. Tako primjerice obradu toplinom u cilju inaktivacije

HIV-a osobito treba izbjegavati pri određivanju HCG (disocijacija na slobodne a i b podjedinice) i PSA. Stabilnost ukupnog i slobodnog PSA pod različitim uvjetima čuvanja posebno je kritična ako se ti isti biljezi koriste za probiranje. Na neke tumorske biljege poput AFP, CEA i CA 125 značajniji utjecaj ima dugotrajno čuvanje koje je u ovim slučajevima obilježeno gubitkom stabilnosti. Nestabilnost u oba slučaja pokazuje CA 19-9. (3)

Pri izboru pretrage preporuka je da zahtjevi za određivanjem tumorskih biljega trebaju biti u skladu s lokalnim protokolima koji se temelje na potvrđenim nacionalnim i međunarodnim smjernicama. Spekulativno određivanje panela tumorskih biljega treba izbjegavati. Mogući izuzetak su pacijenti s poznatom malignošću nepoznatog porijekla. Valja napomenuti da PSA ne treba nikada određivati rutinski u žena, da CA 125 ne treba rutinski određivati u muškaraca i da CA 15-3 u muškaraca rutinski treba određivati samo u slučajevima utvrđene dijagnoze karcinoma dojke. (3)

Preporuke koje se odnose na vrijeme uzorkovanja, odnose se na iskazivanje važnosti određivanja bazalnih vrijednosti tumorskih biljega prije operacije i prije praćenja bolesti, te su od pomoći u tumačenju rezultata nakon spomenutih. Osim toga, preporuke ne određuju točno vrijeme uzimanja krvi. Naime, ne postoje dokazi o dnevnoj varijaciji za većinu tumorskih biljega, pa se uzorci krvi mogu uzeti u bilo koje vrijeme. Preporuke sadrže nekoliko definiranih situacija. Jedna od njih je da određivanje PSA treba provesti prije bilo koje kliničke manipulacije prostatom (biopsija prostate, transuretralna resekcija prostate, traumatska kateterizacija). Zatim, određivanje CA 125 ne treba provoditi za vrijeme menstruacije. (3)

Predanalitički zahtjevi za kvalitetu uključuju i utjecaj lijekova, dugih tretmana i načina života na određivanje tumorskih biljega. Primjeri takvih utjecaja jesu inhibitori 5a-reduktaze, kemoterapija koja može izazvati prolazno povećanje koncentracija tumorskog biljega, upotreba kanabisa, pušenje. Nezaobilazni čimbenik je i zagađenje uzorka, osobito zagađenje slinom koje značajno može povećati stvarne koncentracije CEA i CA 19-9. (3)

Određena klinička stanja značajni su čimbenici pri određivanju nekih tumorskih biljega (3). Općenito jetrene i bubrežne bolesti, te upala i infekcija mogu prouzročiti povećane koncentracije tumorskog biljega. Takav utjecaj mogu imati i neke dobroćudne bolesti poput cista jajnika, oboljenja štitnjače, bubrežnih kamenaca, sarkoidoze. Vrlo je važno voditi računa o navedenim utjecajima jer mogu dovesti do

produžetka liječenja i eventualno neprikladnih operacija. Detaljniji prikaz utjecaja različitih kliničkih stanja na vrijednosti tumorskih biljega prikazan je u tablici 2.

Općenito jetrene i bubrežne bolesti te upala i infekcija mogu prouzročiti povećane koncentracije tumorskog biljega, kao i neke benigne bolesti kao npr. ciste jajnika, oboljenja štitnjače, bubrežni kamenci i sarkoidoza. Zatajenje bubrega najvjerojatnije uzrokuje povećane rezultate za CEA i citokeratine te za HCG u nekim analizama, ovisno o molekularnim oblicima HCG koji se određuju. Pacijentima u toj kategoriji to treba upisati u klinički izvještaj. HCG se može stalno povećavati u žena koje su u menopauzi i/ili u žena s visokom normalnom vrijednošću. Umjereno povećanje CA 125 može se pratiti u endometriozu i prva dva trimestra trudnoće, a značajno u pacijenata s benignim ascitesom. Vrijednosti CA 125 >1000 kIU/L su nađene u pacijenata s hipotiroidizmom i ascitesom. Pažljiva interpretacija rezultata pacijenata s ovim stanjima je važna i njihove implikacije treba upisati u klinički izvještaj. CA 125 može biti značajno povećan u pacijenata s benignim tumorima jajnika ili drugom benignom patologijom zdjelice (npr. u Meigsovom sindromu, benignom clear-cell adenofibromu jajnika. Osim u navedenim slučajevima CA 125 može biti značajno povećan u pacijenata s zatajenjem srca (vrijednosti značajno koreliraju s jačinom sistoličke disfunkcije lijeve klijetke), u pacijenata s cirozom jetre i kroničnim aktivnim hepatitisom, u tuberkulozi i tuberkuloznom peritonitisu (koji nije nastao zbog bubrežne insuficijencije). Značajno povećane vrijednosti CA 125 mogu biti povezane s povratnim ishemičnim moždanim udarima u pacijenata s metastatskim karcinomom. CA 15-3 može biti povećan u nekim patologijama koje nisu povezane s dojkom: malignim (npr. jajnik, pluća, mijelom) i nemalignim (npr. dermatološka stanja, kolitis, benigni hepatitis). Infekcije urinarnog trakta i prostatitis mogu značajno povećati PSA, i potvrđne uzorke treba uzeti nakon uspješnog antibiotskog tretmana. CA 19-9 može biti povećan u benignim ginekološkim bolestima, uključujući endometriozu i lejomiom (benigna neoplazma glatkog mišića), u pacijenata s kroničnim virusnim hepatitisom i kroničnim hepatitisom, u prisutnoj kolestazi.

Pri svim navedenim stanjima važna je svijest o upozorenjima koja su osobito važna za pravilnu interpretaciju. To se osobito odnosi na povećane serumske i mokraćne vrijedno-

Tablica 2. *Moguće interferencije i drugi analitički izvori varijacija pri određivanju vrijednosti nekih tumorskih biljega (3, 8, 9)*

Tumorski biljeg	Moguće interferencije i drugi analitički izvori varijacija, te mogući utjecaj na rezultate
a-1-fetoprotein (AFP)	<ol style="list-style-type: none"> HAMA i heterofilna protutijela mogu interferirati u imunokemijskom određivanju – <i>povišeni ili sniženi rezultati</i> nemaligne bolesti (alkoholni hepatitis, alkoholna ciroza jetre, akutni virusni hepatitis, nosioci HbsAg, kronični perzistirajući hepatitis) – <i>povišeni rezultati</i> trudnoća (ovisno o tjednima trudnoće, max. između 32. i 36. tjedna) – <i>povišeni rezultati</i> gubitak aktivnosti uslijed polimerizacije i dugotrajnog čuvanja – <i>sniženi rezultati</i>

Tumorski biljeg	Moguće interferencije i drugi analitički izvori varijacija, te mogući utjecaj na rezultate
Karcinoembrionalni antigen (CEA)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Li ili Na-heparinska plazma ima 7-8% više vrijednosti u odnosu na serum – <i>povišeni rezultati</i> 2. HAMA i heterofilna protutijela mogu interferirati u imunokemijskom određivanju – <i>povišeni ili sniženi rezultati</i> 3. nemaligne bolesti (hepatitis, pankreatitis, upalne bolesti gastrointestinalnog sustava, upalne plućne bolesti, zatajenje bubrega, hipereozinofilija) – <i>povišeni rezultati</i> 4. pušenje – <i>povišeni rezultati</i> 5. dugotrajno čuvanje – <i>sniženi rezultati</i>
Antigen karcinoma 15-3 (CA 15-3)	<ol style="list-style-type: none"> 1. HAMA i heterofilna protutijela mogu interferirati u imunokemijskom određivanju – <i>povišeni ili sniženi rezultati</i> 2. nemaligne bolesti (ciroza jetre, hepatitis, autoimune bolesti, jajnika i dojke) – <i>povišeni rezultati</i> 3. druge maligne bolesti, osim karcinoma dojke (karcinom pluća, kolona, pankreasa, primarni karcinom jetre, jajnika, cerviksa i endometrija) – <i>povišeni rezultati</i> 4. linearnost nekih metoda iznad 200 IU/ml, osobito pri upotrebi seruma – <i>sniženi rezultati</i>
Antigen karcinoma 125 (CA 125)	<ol style="list-style-type: none"> 1. HAMA i heterofilna protutijela mogu interferirati u imunokemijskom određivanju – <i>povišeni ili sniženi rezultati</i> 2. nemaligne bolesti (benigne ciste jajnika, endometrioza, bolesti jetre i pankreasa, prvi trimestar trudnoće, pacijenti na dijalizi, zatajenje srca, tuberkuloza) – <i>povišeni rezultati</i> 3. druge maligne bolesti osim karcinoma jajnika (karcinom corpusa, cerviksa, endometrija, pankreasa i pluća) – <i>povišeni rezultati</i> 4. dugotrajno čuvanje – <i>sniženi rezultati</i> 5. menstruacija – <i>povišeni rezultati</i>
Ugljikohidratni antigen 19-9 (CA 19-9)	<ol style="list-style-type: none"> 1. HAMA i heterofilna protutijela mogu interferirati u imunokemijskom određivanju – <i>povišeni ili sniženi rezultati</i> 2. pacijenti s krvnom grupom Levis (a), Levis(b) negativna zbog nedostatka enzima sialil-transferaze potrebnog za sintezu CA 19-9 epitopa (3-5% populacije) – <i>sniženi rezultati</i> 3. menstruacija i trudnoća – <i>povišeni rezultati</i> 4. zagađenje uzorka sekretima, osobito slinom – <i>povišeni rezultati</i> 5. nemaligne bolesti (pankreatitis, hepatitis, ciroza jetre, druge gastrointestinalne bolesti, cistična fibroza) – <i>povišeni rezultati</i>
Ukupan prostata specifičan antigen (tPSA)	<ol style="list-style-type: none"> 1. HAMA i heterofilna protutijela mogu interferirati u imunokemijskom određivanju – <i>povišeni ili sniženi rezultati</i> 2. hormonska terapija – <i>povišeni rezultati</i> 3. transrektalna ultrazvučna dijagnostika i biopsija prostate, te ostale manipulacije – <i>povišeni rezultati</i> 4. ejakulacija – <i>povišeni rezultati</i> 5. ostale maligne bolesti (karcinom dojke, neoplazme žlijezda slinovnica, preiuretalnih i analnih žlijezda) – <i>povišeni rezultati</i> 6. produljeno vrijeme do centrifugiranja i pohrane za fPSA, te obrada toplinom – <i>sniženi rezultati</i>

Tumorski biljeg	Moguće interferencije i drugi analitički izvori varijacija, te mogući utjecaj na rezultate
Ukupni humani korionski gonadotropin (ukupni hCG)	<ol style="list-style-type: none"> 1. prozonski učinak visokih koncentracija – <i>sniženi rezultati</i> 2. heterofilna antitijela, nespecifični proteinski nosači, hCG slične supstance – <i>povišeni rezultati</i> 3. bubrežna insuficijencija, menopauza – <i>povišeni rezultati</i> 4. prisutnost trofoblastičnog ili netrofoblastičnog tumora – <i>povišeni rezultati</i> 5. toplinska obrada (moguća disocijacija na slobodne podjedinice) – <i>sniženi rezultati</i> 6. upotreba <i>canabisa</i> – <i>povišeni rezultati</i>
Citokeratinski fragment 19 (Cyfra 21-1)	<ol style="list-style-type: none"> 1. endotrahealna intubacija, dugotrajna viokotlačna ventilacija – <i>povišeni rezultati</i> 2. traume pluća – <i>povišeni rezultati</i> 3. zagađenje uzorka sekretima, osobito slinom – <i>povišeni rezultati</i> 4. kratko vrijeme poluživota (2-5 sati) – <i>sniženi rezultati</i>

sti HCG u zdravih žena koje treba sistematično ispitati kako bi se isključili određeni maligni procesi i spriječila neprikladna operacija i liječenje. Pri tome potrebno je dugotrajno praćenje jer se tumori mogu pojaviti nakon mnogo mjeseci i godina. Važno je zapamtiti da neoplazma zdjelice u žena s hidrotoraksom, ascitesom i povećanim vrijednostima CA 125 može biti benigna i brzo se riješiti operacijom. Serumski PSA se obično smanjuje relativno brzo, ali treba više od mjeseca (do 9 mjeseci u jednom ispitivanju) da se rezultati vrate unutar referentnog intervala.

ANALITIČKI ČIMBENICI PRI ODREĐIVANJU TUMORSKIH BILJEGA

Analitički dio laboratorijskog procesa provodi se u cijelosti unutar medicinsko-biokemijskog laboratorija, pa su NACB preporuke (3), u ovom dijelu, usmjerene na kontrolu validacije testa, provođenje unutarnje i vanjske kontrole kakvoće rada laboratorija. Značajan dio odnosi se na prepoznavanje i uklanjanje interferencija u metodama za određivanje tumorskih biljega. Interferencije mogu biti egzogene i endogene. Egzogene potječu od vrste metodologije i opreme koja se koristi pri određivanju tumorskih biljega, a najpoznatije su križna reakcija (npr. kad se određuju PSA ili HCG), i prozonski efekt (npr. pri određivanju AFP, HCG u stanjima koja su potencijalno fatalna, ali izlječiva poput hepatoblastoma dječje dobi i gestacijske trofoblastične neoplazije). Endogene interferencije potječu od svojstava samog uzorka i najčešće se iskazuju utjecajem onih supstanci koje imaju strukturu antitijela koja mogu biti heterofilna i anti-animalna antitijela (npr. pri određivanju HCG i CA 125) i onih koje nemaju strukturu antitijela. (10)

POSILIJEANALITIČKI ZAHTJEVI KVALITETE

Poslijeanalitički zahtjevi uključuju dobru informiranost o uzorku, odnosno pojašnjenje koje se treba nalaziti uz postojanje sumnje ili dijagnosticirane malignosti ili stupnja tretmana (npr. prije operacije, poslije operacije, prije kemoterapije). Takva informacija je bitna ako se radi laboratorijska

interpretacija i može pomoći u identifikaciji povremenih laboratorijskih pogrešaka (npr. zamjena uzoraka na analizatoru). Pri tumačenju rezultata postoje zahtjevi za tumačenje usporedbom s referentnim intervalima. **Referentni intervali** su obično najvažniji za pacijente s karcinomom prije tretmana, nakon čega pacijentova vlastita "bazalna vrijednost" pruža najvažniju referentnu točku za interpretaciju rezultata tumorskog biljega. Ako je ona dobro utvrđena, povećanje čak unutar referentnog intervala može za pacijenta biti značajno. Isto tako, ako je tumorski biljeg ispod normalne ili uobičajene granične vrijednosti, svako stalno povećanje mora se tretirati kao mogući recidiv, pod uvjetom da je metoda određivanja ista. Izvještavanje o kritičnom povećanju koncentracije tumorskog biljega te uzimanje u razmatranje analitičke izvedbe određivanja i individualnog referentnog intervala, doprinose ranijoj dijagnostici recidiva. Stoga je osobito važno poznavanje **značajne promjene tumorskog biljega**. Postotak povećanja ili smanjenja koji predstavlja značajnu promjenu treba biti definiran i treba uzeti u obzir i analitičku i biološku varijaciju o čemu laboratoriji trebaju biti u mogućnosti dati savjet. Premda postoje različita tumačenja značajne promjene vrijednosti tumorskih biljega, općenito se smatra da potvrđeno povećanje ili smanjenje od $\pm 25\%$ klinički značajno. Jedan od poslijeanalitičkih zahtjeva je i postojanje definiranog protokola pri promjeni metode, uz koji je potrebna dobra komunikacija s glavnim korisnicima prije nego što se metoda promjeni. U svakodnevnoj rutinskoj praksi pri traženju određivanja tumorskih biljega vrlo je važno poznavanje njihova **poluživota** koje je definirano kao vrijeme 50%-tnog smanjenja koncentracije cirkulirajućeg tumorskog biljega nakon potpunog uklanjanja tumorskog tkiva. Najznačajnija vremena poluživota jesu: AFP 4 dana, CA 125 5-10 dana, CA 19-9 4-8 dana, CA 15-3 5-7 dana, CEA 7 dana, HCG 0,5-1,5 dana, LD 10-54 sati, tPSA 4-7 dana, fPSA 2 sata-7 dana, SCC 1 dan. U **zahtjevima izvještavanja** o rezultatima predviđa se mogućnost prikaza kumulativnih rezultata ili grafičkih prikaza tumorskog biljega. Korisni nalazi olakšavaju interpretaciju

i komunikaciju između laboratorija i klinike. Nalazi trebaju inkorporirati svaku dostupnu kratku kliničku informaciju, posebno datum operacije itd. Stoga na nalazima treba navesti upotrebljavanu metodu i istaknuti je li vjerojatno da promjena metode ima utjecaj na interpretaciju trenda rezultata tumorskog biljega. Isto tako laboratoriji trebaju biti spremni dati savjet o učestalosti praćenja i potrebi za potvrdnim uzorcima, te uvijek poticati dobru komunikaciju s korisnicima usluga koja olakšava prikladno korištenje tih (i ostalih) pretraga. (12)

PRIMJENA TUMORSKIH BILJEGA

1. Testikularni karcinom

Kad postoji sumnja na testikularni karcinom, prije tretmana je obavezno određivanje humanog korionskog gonadotropina (HCG), α -fetoproteina (AFP) i laktat-dehidrogenaze (LD). Određivanje HCG, AFP i LD je obavezno za stupnjevanje i stratifikaciju rizika prema *International germ cell Consensus Classification* (IGCCC) Ako su AFP, HCG i/ili LD povećani prije terapije, treba ih pratiti tjedno dok njihove vrijednosti ne budu unutar referentnog intervala. Vrijednosti tumorskog biljega koje prelaze gornju granicu referentnog intervala nakon terapije ukazuju na ostatnu bolest, koju treba potvrditi ili isključiti drugim pretragama. Serijsko praćenje s AFP, HCG i LD preporučuje se i kad vrijednosti nisu povećane prije terapije, budući da se ekspresija tumorskog biljega može promijeniti tijekom terapije. Učestalost određivanja ovisi o stadiju i patologiji bolesti, ali je treba odrediti prema dogovorenim protokolima. Budući da su bazalne vrijednosti individualne, povećanja vrijednosti tumorskog biljega važnija su nego apsolutne koncentracije. Povećanje vrijednosti mora biti potvrđeno u drugom uzorku i treba svakako razmotriti mogućnost prolaznog povećanja zbog nespecifične interferencije (npr. jatrogeni hipogonadizam). Nomenklaturu Internacionalne federacije za kliničku kemiju (IFCC) za HCG treba primjenjivati uz opis metode određivanja, a pri interpretaciji rezultata vrlo važno je razmotriti mogućnost interferencija (npr. zbog heterofilnih antitijela) i prolazna povećanja (npr. zbog kemoterapije)

2. Karcinom prostate

PSA je trenutno najkorisniji serumski tumorski biljeg u tretmanu pacijenata s karcinomom prostate i nužan u svim stadijima bolesti. Međutim, obzirom na raspravu što se tiče upotrebe PSA za otkrivanje vrlo malih tumora, objavljene koristi, koje proizlaze iz smanjenja razine kliničke odluke na manje od 4 mg/L za biopsiju, previše su nepouzdana da bi obvezale na bilo koju opću preporuku. Granične vrijednosti, manje od obično korištene granice od 4 mg/L, povećati će osjetljivost s pratećim smanjenjem specifičnosti osim ako su primijenjene druge dodatne pretrage ili mjere za povećanje specifičnosti. Obratno, upotreba razine kliničke odluke za PSA većih od 4 mg/L smanjuje osjetljivost, što rezultira propuštenim dijagnozama klinički značajnih tumora u muškaraca koji mogu potencijalno imati koristi od ranog tretmana. Upotreba %fPSA preporučuje se kao pomoć u razlikovanju muškaraca s karcinomom prostate od muška-

raca s benignom hiperplazijom prostate kada je vrijednost ukupnog PSA u serumu unutar raspona od 4 do 10 mg/L i digitorektalni pregled negativan, u muškaraca podvrgnutih ponovljenoj biopsiji, u selekcioniranim visokorizičnim skupinama i osobito u identifikaciji muškaraca koji imaju karcinom prostate unatoč početnim negativnim nalazima biopsije. Razina kliničke odluke mora biti ispravno validirana za svaku kombinaciju pretraga fPSA i tPSA. Odluka o tome može li se preporučiti probiranje na karcinom prostate s PSA u općoj populaciji, mora čekati ishod prospektivnih randomiziranih istraživanja koja su u tijeku (npr. ERSPC – European Randomized Screening for Prostate Cancer, ispitivanja u Europi) kojima je rok završetka bila 2010. godina. U pacijenata s karcinomom prostate preporučuje se određivanje PSA za praćenje statusa bolesti nakon tretmana. Kod određivanja PSA krv treba uzeti prije bilo kakve manipulacije prostatom i nekoliko tjedana nakon izlječenja prostatitisa. Uzorke treba centrifugirati i staviti na hladno unutar 3 sata od uzorkovanja; što je osobito važna preporuka fPSA, koji je nestabilniji od tPSA. Uzorci se mogu čuvati na +4 °C do 24 sata, ali uzorke koji se neće analizirati unutar 24 sata od uzorkovanja, treba čuvati zamrznute (najmanje na -20°C, a bolje na -30°C ili niže). Za dugotrajno čuvanje, uzorke treba zamrznuti na -70°C ili niže.

3. Kolorektalni karcinom

U laboratorijskoj dijagnostici kolorektalnog karcinoma CEA ne može se koristiti za probiranje zdravih osoba na rani kolorektalni karcinom. Predoperacijske koncentracije CEA mogu se koristiti u kombinaciji s drugim faktorima u planiranju operacije, ali se, trenutno, ne trebaju koristiti za selekciju pacijenata za adjuvantnu kemoterapiju. U pacijenata s povećanim koncentracijama CEA (> 5 mg/L) valja procijeniti prisutnost udaljenih metastaza.

CEA treba određivati svakih 3 mjeseca u pacijenata sa stadijem II ili III kolorektalnog karcinoma, najmanje 3 godine nakon postavljanja dijagnoze, ako je pacijent kandidat za operaciju ili sistemsku terapiju metastatske bolesti. U pacijenata s uznapredovalim kolorektalnim karcinomom podvrgnutih sistemskoj terapiji, treba redovito određivati CEA. Potvrđeno povećanje vrijednosti CEA (> 30%) ukazuje na progresivnu bolest, pod uvjetom da se mogućnost lažno pozitivnih povećanja može isključiti. Upotreba TS, MSI, DCC, uPA, PAI-1 ili p53 za određivanje prognoze ili predviđanje odgovora na terapiju se ne preporučuje kao ni rutinsko određivanje CEA. Određivanje statusa mutacije k-ras možda će se u budućnosti koristiti za predviđanje koristi od specifičnih anti-EGFR antitijela. NACB preporučuje da sve osobe u dobi od 50 i više godina treba podvrgnuti probiranju na kolorektalni karcinom. Budući da najučinkovitija pretraga probiranja nije poznata, izabrana metoda najvjerojatnije ovisi o riziku od kolorektalnog karcinoma, lokanoj raspoloživosti i osobnoj sklonosti. Premda je test na okultno krvarenje najbolje validirana metoda probiranja na kolorektalni karcinom, može se također izabrati ispitivanje DNA u stolicama. Moguće štetne posljedice probiranja su komplikacije zbog kolonoskopije i tretmana, mogućnost pretjeranih di-

jagnoza što dovodi do nepotrebnih ispitivanja te lažno negativni i lažno pozitivni rezultati. Probiranje na genetičku podložnost kolorektalnog karcinoma treba započeti s detaljnom anamnezom. Prije ispitivanja, osobe trebaju otići na genetičko savjetovanje. U osoba sa sumnjom na obiteljsku adenomatoznu polipozu (FAP), genetičko ispitivanje se može koristiti i za potvrdu dijagnoze u sumnjivog ispitanika i za procjenu rizika u presimptomatskih članova obitelji. Pod uvjetom da je mutacija odgovorna za FAP unutar obitelji poznata, ispitivanje na APC mutacije se može razmotriti za rizične članove obitelji. Ispitivanje MSI i/ili specifičnih *mismatch repair* enzima može se koristiti kao predprobiranje na nasljedni nepolipozni kolorektalni karcinom (HNPCC). Ako je nađeno da osoba ima visoku MSI, treba provesti genetičko ispitivanje mutacija u *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ili *PMS2* gena

4. Karcinom dojke

Veliki značaj kao prediktivni i prognostički biljezi imaju estrogenski (ER) i progesteronski receptori (PR), te ih treba odrediti u svih pacijentica s karcinomom dojke. Primarna svrha određivanja tih receptora je identifikacija pacijentica s karcinomom dojke koje se mogu liječiti s hormonskom terapijom. U kombinaciji s utvrđenim prognostičkim faktorima (stadijem tumora, stupnjem tumora i brojem limfnih čvorova zahvaćenih metastazama), ER i PR se mogu također koristiti u kratkotrajnoj prognozi u pacijentica s novodijagnosticiranim karcinomom dojke. U svih pacijentica s invazivnim karcinomom dojke treba odrediti i HER-2. Primarna svrha određivanja HER-2 je selekcija pacijentica s karcinomom dojke koje mogu biti liječene s trastuzumabom, a također može identificirati pacijentice koje imaju koristi od adjuvantne terapije koja uključuje antraciklin. uPA i PAI-1 se mogu koristiti za identifikaciju pacijentica s karcinomom dojke i negativnim limfnim čvorovima koje ne trebaju ili je malo vjerojatno da bi imale koristi od adjuvantne terapije, a treba ih određivati validiranim metodama u ekstraktima svježeg ili svježeg zamrznutog tkiva tumora. Od laboratorijski poznatijih tumorskih biljega za karcinom dojke, CA 15-3 ne treba rutinski koristiti za rano otkrivanje recidiva/metastaza u asimptomatskih pacijentica s dijagnosticiranim karcinomom dojke. Međutim, budući da neke pacijentice, kao i neki liječnici, mogu tražiti određivanje CA 15-3, konačnu odluku mora donijeti liječnik u konzultaciji s pacijenticom. U kombinaciji s radiologijom i kliničkim pregledom, CA 15-3 se može koristiti za praćenje učinka kemoterapije u pacijentica s uznapredovanim karcinomom dojke. U pacijentica kojima se ne može procijeniti bolest, stalno povećanje koncentracije tumorskog biljega ukazuje na progresiju bolesti. CEA ne treba koristiti za rano otkrivanje recidiva/metastaza u pacijentica s dijagnosticiranim karcinomom dojke, ali o tome konačnu odluku mora donijeti liječnik u konzultaciji s pacijenticom. U kombinaciji s radiologijom i kliničkim pregledom, CEA se može koristiti za praćenje učinka kemoterapije u pacijentica s uznapredovalim karcinomom dojke. U pacijentica kojima se ne može procijeniti bolest, stalno povećanje koncentracija CEA ukazuje na progresiju bolesti.

Ispitivanje mutacije *BRCA 1* i *BRCA 2* može se koristiti za identifikaciju žena s visokim rizikom za razvoj karcinoma dojke ili jajnika u visokorizičnim obiteljima. Za žene s takvim mutacijama, probiranje treba započeti između 25 i 30 godina. Međutim, nedovoljno je podataka da se preporuči specifična strategija nadzora/probiranja za žene s visokim rizikom. Odgovarajuća konzultacija treba biti pružena svakoj osobi s obzirom na ispitivanje *BRCA 1* i *BRCA 2*. Nijedan profil ekspresije gena temeljen na mikročipovima, trenutno dostupan, ne treba rutinski koristiti za predviđanje ishoda bolesti. Test se može koristiti za predviđanje recidiva u pacijentica s negativnim limfnim čvorovima i pozitivnim na ER koje primaju tamoksifen. Pacijentice kojima se predviđa dobar ishod mogle bi izbjeći tretman s adjuvantnom kemoterapijom. Test se također može koristiti za predviđanje koristi od adjuvantne terapije u pacijentica s negativnim limfnim čvorovima i pozitivnim na ER.

5. Karcinom jajnika

Određivanje CA 125 treba provesti ubrzo nakon kratkotrajnog centrifugiranja i odvajanja seruma od ugruška, a uzorke čuvati na +4 °C (1-5 dana), kratkotrajno na 20°C (2 tjedna do 3 mjeseca) ili dugotrajno na -70 °C. CA 125 se ne preporučuje za probiranje asimptomatskih žena već se preporučuje zajedno s transvaginalnim ultrazvukom, za rano otkrivanje karcinoma jajnika u žena s nasljednim sindromima budući da rana intervencija može biti korisna. Značaj određivanja CA 125 proizlazi iz primjene u razlikovanju benigne od maligne sumnjive mase u zdjelici, osobito u žena nakon menopauze. Određivanje CA 125 se mogu koristiti za praćenje odgovora na kemoterapiju. Prvi uzorak treba uzeti unutar 2 tjedna prije tretmana te naredne uzorke između 2. i 4. tjedna tijekom tretmana i u intervalima od 2 do 3 tjedna tijekom praćenja. Cijelo vrijeme treba koristiti istu metodu, a pacijentice koje primaju terapiju s anti-CA 125 antitijelima ne mogu se procijeniti ovim testom. Određivanje CA 125 za praćenje preporučuje se ako su vrijednosti u početku povećane. Premda intervali praćenja još nisu definirani, trenutna praksa predlaže praćenje pacijentica svakih 2 do 4 mjeseca tijekom 2 godine i nakon toga rjeđe. Određivanje CA 125 tijekom primarne terapije se preporučuje budući da koncentracije CA 125, i prije i poslije operacije, mogu biti od prognostičkog značenja. Stalna povećanja ukazuju na lošu prognozu. CA 125 je jedini tumorski biljeg koji se može preporučiti za korištenje u malignim bolestima jajnika. Novi tumorski biljezi karcinoma jajnika su obećavajući, ali njihov doprinos trenutnom standardu skrbi nije poznat i potrebna su daljnja dobro oblikovana klinička istraživanja.

6. Karcinom jetre

Određivanje a-fetoproteina (AFP) i ultrazvuk abdomena treba provesti svakih 6 mjeseci u pacijenata s visokim rizikom za hepatocelularni karcinom (HCC), posebno u onih s cirozom jetre povezanoj s hepatitis B i hepatitis C virusom. Ako su koncentracije AFP > 20 µg/L i ako se povećavaju, treba odmah provesti daljnje ispitivanje iako je nalaz ultrazvuka negativan. U pacijenata s rizikom za HCC, kontinuirano

povećanje AFP može se koristiti zajedno s ultrazvukom kao pomoć za rano otkrivanje karcinoma i upućivanje na daljnju obradu. Žarišne promjene < 1 cm detektirane ultrazvukom treba pratiti svaka 3 mjeseca ultrazvukom. Promjene od 1-2 cm u cirotičnoj jetri treba ispitati s 2 slikovne pretrage (npr. kompjutorizirana tomografija i magnetska rezonancija). Ako su žarišne promjene u skladu s HCC, treba ih tretirati, a ako nisu, treba provesti biopsiju. Ako su promjene > 2 cm, AFP > 200 µg/L i nalaz ultrazvuka tipičan za HCC, smatra se da biopsiju nije potrebno provesti. U kombinaciji s drugim prognostičkim faktorima, koncentracije AFP mogu dati prognostičku informaciju u netretiranih pacijenata s HCC i onih podvrgnutih resekciji jetre, pri čemu visoke koncentracije AFP ukazuju na lošu prognozu. Određivanje AFP preporučuje se za praćenje statusa bolesti nakon resekcije jetre ili transplantacije jetre za otkrivanje recidiva ili nakon ablative terapije i primjene palijativnog tretmana. Premda intervali praćenja nisu definirani, sadašnja je praksa praćenje pacijenata svaka 3 mjeseca tijekom 2 godine i nakon toga svakih 6 mjeseci. AFP je trenutno jedini tumorski biljeg koji se može preporučiti za kliničku upotrebu u malignostima jetre.

7. Karcinom mokraćnog mjehura

Semikvantitativna detekcija (BTA stat) faktora H komplementa (CFH) i proteina povezanih s CFH u mokraći i kvantitativna EIA metoda (BTA trak) se ne preporučuju za probiranje i dijagnostiku karcinoma mokraćnog mjehura, a ni za praćenje pacijenata nakon tretmana karcinoma mokraćnog mjehura. Zajedno s cistoskopijom u izabranih pacijenata mogu dati dodatnu informaciju, ali nema dokaza da poboljšavaju ishod. Kvantitativno određivanje proteina nuklearnog matriksa 22 u mokraći (NMP22) i Blader Chek NMP22 (ista pretraga kao POCT) se ne preporučuju za primarno otkrivanje karcinoma mokraćnog mjehura ili za rutinsko praćenje pacijenata nakon tretmana karcinoma mokraćnog mjehura. U izabranih pacijenata i zajedno s cistoskopijom, mogu dati dodatnu informaciju, ali također nema dokaza da poboljšavaju ishod. Detekcija biljega povezanih s karcinomom na ekfolijacijskim stanicama (*Immunocyt*) i detekcija stanica karcinoma na temelju aneuploidije izabranih kromosoma (Urovysion) se ne preporučuju za primarno otkrivanje karcinoma mokraćnog mjehura ili za rutinsko praćenje pacijenata nakon tretmana karcinoma mokraćnog mjehura. Zajedno s cistoskopijom u izabranih pacijenata mogu dati dodatnu informaciju, ali nema dokaza da poboljšavaju ishod.

8. Karcinom vrata maternice

Trenutno dostupni serumski tumorski biljezi, uključujući antigen karcinoma ljuskaste stanice (SCC), se ne preporučuju za probiranje ili dijagnostiku karcinoma vrata maternice. Koncentracije SCC prije tretmana mogu dati dodatnu informaciju jer su povezane s metastazama u limfnim čvorovima

i zahtijevaju adjuvantni tretman te se mogu koristiti za planiranje individualnog tretmana u pacijentica s karcinomom pločastih stanica niskog stupnja, ali se zasad ne preporučuju za rutinsku upotrebu. Povećana koncentracija SCC prije tretmana je neovisan faktor rizika za lošu prognozu, ali klinička korisnost za planiranje tretmana nije pouzdana, pa se zasad ne preporučuje za rutinsko određivanje prognoze u pacijentica s karcinomom vrata maternice. Praćenje koncentracije SCC nakon primarnog tretmana dobro korelira s kliničkim tijekom bolesti u pacijentica s karcinomom pločaste stanice, ali nema jasnog dokaza da ranije otkrivanje poboljšava ishod.

9. Karcinom želuca

Trenutno dostupni serumski tumorski biljezi se ne preporučuju za probiranje ili dijagnostiku karcinoma želuca, te nemaju neovisnu prognostičku vrijednost u karcinomu želuca i ne preporučuju se za prognozu i predviđanje. Smatra se da rutinsko određivanje CEA ili CA 19-9 se nije preporučljivo.

10. Ostali tumori

Kako za preostale, nabrojane tumore, ne postoje preporuke za primjenu određenih tumorskih biljega spomenut ćemo samo ustaljena klinička određivanja, koje su još uvijek tema mnogobrojnih studija. Najčešći tumorski biljezi za praćenje uspješnosti terapije i ranom otkrivanju recidiva primarne bolesti ili metastaza za melanom su laktat-dehidrogenaza (LD), S-100, TA90-IC; za tumore paratireoidne žlijezde to su para-tireoidni hormon (PTH) i kalcij; za karcinom štitnjače tiroglobulin (TG) antitireoglobulinska antitijela (anti TG) i kalcitonin. U dijagnostici karcinoma pluća najčešće se koriste neuronspecifična enolaza (NSE), CEA, citokeratinski fragment 21-1 (CYFRA21-1) čijim je kombiniranjem moguće pratiti histološki različitu etiologiju plućnih karcinoma. Od novijih tumorskih biljega valja napomenuti primjenu kromogranina kao jednog od najosjetljivijih biljega neuroendokrinih tumora poput karcinoida i neuroblastoma, te humani epididimis protein 4 (HE4) koji uz CEA 125 značajno poboljšava dijagnostiku i procjenu ginekoloških karcinoma.

ZAKLJUČAK

Zbog nedovoljne dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti, određivanje vrijednosti tumorskih biljega vrlo je važno u praćenju napredovanja bolesti i odgovora na terapiju, te se prvenstveno koriste kao pomoć pri postavljanju dijagnoze uz primjenu drugih dijagnostičkih postupaka. Promjene u koncentraciji mogu dati značajne kliničke podatke, osobito ako su one posljedica odgovora na primijenjenu terapiju. Pri tumačenju rezultata tumorskih biljega posebnu pažnju potrebno je usmjeriti pravilnom tumačenju svih čimbenika koji na rezultate mogu utjecati *in vivo* ili interferirati *in vitro* pri čemu su preporuke NACB od izuzetne važnosti.

Izvori

1. Žižić V, Linarić I, Obuljen J, Brumen V, Nakić M. *Važnost tumorskih biljega u dijagnostici i praćenju malignih bolesti*. Paediatr Croat 2006; 50 (supl 1): 203-208.
2. Štraus B, Karmela B. *Protein*, u: Čepelak D. i Čvorišćec I. (ur.): *Štrausova medicinska biokemija*. Medicinska naklada Zagreb, 2009; 195-98.
3. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: *Use of Tumor Markes in Clinical Practice. Quality Requirements*. American association for clinical chemistry 2009, pristupljeno 06. 07. 2011
4. Štraus B, Lada R. *Biokemija i dijagnostika zloćudnih tumora*, u: Čepelak D. i Čvorišćec I. (ur.): *Štrausova medicinska biokemija*. Medicinska naklada Zagreb, 2009; 522-533.
5. Stanković S. *Tumorski markeri: metode određivanja*. Jugoslav Med Biohem 2006; 5: 89-101.
6. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: *Use of Tumor Markes in Testicular, Prostate, Colorectal, Breast, and Ovarian Cancers*. American association for clinical chemistry 2009, pristupljeno. 06. 07. 2011.
7. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: *Use of Tumor Markes in Liver, Bladder, Cervical, and Gastric Cancers*. American association for clinical chemistry 2010, pristupljeno 06. 07. 2011.
8. Thomas L, Lamerz R, Stieber P. *Tumor Markers*, u: Thomas L. (ur.): *Clinical Laboratory Diagnostics*. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 1998; 941-94.
9. Basuyau JP, Leroy M, Brunelle P. *Determination of Tumor Markers in Serum. Pitfalls and Good Practice*. Clin Chem Lab Med.2001; 39(12): 1227-33.
10. Dodig S. *Interferencije svojstvene kvantitativnim imunokemijskim metodama*. Biochemia Medica 2009; 19(1): 50-62.
11. Preissner CM, Dodge LA, O'Kane DJ, SinghRJ and Grebe SKG. *Prevalence od Heterophilic Antibody Interference in Eight Automated Tumor marker Immunoassays*. Clin Chem 2005; 51: 208-210.

Adresa za dopisivanje: dr. sc. Lorena Honović,
Djelatnost za laboratorijsku dijagnostiku, Opća bolnica
Pula, Aldo Negri 6