

Comparazione degli indicatori di neoplasia enolasi neurone-specifica e cromogranina A nel carcinoma polmonare a piccole cellule: risultati preliminari

¹L. Giovannella, ¹L. Ceriani, ²M. Bandera, ¹S. Garancini

¹Laboratorio Endocrinologia e Marcatori Tumorali

²Divisione di Malattie dell'Apparato Respiratorio

Azienda Ospedaliera "Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi" – Varese

Riassunto. Il dosaggio dell'enolasi neurone-specifica (NSE) riveste un ruolo consolidato nella valutazione del carcinoma polmonare a piccole cellule (SCLC), neoplasia altamente aggressiva, di derivazione neuroendocrina. La Cromogranina-A (CgA), molecola contenuta nei granuli secretori dei tessuti neuroendocrini è stata identificata, mediante tecniche di immunistochemica e biologia molecolare, nel tessuto di SCLC e, successivamente, rilevata nel circolo periferico di pazienti affetti dalla neoplasia.

Nel presente lavoro è stata comparata la performance diagnostica di NSE e di CgA, determinate con tecnica immunoradiometrica, in un gruppo di pazienti affetti da SCLC. La CgA presenta una sensibilità maggiore dell'NSE, specialmente nello stadio limitato di malattia, e non risulta correlata alla massa tumorale mentre la correlazione tra massa tumorale ed NSE è confermata.

In conclusione, l'aumento della sensibilità diagnostica indotto dall'uso combinato dei due marcatori riduce in modo accettabile la specificità. Nel follow-up e nel monitoraggio della terapia l'NSE, indicatore massa-correlato, presenta presupposti di impiego che non appaiono condivisi dalla CgA.

Introduzione

Il microcitoma polmonare o carcinoma polmonare a piccole cellule (small cell lung cancer, SCLC) rappresenta circa il 25% delle neoplasie polmonari maligne. Le sue caratteristiche biologiche e cliniche lo differenziano nettamente dalle altre forme neoplastiche polmonari (carcinoma spinocellulare, adenocarcinoma e carcinoma bronchiolo-alveolare, carcinoma a grandi cellule) che, nel loro insieme, sono comprese in una categoria classificativa denominata non-SCLC [1].

Lo SCLC è un tumore di derivazione neuroendocrina, caratterizzato da una elevata aggressività biologico-clinica e, nel contempo, da una marcata sensibilità alla chemioterapia. Tuttavia, a causa del progressivo sviluppo di fenomeni di resistenza, il trattamento chemioterapico determina una regressione della malattia nella quasi totalità dei pazienti ma può essere considerato curativo solo in una modestissima percentuale dei casi. Pertanto, la prognosi dei pazienti affetti da SCLC rimane, nel complesso, decisamente negativa [2].

L'enolasi neurone-specifica (NSE), dimero $\gamma\gamma$ dell'enzima glicolitico enolasi, risulta rappresentata elettivamente nel compartimento citoplasmatico delle cellule neuronali e neuroendocrine. L'impiego dell'NSE circolante come indicatore biochimico dello SCLC è ampiamente consolidato e, in relazione alla correlazione dell'indicatore con la massa tumorale, il suo utilizzo risulta particolarmente utile nel monitoraggio della neoplasia in corso di terapia [3,4].

La Cromogranina A (CgA) è una glicoproteina (439 aa, PM 49 kDa) contenuta nella matrice dei granuli secretori elettrodenso delle cellule neuroendocrine [5]. La molecola è stata inizialmente utilizzata nello studio immunistochemico delle neoplasie neuroendocrine e, successivamente, anche quale indicatore circolante delle stesse [6,7]. L'espressione tissutale di CgA è stata dimostrata anche per lo SCLC e, successivamente, è stato descritto l'incremento della CgA circolante nei pazienti affetti dalla neoplasia [8, 9].

Scopo del presente lavoro è stata (1) la comparazione della performance diagnostica di NSE, CgA e della associazione dei due marcatori, in un gruppo di pazienti affetti da SCLC e (2) la valutazione della relazione fra espressione sierica degli indicatori ed estensione della malattia.

Corrispondenza a: Luca Giovannella,
Laboratorio di Endocrinologia ed Oncologia,
Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi,
viale Borri 57, 21100 Varese
tel. 0332 278407 – e-mail: lucamednuc@libero.it

Materiali e Metodi

Sono stati selezionati 31 pazienti consecutivi affetti

da SCLC, confermato su base cito-istologica [biopsia sotto guida di Tomografia Computerizzata (TC) o eseguita in corso di fibrobroncoscopia. La stadiazione della neoplasia è stata condotta secondo i criteri UICC: i pazienti sono stati sottoposti a radiografia standard del torace, ecografia epatica, TC spirale toraco-addominale, TC o Risonanza Magnetica cerebrale e scintigrafia ossea "whole body" con [99mTc]-metilendifosfonato.

Lo stadio di malattia limitata (LD) è stato definito come "malattia limitata ad un emitorace inclusi i linfonodi mediastinici e/o sovra-claveari omolaterali". Ogni ulteriore coinvolgimento distrettuale o estensione di malattia è stato definito come stadio di malattia estesa (ED).

Un gruppo di 50 pazienti affetti da broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), distribuiti per età e sesso analogamente al gruppo di pazienti con SCLC, è stato utilizzato come controllo.

Sono stati esclusi dallo studio soggetti con valori di creatinina sierica eguali o maggiori di 125 mmol/L. In fase pre-terapeutica è stato eseguito un prelievo

ematico, utilizzando un ago di diametro non inferiore a 18 gauge e con minima venostasi. Il campione, raccolto in provette di plastica con separ-gel, è stato immediatamente sottoposto a centrifugazione (3000 rpm, 5 minuti). Il siero separato è stato suddiviso in aliquote e conservato a -80°C fino al momento del dosaggio. Nessun campione presentava segni di emolisi all'ispezione.

Il dosaggio degli indicatori neuroendocrini è stato effettuato con metodiche immunoradiometriche (NSE Prolifigen® Byk-Sangtec, Svezia e CgA RIA CT®, Cis Bio International, Francia) seguendo le raccomandazioni dei produttori. In accordo con precedenti esperienze, è stato selezionato un cut-off di 100 $\mu\text{g/L}$ per la CgA e di 12.5 $\mu\text{g/L}$ per l'NSE [10, 11].

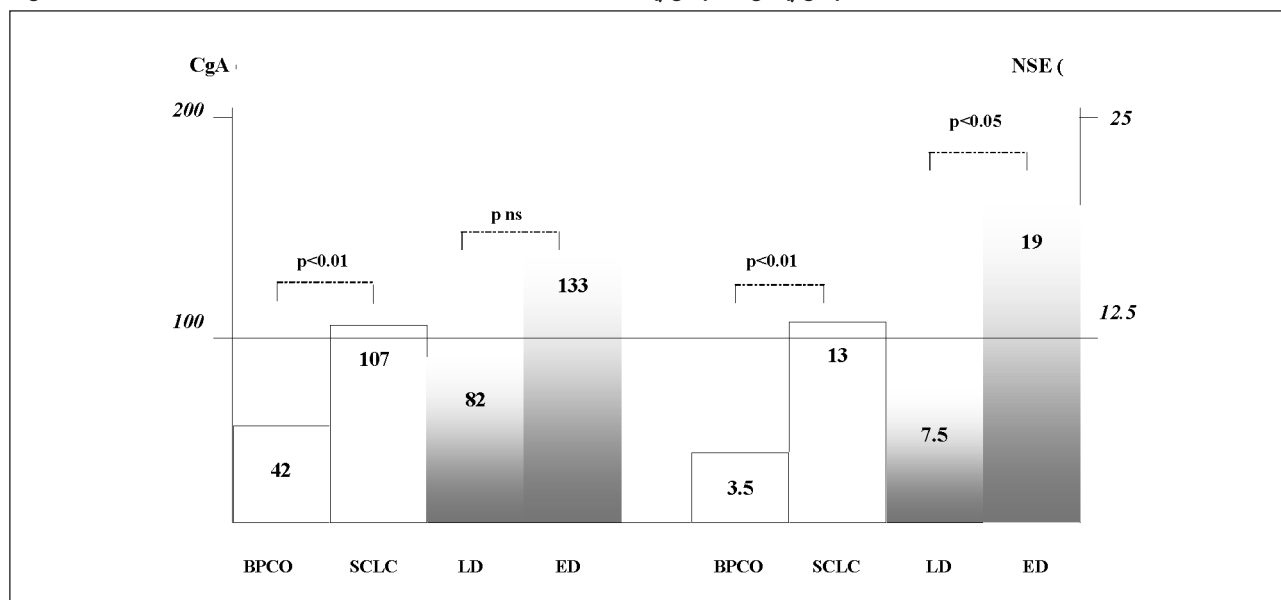
Statistica

La concentrazione degli indicatori biologici non è distribuita normalmente: per tale motivo i dati sono stati espressi come mediana ed intervallo di distribu-

Tabella I. Diagnostiche dei marcatori NSE e CgA e della loro associazione.

| | SENSIBILITA' (n=31) positivi | SPECIFICITA' (n=50) negativi | ACCURATEZZA |
|-------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------|
| NSE | 14/31 (0.45) | 47/50 (0.94) | 0.75 |
| CgA | 16/31 (0.51) | 46/50 (0.92) | 0.76 |
| NSE + CgA | 8/31 (0.26) | 48/50 (0.96) | 0.69 |
| NSE e/o CgA | 22/31 (0.70) | 45/50 (0.90) | 0.82 |

Figura 1. Distribuzione della concentrazione dei marcatori NSE ($\mu\text{g/L}$) e CgA ($\mu\text{g/L}$)



zione ed è stata utilizzata una statistica non-parametrica. Due proporzioni sono state confrontate mediante test del chi-quadro (χ^2) mentre due gruppi di dati sono stati confrontati mediante il test U di Mann-Whitney. Un valore di p inferiore a 0.05 è stato considerato significativo.

Risultati

I risultati ottenuti sono sintetizzati in Tabella I e Figura 1. Nel gruppo di pazienti affetti da SCLC è stata ottenuta una sensibilità diagnostica pari al 45% (14/31) ed al 51% (16/31) per NSE e CgA, rispettivamente.

Confrontando le percentuali di positività dei due indicatori non emergono differenze significative ($\chi^2=0.001$; ns).

La simultanea positività dei due indicatori (NSE+CgA) è stata rilevata in 8 pazienti (26%) mentre la positività simultanea o alternativa (NSE e/o CgA) è stata rilevata in 22 pazienti (70%).

Nel gruppo di controllo sono stati ottenuti valori di specificità pari a 94% e 92% per NSE e CgA, rispettivamente. La specificità ottenuta dalla negatività simultanea dei due indicatori raggiunge il 96% mentre una positività simultanea o alternativa è stata rilevata in 5/50 soggetti (specificità 90%).

L'accuratezza diagnostica complessiva è risultata pari al 75% per l'NSE, al 76% per la CgA, al 69% per la simultanea positività dei due indicatori ed al 82% per la positività di NSE e/o CgA.

La distribuzione dei due indicatori è risultata differente nei pazienti affetti da SCLC e nei controlli: 13 mg/L (5-36) e 3.5 μ g/L (1.5-14) per NSE (U-test ($p<0.01$)) e, rispettivamente, 107 μ g/L (26-841) e 42 μ g/L (15-114) per la CgA (U-test $p<0.01$).

Analizzando la sensibilità degli indicatori in relazione all'estensione di malattia si è dimostrata una positività dell'NSE in 4/16 (25%) casi LD ed in 10/15 (66%) casi ED (χ^2 5.436, $p<0.05$). La CgA è risultata positiva in 7/16 casi LD (43%) ed in 9/15 (60%) casi ED ($\chi^2 = 0.051$, ns).

La concentrazione mediana e l'intervallo di distribuzione degli indicatori in relazione allo stadio di malattia è risultata: 7.50 μ g/L (5-31) in stadio LD e 19 μ g/L in stadio ED per l'NSE (U-test, $p<0.05$) e 82 μ g/L (26-398) in stadio LD e 133 μ g/L (69-841) in stadio ED per la CgA (U-test, ns).

Discussione

Il dosaggio dell'NSE circolante rappresenta un metodo di valutazione biochimica ampiamente consolidato nello studio dello SCLC. La correlazione dell'indicatore con la massa tumorale consente il suo utilizzo in fase di stadiazione e nel monitoraggio della malattia in corso di terapia [12, 13].

Tuttavia, la sensibilità dell'indicatore non risulta particolarmente elevata, specialmente per la malattia in fase limitata ed è stata segnalata anche la possibile elevazione dell'indicatore in presenza di neoplasie non-neuroendocrine o di patologie non oncologiche [14, 15].

Inoltre, l'espressione di NSE a livello eritrocitario e piastrinico può essere responsabile di incrementi della concentrazione dell'indicatore in presenza di fenomeni emolitici anche di minima entità, nonché in relazione a ritardata separazione della componente ematica corpuscolare dal siero [16].

L'indicatore può essere considerato in fase diagnostica complementare alle altre indagini cliniche; tuttavia, concentrazioni elevate dell'indicatore in presenza di lesioni polmonari addensanti assumono significato orientativo in senso neuroendocrino.

L'espressione tissutale della cromogranina A nello SCLC è stata dimostrata con metodi immunoistochimici e tecniche di biologia molecolare [17, 18]

Elevati livelli di cromogranina A circolante sono descritti nello SCLC anche se i dati risultano discordanti circa la frequenza del fenomeno [9, 19].

Questo rilievo può essere ricondotto, almeno in parte, alla eterogeneità delle metodiche di dosaggio della molecola. I dosaggi radioimmunologici competitivi sono basati su anticorpi policlonali in parte diretti contro l'estremità C-terminale della molecola, frequentemente interessata da fenomeni proteolitici [20]. Recentemente è stato sviluppato un metodo IRMA basato sull'impiego di due anticorpi monoclonali diretti contro la regione mediana della molecola (sequenza 145-245), molto meno interessata dai fenomeni proteolitici: ciò consente la rilevazione di diverse forme molecolari della CgA ed anche di peptidi CgA-derivati [21, 22].

Nella nostra esperienza, il metodo IRMA di dosaggio della CgA ha dimostrato una sensibilità diagnostica complessiva sostanzialmente paragonabile, addirittura lievemente superiore, a quella dell'NSE.

La concentrazione sierica dei due indicatori consente una significativa separazione tra il gruppo dei pazienti affetti da SCLC rispetto al gruppo di controllo sia per l'NSE che per la CgA (U-test, $p<0.01$).

La specificità degli indicatori è risultata elevata in pazienti con patologia benigna polmonare, spesso presente anche nei portatori di SCLC.

L'impiego combinato di entrambi gli indicatori può incrementare la sensibilità complessiva con una consensuale, modesta, riduzione della specificità ed una accuratezza diagnostica globale superiore a quella degli indicatori considerati singolarmente.

La concentrazione di NSE appare correlata alla estensione della malattia: tale dato può spiegare, in parte, la modesta sensibilità dell'indicatore nello stadio LD. La concentrazione sierica della CgA risulta maggiore nella malattia estesa ma la differenza non raggiunge la significatività statistica.

Tale rilievo non risulta in accordo con la recente dimostrazione di correlazione fra estensione di malattia e concentrazione di CgA, determinata con metodo ELISA, in 150 pazienti affetti da SCLC [23]

La discrepanza può essere spiegata, tuttavia, in base alla differente numerosità dei due campioni esaminati. Una possibile con-causa di tale rilievo potrebbe dipendere anche dalla diversità metodo impiegato per la determinazione della CgA.

Riveste in ogni caso particolare interesse il rilievo di CgA positiva in circa il doppio dei pazienti in stadio LD rispetto all'NSE.

In conclusione, i dati preliminari ottenuti sembrano indicare un possibile ruolo per l'impiego combinato di NSE e CgA nel sospetto di SCLC. Ulteriori valutazioni saranno necessarie per definire la relazione tra concentrazione di CgA ed estensione tumorale ed analizzare il ruolo prognostico dell'indicatore.

Bibliografia

1. Stjernsward J, Stanley K. Etiology, epidemiology and prevention of lung cancer. *Lung Cancer* 1988; 4: 11-24
2. Hansen HH, Kristjansen PEG. Chemotherapy of small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 1991; 27: 324-49
3. Akoung GM, Scarna HM, Milleron BJ, Benichou MP, Herman DP. Serum neuron-specific enolase: a marker for disease extent and response to therapy for small-cell lung cancer. *Chest* 1985; 87: 39-43
4. Muller LC, Gasser R, Huber H, et al. Neuron-specific enolase (NSE) in small cell lung cancer: longitudinal tumor marker evaluation. *Lung Cancer* 1992; 8: 29-36
5. Simon JP, Aunis D. Biochemistry of the chromogranin A protein family. *Biochem J* 1989; 262: 1-13
6. Stridsberg M, Oberg K, Li Q, Engstrom U, Lundqvist G. Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours. *J Endocrinol* 1995; 144: 49-59
7. Nobels FRE, Kwekkeboom DJ, Coopmans W, et al. Chromogranin A as serum marker for neuroendocrine neoplasia: comparison with neuron-specific enolase and the α -subunit of glycoprotein hormones. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2622-28
8. Totsch M, Muller LC, Hittmar A, Ofner D, Gibbs AR, Schmid KW. Immunohistochemical demonstration of chromogranin A and B in neuroendocrine tumours of the lung. *Hum Pathol* 1992; 23: 312-18
9. Sobol RE, O'Connor DT, Addison J, Suchocki K, Royston I, Deftos LJ. Elevated serum CgA concentrations in small cell lung carcinoma. *Ann Intern Med* 1986; 105: 698-00
10. Baudin E, Gigliotti A, Ducreux M, et al. Neuron-specific enolase and chromogranin A as markers of neuroendocrine tumours. *Br J Cancer* 1998; 78: 1102-07
11. Giovanella L, La Rosa S, Erba P, Capella C, Praloran N, Garancini S. Clinical role of chromogranin-A in diagnosis and staging of neuroendocrine tumours: comparison with neuron-specific enolase and correlation with immunohistochemistry and electron microscopy. *J Endocrinol Invest* 1998; 21: 61 [abs]
12. Carney DN, Marangos PJ, Ihde DC, et al. Serum neuron-specific enolase: a marker for disease extent and response to therapy of small cell lung cancer. *Lancet* 1982; 1: 583-85
13. Bork E, Hansen M, Urdal P, et al. Early detection of response in small-cell bronchogenic carcinoma by changes in serum concentrations of creatine kinase, neuron specific enolase, calcitonin, ACTH, serotonin and gastrin releasing peptide. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988; 24: 1033-38
14. Body JJ, Paesmans M, Sculier JP, et al. Monoclonal immunoradiometric assay and polyclonal radioimmunoassay compared for measuring neuron-specific enolase in patients with lung cancer. *Clin Chem* 1992; 38: 748-51
15. Giovanella L, Piantanida R, Ceriani L, et al. Immunoassay of neuron-specific enolase (NSE) and serum fragments of cytokeratin 19 (Cyfra 21.1) as tumor markers in small cell lung cancer: clinical evaluation and biological hypothesis. *Int J Biol Markers* 1997; 12: 22-26
16. Day INM, Thompson RJ. Levels of immunoreactive aldolase C, creatine kinase BB, neuronal and non-neuronal enolase and 14-3-2 protein in circulating blood cells. *Clin Chem Acta* 1984; 136: 219-28
17. Jensen SM, Gazoar AF, Curtitta F, Russel EK, Linnoila RIA. Comparison of synaptophysin, chromogranins and l-dopa decarboxylase as markers for neuroendocrine differentiation in lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1990; 50: 6068-72
18. Hamid Q, Corrin B, Sheppard MN, Huttner WB, Polak JM. Expression of chromogranin A-mRNA in small cell carcinoma of the lung. *J Pathol* 1991; 163: 293-97
19. Rosa P, Gerdes HH. The granin protein family: markers for neuroendocrine cells and tools for the diagnosis of neuroendocrine tumours. *J Endocrinol Invest* 1994; 17: 207-25
20. Corti A, Gasparri A, Chen X, et al. Characterisation of circulating chromogranin A in human cancer patients. *Br J Cancer* 1996; 73: 924-32
21. Degorce F, Jaquemart L, Baus MH, Bellanger L, Vidaud C, Segin P. Selection of monoclonal antibodies for the measurement of chromogranin A by sandwich assay. *Clin Chem* 1996; 42: S264
22. Degorce F, Goumon Y, Jacquemart L, et al. A new human chromogranin A (CgA) immunoradiometric assay involving monoclonal antibodies raised against the unprocessed central domain (145-245). *Br J Cancer* 1999; 79: 65-71
24. Drivsholm L, Paloheimo LI, Osterlind K, Chromogranin A, a significant prognostic factor in small cell lung cancer. *Br J Cancer*. *Br J Cancer* 1999; 81:667-71.