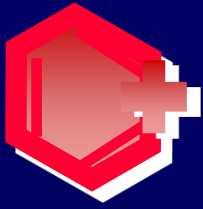




Биохимические маркеры в диагностике и прогнозе НЭО

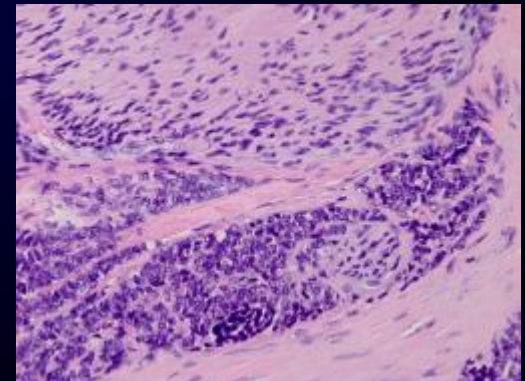
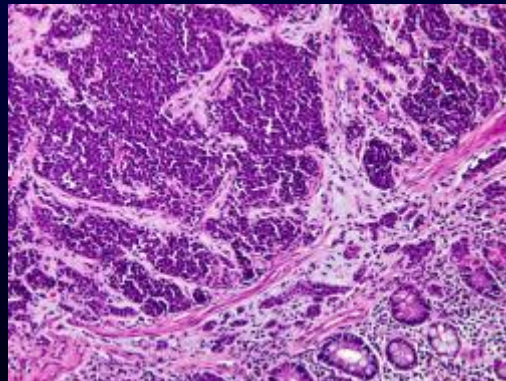
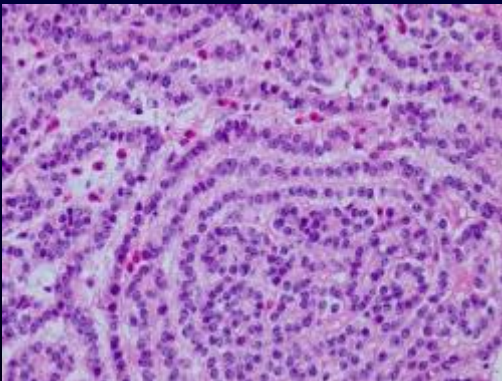
Кушлинский Н.Е.

Национальный медицинский
исследовательский центр онкологии
им. Н.Н. Блохина

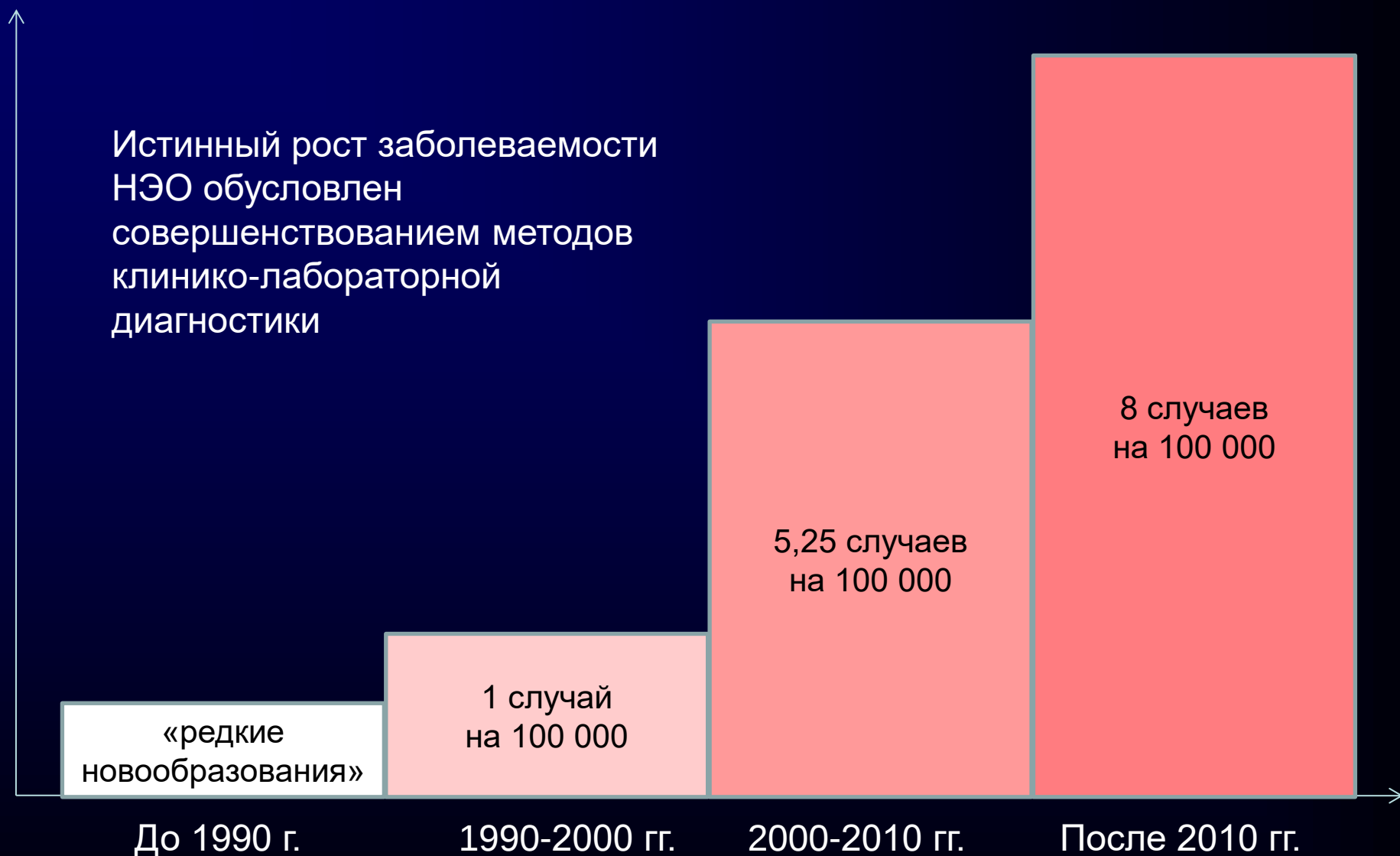


НЕЙРОЭНДОКРИННЫЕ ОПУХОЛИ

- гетерогенная группа новообразований, биологические характеристики которых зависят от их анатомической локализации, клеток-предшественников и способности продуцировать биологически активные соединения, проявляющие себя своеобразными клиническими симптомами и синдромами



Динамика изменения заболеваемости НЭО



История исследования нейроэндокринных опухолей (НЭО)

1867	Лангханс	Впервые описал опухоль с НЭ признаками
1870	Гейденгайн	Окрасил НЭ клетки солями хромовой кислоты
1890	Рэнсон	Впервые представил клиническое наблюдение НЭО с тяжелой диареей и одышкой.
1897	Кульчицкий	Впервые обнаружил энтерохромаффинноподобные клетки в эпителии слизистой тонкой кишки
1902	Бейлис Старлинг	Доказал НЭ природу этих клеток и выделил медиатор секретин
1907	Оберндорфер	Произнес исторический доклад на немецком обществе патологов «Карциноидные опухоли тонкого кишечника». Впервые ввел термин карциноид, обозначающий незлокачественный характер
1914	Мэссон Госсет	Энтерохромаффинные(ЭХ) клетки образуют эндокринную единицу и окрашиваются серебром

История исследования нейроэндокринных опухолей (НЭО)

1938	Фейртер	Разработал концепцию диффузной нейроэндокринной системы
1948	Доусон	Разработал метод окраски ЭХ-клеток нитратом серебра
1952	Эрспамер Асеро	Выделил серотонин в ЭХ-клетках
1953	Ламбек	Выявил серотонин в карциноидной опухоли толстой кишки
1960	РИА	Биохимическая идентификация НЭО. Определение в сыворотке крови инсулина (инсулинома), гастрина (гастринома) с синдромом Золлингер-Эллисона
1963	Вильямс Стандлер	Первая классификация карциноидных опухолей
1968	Пирс	Ввел понятие APUD-системы. Создана биохимическая классификация опухолей по выработке пептидов, гормонов, нейротрансмиттеров

История исследования нейроэндокринных опухолей (НЭО)

1971	Сога Тазава	Разработка гистологической классификации карциноидных опухолей с учетом электронной микроскопии, но недооценена роль пептидов
2000-2004	ВОЗ	Классификация НЭО по системе TNM

Классификация ВОЗ учитывает:

Локализация

Размер

Распространенность за пределы опухоли

Наличие МТС в лимфоузлах

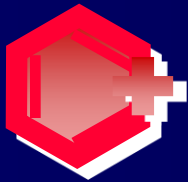
Наличие МТС в отдаленных органах

Митотический индекс

Уровень пролиферации

Ангиоинвазия

Гормональная продукция



Характеристика НЭО

Клиническая, биохимическая, морфологическая характеристики и классификация НЭО – крайне сложная проблема, несмотря на то, что они впервые описаны в 1867 году.

Развитие, клиническое течение, «биологическое поведение» НЭО – предмет активной дискуссии до настоящего времени и это связано с тем, что:

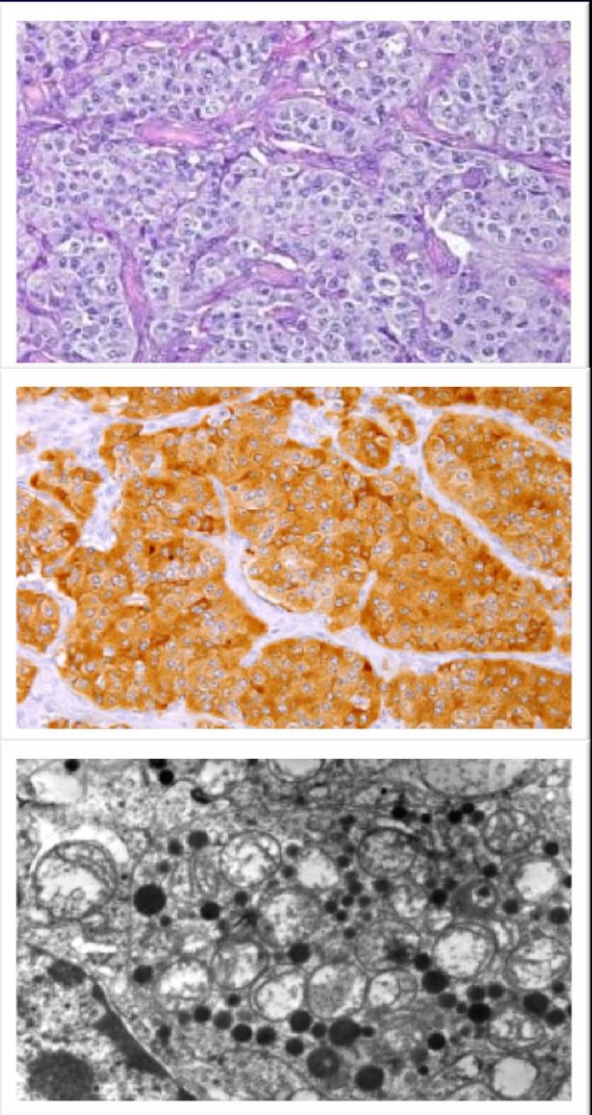
- Заболеваемость НЭО значительно увеличилась
- НЭО могут возникать в любых органах
- У большинства болезнь протекает бессимптомно
- **Все НЭО обладают биологическим потенциалом злокачественности**
- Клиническое течение медленное или крайне агрессивное
- Диагностируется на поздних стадиях
- У большинства пациентов выявляют МТС при первичном обследовании

Общие морфологические и биологические характеристики НЭО

- Гистологическая структура
- ✓ Органоидный тип строения

- Иммуногистохимия (ИГХ)
- ✓ Хромогранин А, синаптофизин, CD56

- Электронная микроскопия
- ✓ Секреторные гранулы

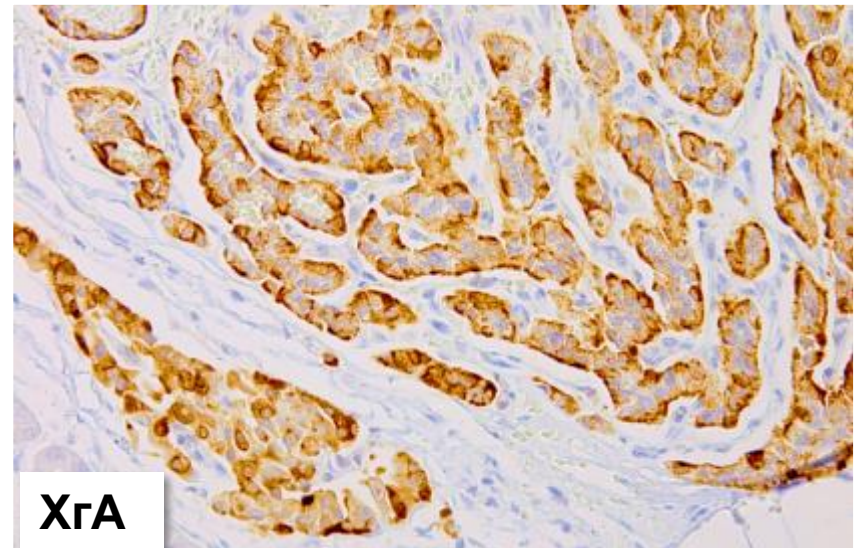


НЭО представляют собой отдельную категорию новообразований, которые демонстрируют общие морфологические и биологические НЭ характеристики

ИГХ исследование. Высокодифференцированные НЭО

Хромогранин А (ХгА)

Определяется в гранулах большинства НЭО, как функционирующих, так и нефункционирующих. ХгА может не определяться в некоторых НЭО толстой кишки и аппендикса, которые исходно секретируют ХгВ, и в низкодифференцированных опухолях.

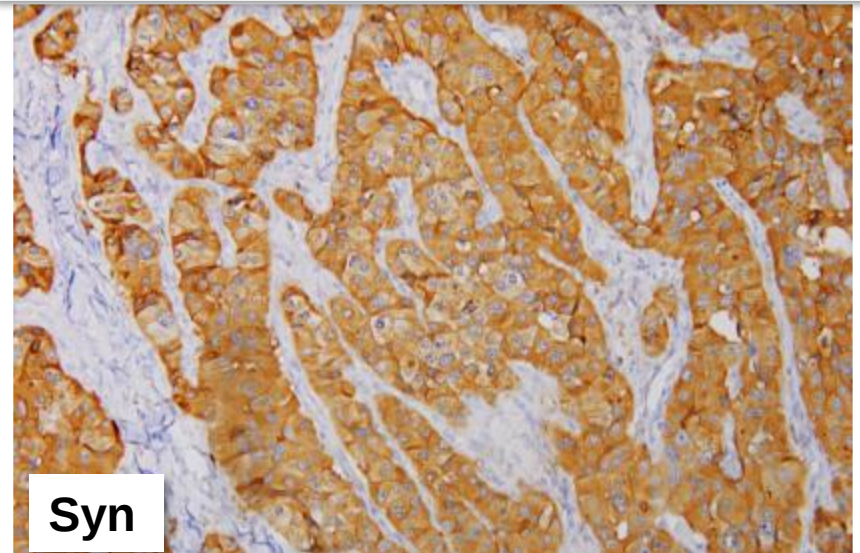


ХгА

Синаптофизин (Syn)

Экспрессируется независимо от наличия секреторных гранул.

Помогает в идентификации низкодифференцированных и содержащих мало гранул НЭО, при которых может отсутствовать экспрессия ХгА. Экспрессия не ограничивается нейроэндокринными клетками.



Syn

Нейроэндокринная природа высокодифференцированных эпителиальных опухолей определяется с использованием двух основных ИГХ маркеров (ХгА и синаптофизина)

ИГХ исследование. Низкодифференцированный НЭР

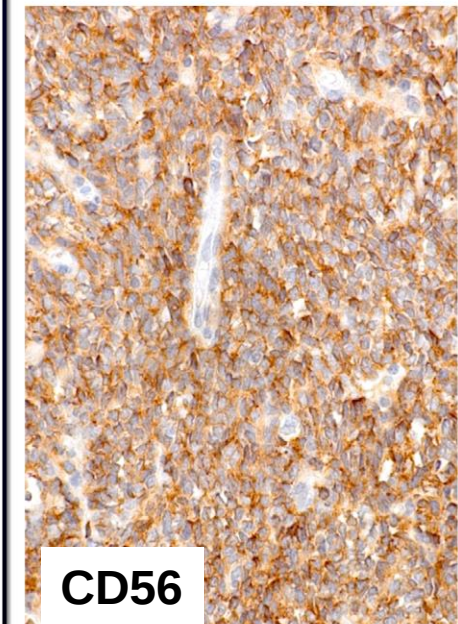
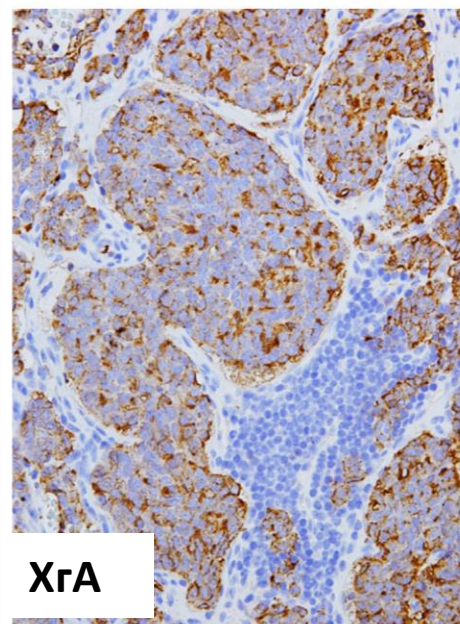
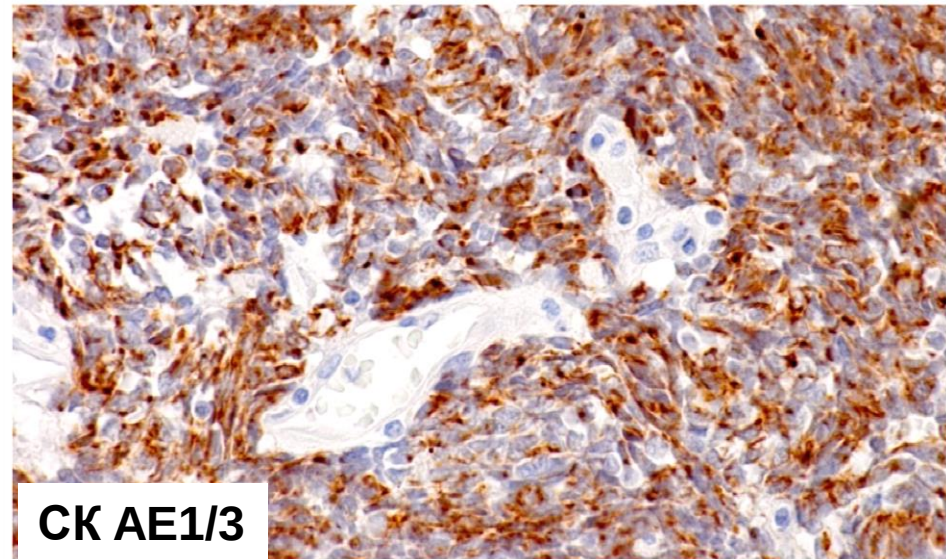
Эпителиальные маркеры

- Общие цитокератины (АЕ1/3)
- Низкомолекулярные цитокератины
- (САМ 5.2, СК8, СК18)

Нейроэндокринные маркеры

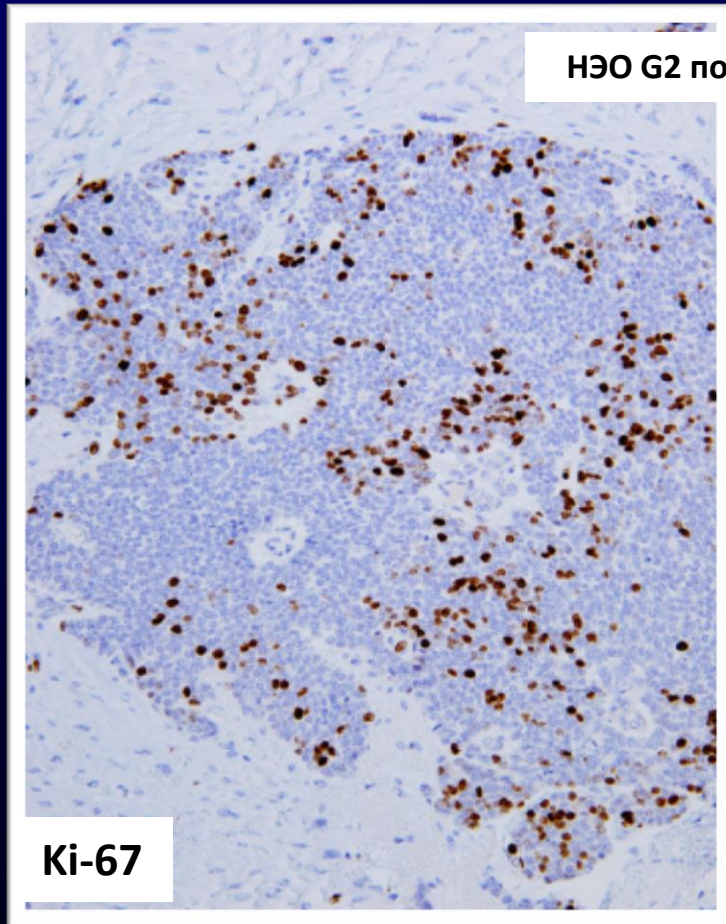
- CD 56 (NCAM)
- Синаптофизин
- Хромогранин А

В случаях низкодифференцированных НЭО необходимо определение эпителиальной и нейроэндокринной природы опухолевых клеток



Прогностические маркеры

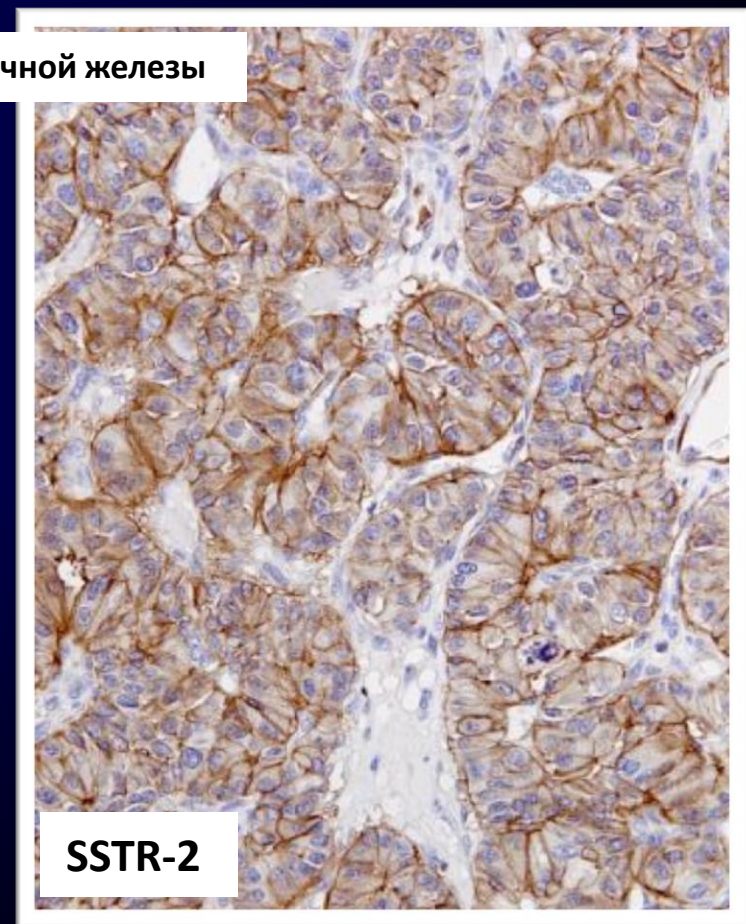
Индекс Ki-67
(% окрашенных ядер)



НЭО G2 поджелудочной железы

Предсказательные маркеры

Рецепторы соматостатина 2
типа (мембранное окрашивание)



ИГХ исследование имеет важное диагностическое значение, помогает определить прогноз течения НЭО (индекс пролиферации / Grade) и эффективность лечения заболевания (таргетная терапия / аналоги соматостатина).

Старая и новая классификации нейроэндокринных опухолей пищеварительной системы

WHO 2000	WHO 2010
Высокодифференцированная эндокринная опухоль а) доброкачественная б) с неопределенным потенциалом злокачественности	Нейроэндокринная опухоль Grade 1 (карциноид)
Высокодифференцированный эндокринный рак низкой степени злокачественности	Нейроэндокринная опухоль Grade 2
Низкодифференцированный эндокринный рак высокой степени злокачественности	Нейроэндокринный рак Grade 3 мелкоклеточный тип крупноклеточный тип

Классификация НЭО ЖКТ и ПЖ – WHO 2010

Grade	Морфология НЭО	Пролиферация
G1	Высокодифференцированная Опухоль - НЭО G1	Митотический Индекс < 2 и Индекс Ki67 ≤2%
G2	Высокодифференцированная Опухоль - НЭО G2	Митотический индекс 2-20 и/или Индекс Ki67 3-20%
G3	Низкодифференцированный Рак НЭР G3 • мелкоклеточный тип • крупноклеточный тип	Митотический индекс >20 и/или индекс Ki67 >20%

Гистологическая градация НЭО пищеварительной системы проводится на основе критериев классификации ВОЗ 2010 с учетом морфологии (дифференцировки) и пролиферирующей фракции

Система определения Grade (WHO/ENETS/AJCC)

Grade	Количество митозов х 10 HPF (2mm ²)	Индекс Ki-67 (%)
G 1	< 2	≤ 2
G 2	2-20	3-20
G 3	> 20	> 20

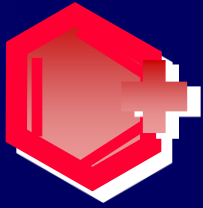
HPF – high power field, поле зрения при большом увеличении микроскопа (x400).

Степень злокачественности НЭО основана на оценке гистологии и определении пролиферирующей фракции и индексе Ki-67:

- 1) подсчет количества митозов в 50 полях зрения при HPF;
- 2) определение индекса Ki-67 (клон антител MIB-1) как процента окрашенных ядер при учете 2000 опухолевых клеток.

Степень злокачественности НЭО коррелирует с выживаемостью и является ключевым фактором в выборе био- и химиотерапии.

Введены **дополнительные критерии прогноза НЭО**: инвазия опухоли в кровеносные сосуды, инвазия опухоли в лимфатические сосуды, нейроинвазия, наличие участков некроза.



Старая и новая классификации НЭО пищеварительной системы

НЭО ЖКТ и поджелудочной железы различаются по функциональной активности и спектру продуцируемых гормонов

НЭО ЖКТ и поджелудочной железы могут быть проявлением наследственного синдрома МЭН-1

Функционирующие НЭО: инсулинома, гастринома, реже ВИП-ома, глюкагонома, соматостатинома, которые сопровождаются развитием гормонального синдрома, что облегчает их диагностику

Нефункционирующие НЭО: чаще выявляют на поздних стадиях при отсутствии клинических симптомов гормональной секреции эти опухоли демонстрируют ИГХ-позитивность к различным гормонам

Биохимические маркеры нейроэндокринных опухолей

Универсальные маркеры

Сыворотка или плазма крови:

Хромогранин А
(ХгА)

Панкреатический полипептид (ПП)

Нейрон-специфическая енолаза (НСЕ)

α -субъединица гликопротеиновых
гормонов

Специфические маркеры

Сыворотка или плазма крови

Серотонин (5-НТ)

Гастрин

Инсулин

С-пептид

Глюкагон

ВИП

Гистамин

Соматостатин

АКТГ

ПТГ

Кальцитонин

Катехоламины

Нейропептиды: ProGRP,
вещество Р, нейропептид К, Y

Суточная моча:

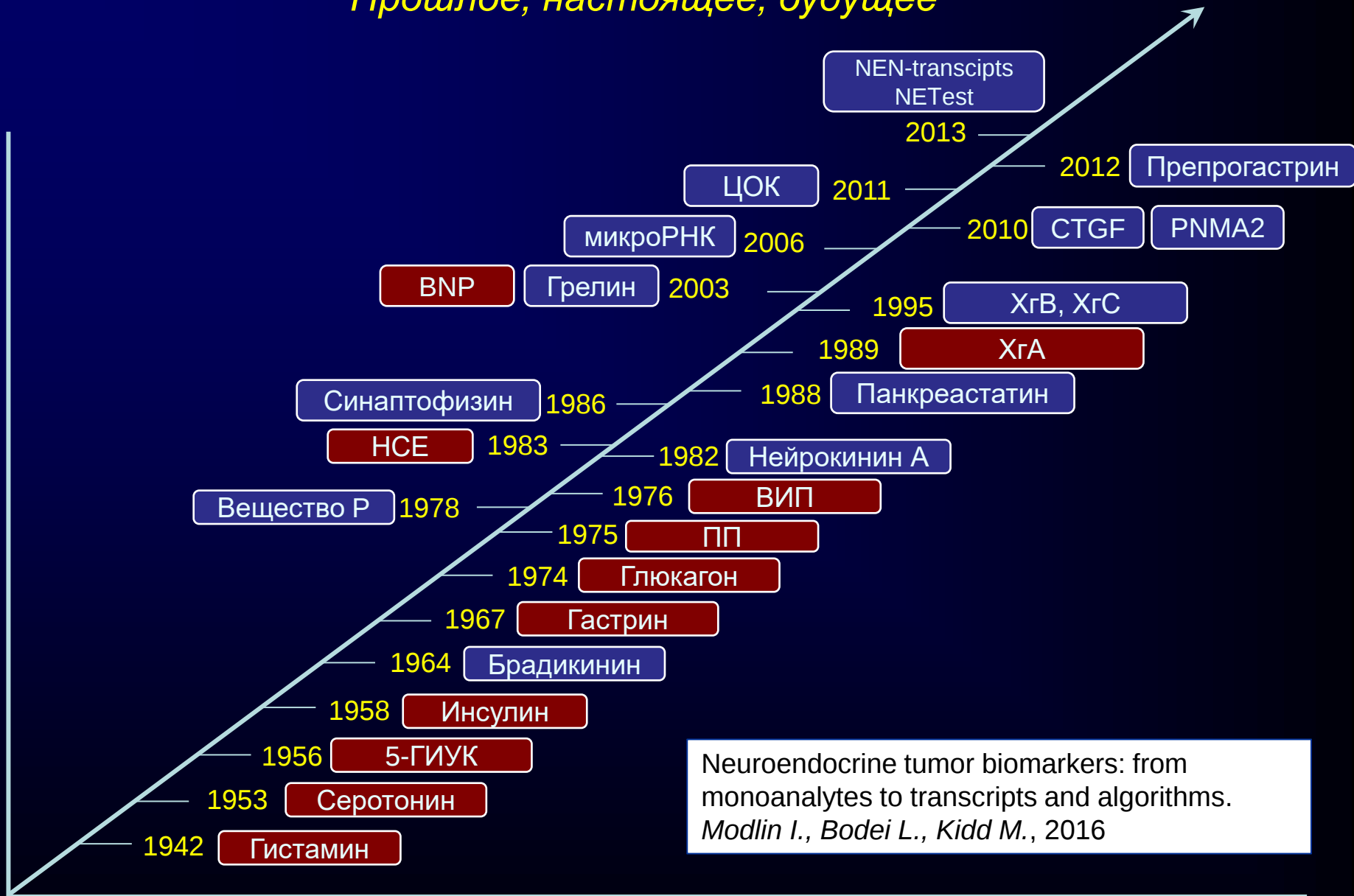
5-ГИУК

Серотонин

Метанефрины

История биомаркеров НЭО

Прошлое, настоящее, будущее



Neuroendocrine tumor biomarkers: from monoanalytes to transcripts and algorithms.
Modlin I., Bodei L., Kidd M., 2016

Эффективность циркулирующих маркеров НЭО с учетом чувствительности и специфичности



Ограничения и возможности клинического применения маркеров НЭО

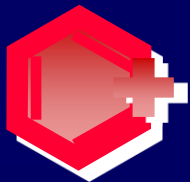
ХгА – маркер секреторной функции НЭО, менее информативный как маркер пролиферативной активности, распространенности и эффективности терапии

Гастрин, инсулин, глюкагон, ВИП, 5-ГИУК имеют диагностическое значение для специфических типов НЭО

Микро-РНК при НЭО в настоящее время не имеет практического значения в связи с проблемами стандартизации, воспроизводимости, сложностью и высокой стоимостью ПЦР-методологии. Требуется существенное усовершенствование технологии для повышения чувствительности и специфичности в диагностике НЭО.

Алгоритмический анализ множественных транскриптов при НЭО может стать эффективным диагностическим инструментом, отражающим статус заболевания, прогрессирование опухоли и эффект терапии. Метод находится в стадии накопления данных и требует создание комплексной узко-специализированной лабораторной базы

MicroRNAs as potential biomarkers: Is the future here? – Verena Gounden, Zhen Zhao, 2013 (NIH&AACCC)
Consensus on biomarkers for neuroendocrine tumour disease. *Oberg K., Modlin I., de Herder W.* (2015)



Диагностический алгоритм при НЭО



Рекомендации по стандартизации биохимического обследования больных НЭО:

Расширение спектра исследуемых маркеров в соответствии с типом опухоли и клинической картиной



Гормонпродуцирующие опухоли желудочно-кишечного тракта и рекомендуемые биохимические маркеры

Тип опухоли (синдром)	Основные клинические признаки соответствующего синдрома	Основные лабораторные исследования
Карциноид (карциноидный синдром)	Сосудистые реакции, диарея, бронхиальная обструкция, гипертонические кризы	ХгА, серотонин, экскреция 5-ГИУК, гистамин, ВИП, ПП
Инсулинома	Частые приступы гипогликемии натощак и в утренние часы, купируемые приемом сахара или введением глюкозы	Инсулин, С-пептид, проинсулин, глюкагон, ПП; уровень гликемии
Гастронома (синдром Золлингера- Эллиссона)	Язвенная болезнь агрессивного течения (характерны высокая кислотность сока, множественность и "низкое" расположение язв), диарея, стеаторея	ХгА, базальный и стимулированный уровень гастрина, инсулина, глюкагон, ПП; базальная и стимулированная кислотность желудочного сока
ВИПома (синдром Вернера- Моррисона)	Интермиттирующая или постоянная водная диарея с большим объемом каловых масс, гипокалиемия, гипоахлоргидрия, похудание	ХгА, ВИП, глюкагон, соматостатин, ПП, желудочная кислотность; объем стула; электролиты сыворотки крови
Глюкагонома	Некротическая мигрирующая эритема, сахарный диабет или нарушение толерантности к глюкозе, поражения слизистых, похудание, анемия, аминоацидемия	ХгА, глюкагон, ПП, инсулин; гематологические исследования
Соматостатинома	Холелитиаз, сахарный диабет или нарушение толерантности к глюкозе, диспепсия, ахлоргидрия, анемия, диарея/стеаторея	ХгА, соматостатин, ПП; желудочная кислотность; гематологические исследования

История изучения Хромогранина А

Hypertension. 1984 Jan-Feb;6(1):2-12.

Human chromogranin A. Purification and characterization from catecholamine storage vesicles of human pheochromocytoma.

O'Connor DT, Frigon RP, Sokoloff RL.

N Engl J Med. 1986 May 1;314(18):1145-51.

Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms.

O'Connor DT, Deftos LJ.



**Daniel T. O'Connor
(1948-2014)**



Leonard J. Deftos

J Clin Endocrinol Metab. 1989 May;68(5):869-72.

Human pituitary tumors secrete chromogranin-A.

Deftos LJ¹, O'Connor DT, Wilson CB, Fitzgerald PA.

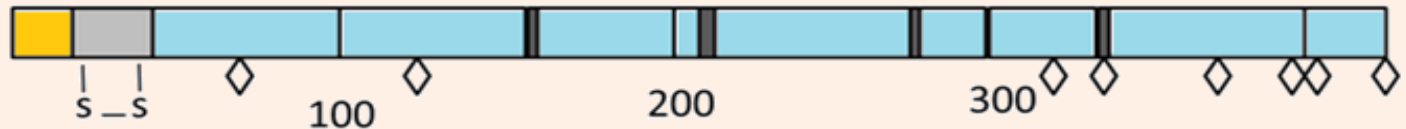
N Engl J Med. 1989 Feb 16;320(7):444-7.

Hormone-negative, chromogranin A-positive endocrine tumors.

Sobel RE¹, Memoli V, Deftos LJ.

Структура хромогранина А и его производных

Хромоградин А



Функционально-активный пептид

ХгА 1-40



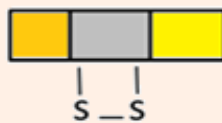
Хромацин 176-197



Катестатин 352-372



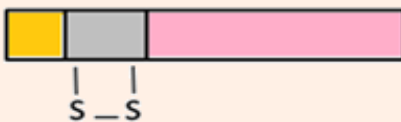
Вазостатин I (1-76)



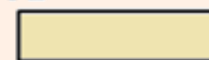
Прохромацин 79-439



Вазостатин II (1-115)



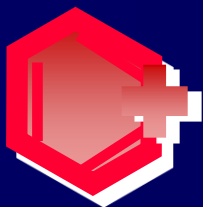
Панкреастатин
250-301



Парастатин
357-428



Хг-А - кислый растворимый белок, состоящий из 439 аминокислотных остатков, ММ – 49 кДа, один из 8 представителей семейства гранинов, ассоциируемых с процессом образования, созревания и экзоцитоза секреторных гранул



Биологические функции представителей семейства гранинов



Причины повышения хромогранина А

Онкологические заболевания

Нейроэндокринные опухоли

ГЭП-НЭО:

- Желудка
- Кишечника
- Поджелудочной железы

Другие НЭО:

- Опухоли гипофиза
- Медуллярный рак щитовидной железы
- Мелкоклеточный рак легких (МРЛ)
- Парагангиома
- Нейробластома
- Феохромоцитома

Другие типы опухолей

- Рак молочной железы
- Гепатоцеллюлярный рак
- Рак поджелудочной железы
- Рак прямой кишки
- Рак яичников
- Рак предстательной железы

Неопухолевые заболевания

Воспалительные заболевания

- Системные воспалительные заболевания
- Гигантоклеточный артрит
- Хронический бронхит
- Хронические обструктивные заболевания легких

Гастроинтестинальные нарушения

- Хронический атрофический гастрит
- Панкреатит
- Воспалительные заболевания кишечника
- Синдром раздраженного кишечника
- Цирроз печени
- Хронический гепатит

Сердечно-сосудистые заболевания

- Артериальная гипертензия
- Сердечная недостаточность
- Острый коронарный синдром

Эндокринные заболевания

- Гиперпаратиреоз
- Гипертиреоз

Почечные заболевания

- Почечная недостаточность

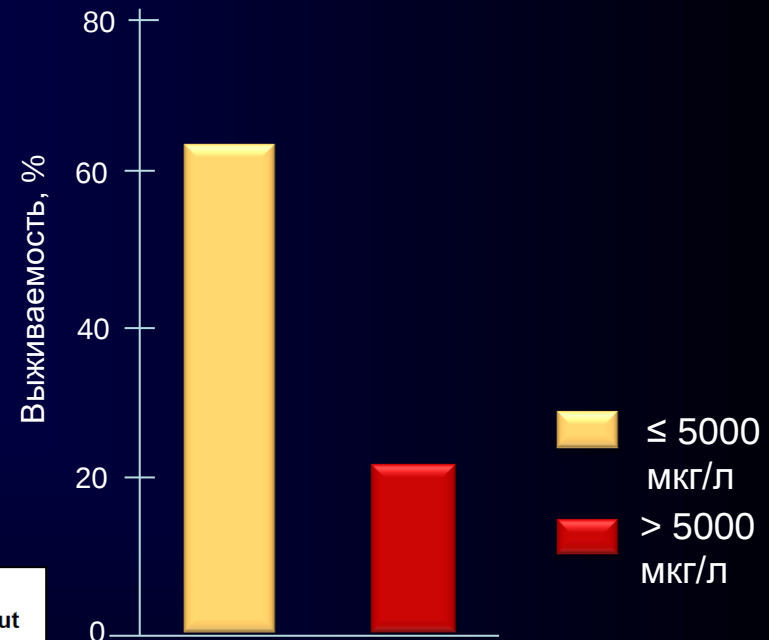
Действие лекарственных препаратов

- Ингибиторы протонной помпы
- Антагонисты рецептора гистамина
- Кортикостероиды

ХгА в мониторинге и прогнозе НЭО

- ХгА отражает распространенность опухолевого процесса ¹
- Повышение уровня ХгА указывает на прогрессирование заболевания: первый признак рецидива после операции у 67% пациентов при отсутствии изменений при КТ и экскреции 5-ГИУК ²
- Снижение уровня свидетельствует об эффективности лечения ³
- Независимый прогностический фактор выживаемости ^{4,5}

5-летняя выживаемость с учетом концентрации ХгА при первичном обследовании больных НЭО [4,5]



Neuroendocrinology. 2009;89(3):302-7. doi: 10.1159/000179900. Epub 2009 Jan 29.

Elevated plasma chromogranin A is the first indication of recurrence in radically operated midgut carcinoid tumors.

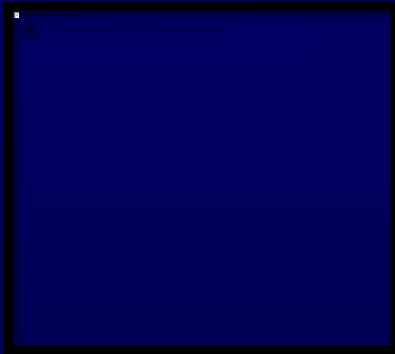
Welin S¹, Stridsberg M, Cunningham J, Granberg D, Skogseid B, Öberg K, Eriksson B, Janson ET.

Endocr Relat Cancer. 2003 Dec;10(4):459-62.

The importance of the measurement of circulating markers in patients with neuroendocrine tumours of the pancreas and gut.

Ardill JE¹, Eriksson B.

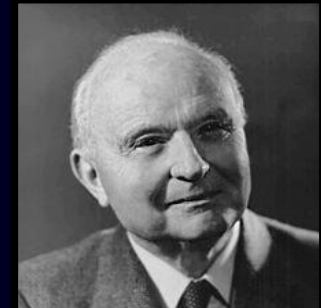
История изучения серотонина



Maurice M. Rapport
(1919–2011)

1948 г. – Rapport описал и выделил и описал серотонин как вещество со свойствами вазоконстриктора в сыворотке быка.

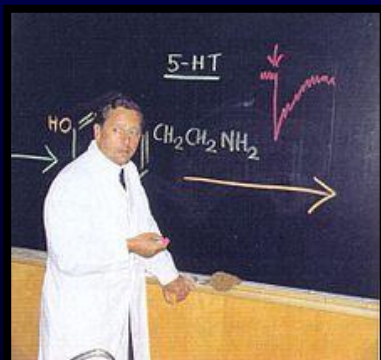
1952 г. – Esparmer и Asero выделили 5-гидрокситриптамиин из энтерохромафинных тканей осьминогов и лягушек (*discoglossus*) и предположили, что серотонин («энтерамина») выступает специфическим гормоном энтерохромаффинной системы



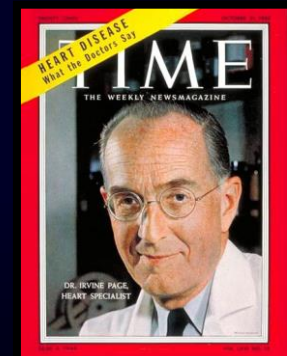
Vittorio Ersparmer
(1909–1999)

1953 г. – Lembeck биохимически подтвердил наличие серотонина в карциноидной опухоли подвздошной кишки

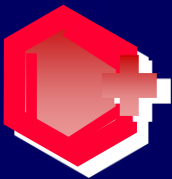
1954 г. – Page основываясь на наблюдениях повышенного выделения с мочой 5-ГИУК, продемонстрировал возможность использования уровня серотонина в плазме крови в качестве маркера карциноидного синдрома



Fred Lembeck
(1922-2014)



Irvine Heinly Page
(1901-1991)



Серотонин

Синтез серотонина

ЭХ клетки ЖКТ

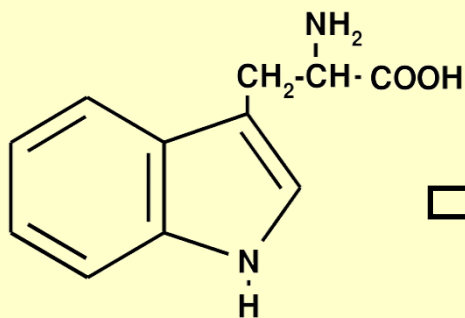
90%

Тучные клетки

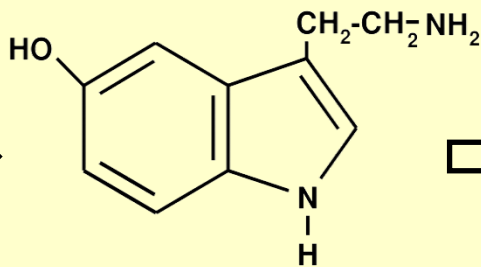
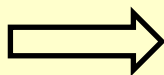
5%

5-ГТ-нейроны

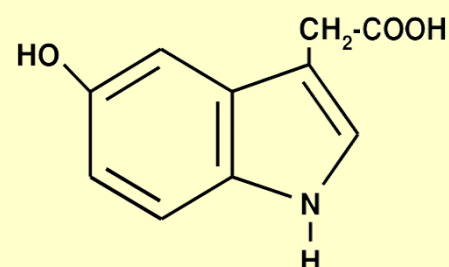
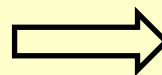
5%



Триптофан



5-гидроокситриптамин
(серотонин)



5-гидрокси-3-индолилуксусная кислота
(5-ГИУК)

Рецепторы серотонина

5-ГТ1

Подтипы A, B, D, E, F

5-ГТ2

A, B, C

5-ГТ3 – 5-ГТ7

История изучения гастрина



Robert M. Zollinger
(1903–1992)



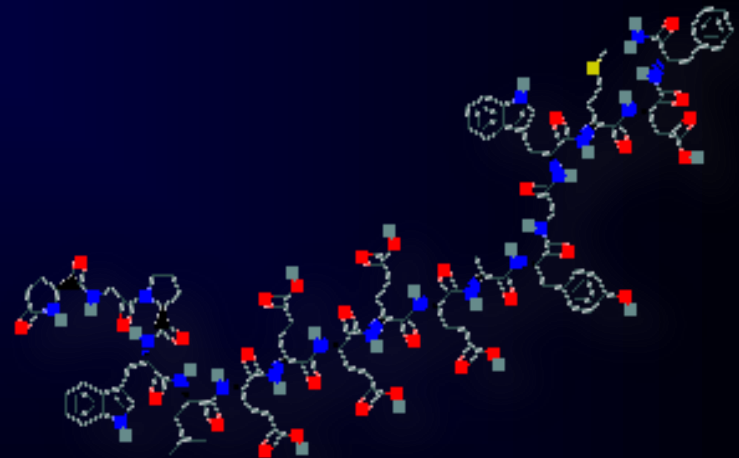
Edwin H. Ellison
(1918–1970)

В 1955 г. Золлингер и Эллисон на основании клинических наблюдений выдвинули предположение о существовании «ульцерогенного гуморального фактора» ассоциированного островковыми клетками поджелудочной железы.

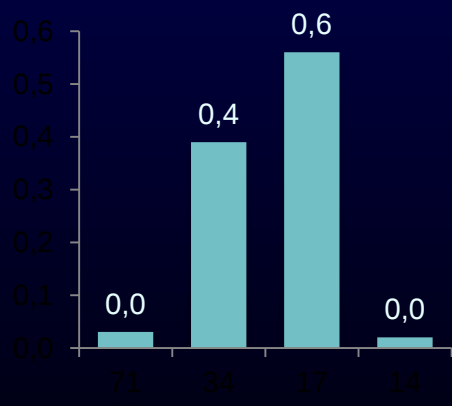
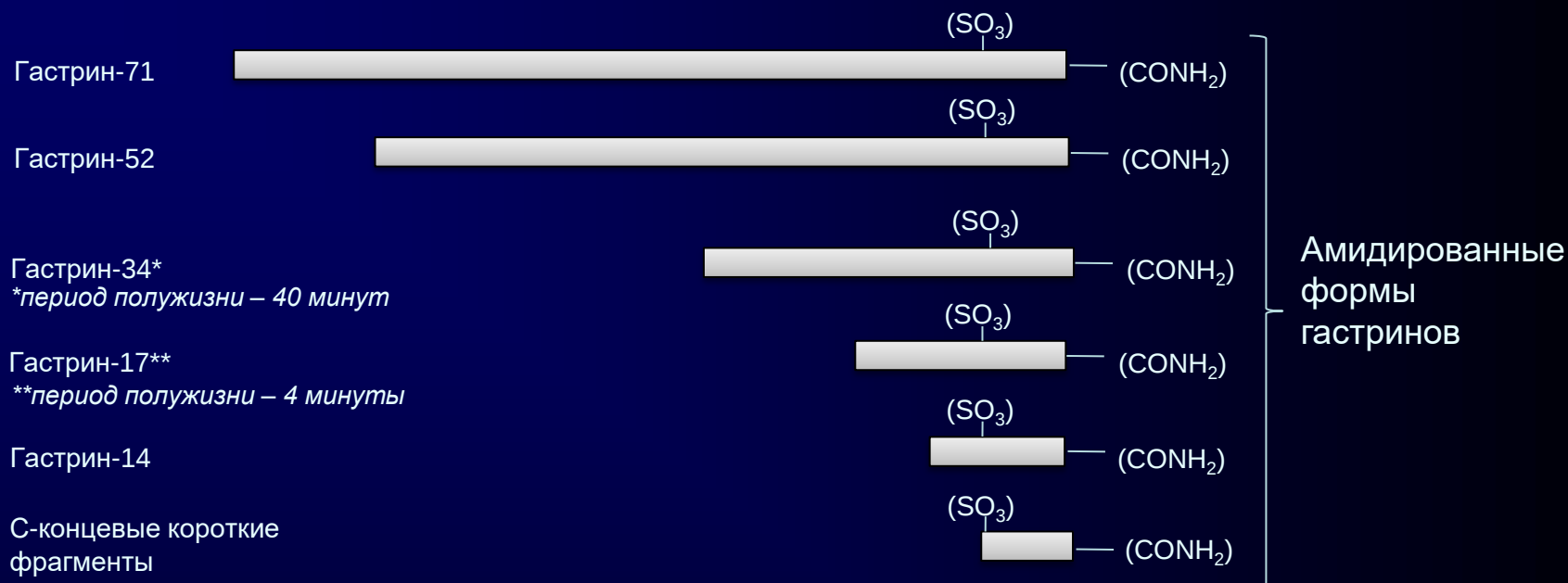


Roderic Gregory
(1913-1990)

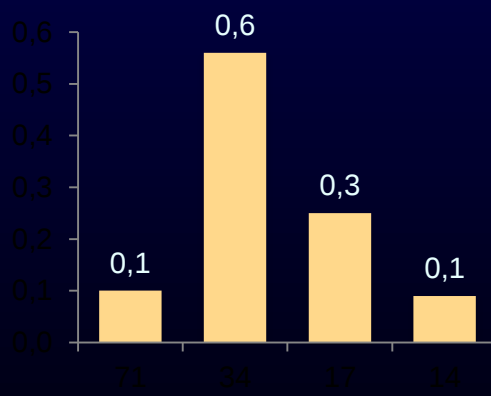
В 1960 г. Gregory и Tracy удалось изолировать гастрин и экстрагировать «напоминающее гастрин» вещество из панкреатической опухоли с синдромом Золлингера-Эллисона



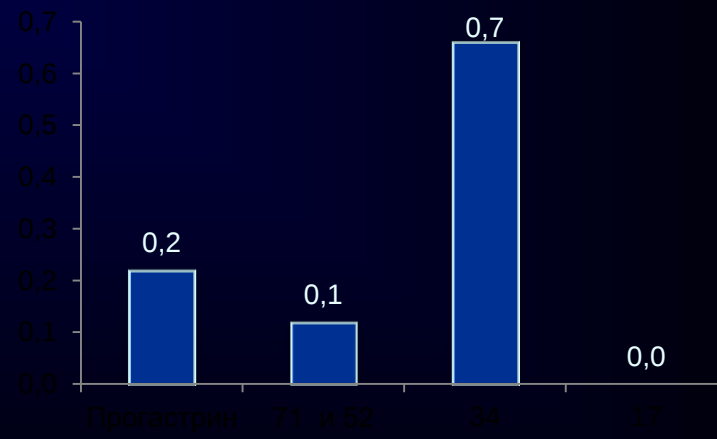
Молекулярные особенности циркулирующих гастрinov



Распределение гастрина в крови в норме



Распределение гастрина в крови при гастриноме



Распределение гастрина в крови при гастриноме (гастрин-17-негативная)

Патофизиологические причины гипергастринемии

Клинические состояния	Гастрин
Синдром Золлингера-Эллисона	↑-↑↑↑
Атрофический гастрит	↑↑↑
Ваготомия	↑-↑↑
Состояние после резекции желудка по Бильрот 2	↑↑↑
Ингибиторы протонной помпы	↑-↑↑
Почечная недостаточность	↑
Синдром короткой кишки	↑
Инфекция H.pylori	↑-↑↑

Аналитические проблемы определения гастрина

Молекулярная природа циркулирующего гастрина

Молекулярная гетерогенность и проблема иммунохимической специфичности различных методов определения

Изменение соотношения циркулирующих форм гастрина при различных типах гипергастринемии

Неадекватные условия для определения гастрина на основе тест-систем различных производителей

Дифференциальный диагноз при гипергастринемии

Критерий	Гастронома (синдром Золлингера-Эллисона)	Атрофический гастрит и другие состояния
Клетки, продуцирующие гастрин	Клетки гастриномы	G-клетки
Формы гастрина	Гастрин-34, в меньшей степени гастрин 17, 71	Гастрин-17, малое количество других форм
Уровень секреции соляной кислоты	Повышенный	Пониженный
Провокационные пробы с в/в секретинном или кальцием	Повышение уровня гастрина на фоне пробы более чем на 100-200 пг/мл	Уровень гастрина не изменяется или снижается



Биохимический диагноз синдрома Золлингера-Эллисона:

Базальный уровень гастрина (не менее 12 ч. голодания) – более 1000 пг/мл при pH желудочного сока < 2.0.

При умеренной (100-1000 пг/мл) гипергастринемии для дифференциальной диагностики при указанных состояниях назначается секретинный тест. Повышение гастрина на фоне введения секретина более чем на 100-200 пг/мл по отношению к базальному уровню имеет диагностическое значение.

Сравнительная характеристика различных методов определения гастрина

Метод	Производитель	Специфичность к формам гастрина*	Референсный лимит	Диагностическая эффективность
РИА	DiaSorin	Гастрин-17 (нс) Гастрин-17 (с) Гастрин-34 (нс)	< 108 пг/мл	60%
	DRG Diagnostics	Гастрин-17 (нс) Гастрин-17 (с) Гастрин-34 (нс)	< 111 пг/мл	90%
	Euro-Diagnostica	Гастрин-17 (нс) Гастрин-17 (с) Гастрин-34 (нс)	< 128 пг/мл	98%
	MP Biomed	Гастрин-17 (нс) Гастрин-17 (с) Гастрин-34 (нс)	< 111 пг/мл	95%
	Siemens RIA	Гастрин-17 (нс) Гастрин-17 (с) Гастрин-34 (нс)	< 90 пг/мл	95%
ИФА	Biohit	Гастрин-17 (нс)		60%
	Phoenix EIA	Гастрин-17 (нс) Гастрин-34 (нс)		75%
Иммунохеми- люминесцентный	Siemens Immulite 2000	Гастрин-17 (нс) Гастрин-17 (с) Гастрин-34 (нс) Гастрин-34 (с)	< 115 пг/мл	90%

нс – несультатированная форма, с – сультатированная форма

Рекомендации по обследованию пациентов с НЭО желудка:

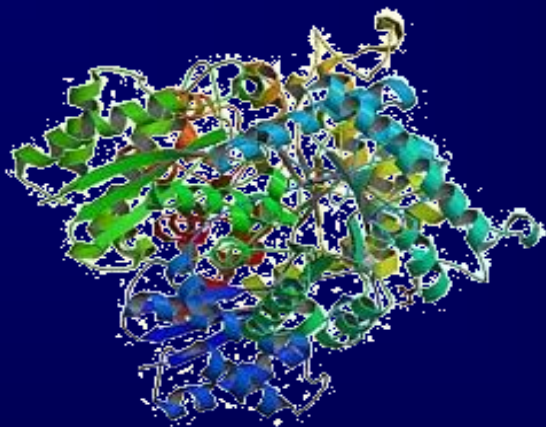
- Определение уровня ХгА в сыворотке крови при всех типах НЭО желудка
- Определение базального уровня гастрина в сыворотке крови (голодание более 12 ч.)
- Определение кислотности желудочного сока (рН-мониторинг)
- Секретиновая проба для дифференциальной диагностики умеренной гипергастринемии (100-1000 пг/мл).
- Дополнительные маркеры при карциноидах:
панкреатический полипептид, гистамин, серотонин

Исследование биохимических маркеров проводится до выполнения любых диагностических мероприятий и специфической терапии, со строгим соблюдением необходимых преаналитических факторов, включая 12-часовое голодание.

Определение биохимических маркеров необходимо проводить после отмены ингибиторов протонной помпы (7-14 дней), антагонистов гистаминовых рецепторов 2 типа (1-2 дня).

*Oberg K., 2011; Vinik A.I. et al., 2009; Arnold R. et al., 2007; Rehfeld J.F., 2008; Campana D. et al., 2007; Peracchi M., et al, 2005.

Нейрон-специфическая енолаза (NSE)



НСЕ - нейронспецифический изофермент цитоплазматического гликолитического фермента енолазы, по молекулярной структуре представляющий собой димер из полипептидов γ -типа с молекулярной массой 80 кДа

1975 г. – НСЕ впервые выделена из экстрактов ткани мозга крысы (Vosk)

1978 г. – НСЕ обнаружена в нейроэндокринных клетках центральной и периферической нервной системы (Schmechel)

1981 г. - НСЕ впервые была охарактеризована как тканевой маркер НЭО, что сделало ее родоначальником опухолевых маркеров МРЛ (Tarria, Bloom, Polak)

1985 - показана возможность использования NSE как сывороточного маркера МРЛ (Akoun)

Диагностическое значение НСЕ:

- Наиболее часто НСЕ повышается у больных МРЛ, медуллярным раком щитовидной железы, феохромоцитомой, а также у 30-60% больных с другими видами НЭО
- Несмотря на высокую чувствительность НСЕ как маркера нейроэндокринной дифференцировки, практическое применение маркера ограничивается его низкой (33%) специфичностью
- Повышение уровня НСЕ не дает специфической картины, чаще всего указывает на наличие низкодифференцированной опухоли
- Чувствительность НСЕ (пороговый уровень 12,5 нг/мл), как маркера МРЛ:
 - 79-89% при распространенных формах МРЛ
 - 38-76% локализованные формы МРЛ
- Диагностическая специфичность НСЕ ниже, чем у ХгА, в то же время чувствительность комбинации ХгА и НСЕ выше, чем у каждого из них в отдельности

Панкреатический полипептид

1968 г. – ПП впервые выделен Kimmel и Pollock.

1974 г. – Chance и Jones идентифицировали человеческий ПП

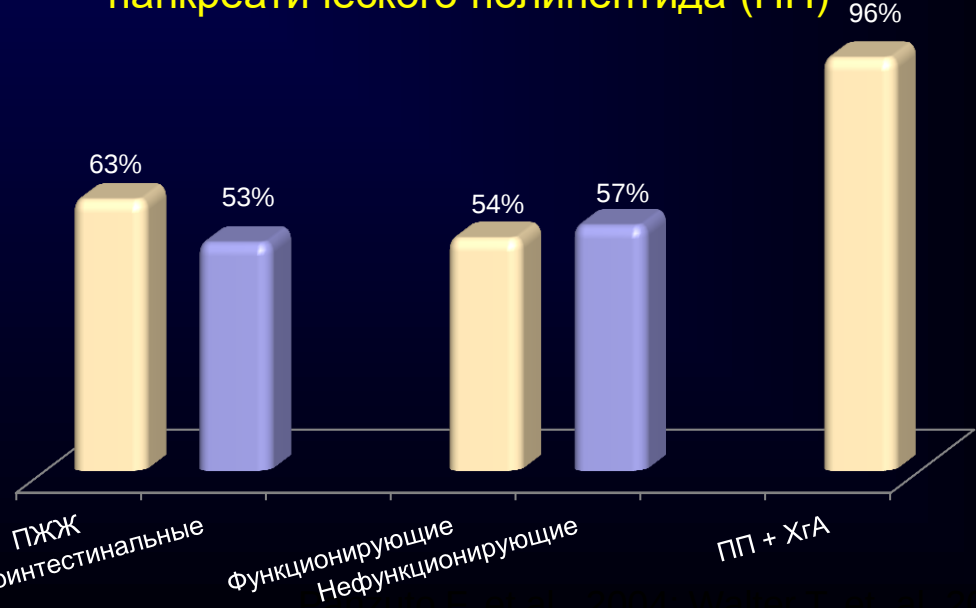
1975 г. – Kimmel и Pollock охарактеризовали ПП как панкреатический полипептидный гормон.

1983 – O'Hare разработана тест-система

1986 – Adrian и Bloom предложили ПП использовать как маркер НЭО ПЖ

- Продуцируется ПП-клетками поджелудочной железы
- Физиологические функции: антагонист холецистокинина, подавляет секрецию поджелудочной железы и стимулирует секрецию желудочного сока.
- В норме < 800 пг/мл
- > 1000 пг/мл – биохимический признак НЭО

Диагностическая чувствительность панкреатического полипептида (ПП)



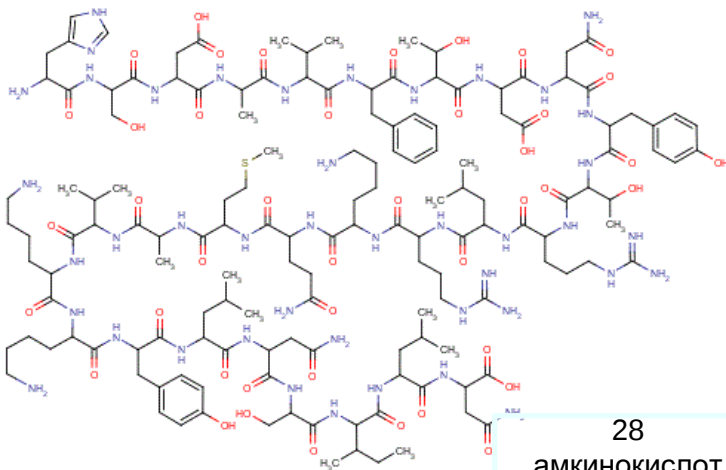
Вазоактивный интестинальный пептид (ВИП)

1958г. – Verner и Morrison описали двух пациентов с синдромом водянистой диареи, гипокалиемии и ахлоргидрии – синдром Вернера-Моррисона. (несмотря на то, что в 1957 г. Priest и Alexander описали аналогичное состояние).

1970г. – Said и Mutt выделили ВИП (вазокативный интестинальный пептид).

1973г. – Bloom и Polak показали ассоциацию между синдромом Вернера-Моррисона и повышенным содержанием ВИП в опухоли и усилением его секреции в кровь.

- Физиологические функции: нейромедиатор, паракринный регулятор клеток ЖКТ.
- Время полужизни пептида в кровотоке составляет 1 минуту, что может приводить к высокой вариабельности его как маркера
- В норме < 200-300 пг/мл
- Усиление секреции ВИП – при воспалительных заболеваниях кишечника (энтериты, целиакция, мальабсорбция глюкозы, после резекции)
- При рефрактерной диарее и/или наличии признаков новообразования в поджелудочной железе, уровни ВИП более 200-300 пг/мл при серийном наблюдении подтверждают диагноз ВИПомы.
- **> 800 пг/мл – биохимический признак ВИПомы (функционирующие НЭО из островков поджелудочной железы)**



Соматостатин

1973г. – Brazeau
идентифицирован полипептид,
ингибирующий гипофизарный
гормон роста

1977г. – Ganda сообщил о
пациентах с нормальными
уровнями инсулина и глюкагона,
несмотря на гипергликемию. Для
данной опухоли было характерно
повышенное содержание
соматостатин – соматостатинома

1991г. – Eriksson и Oberg
рекомендовали соматостатин как
маркер карциноидов и НЭО ЖКТ

- Продуцируется D-клетками поджелудочной железы и гипоталамусом
- Формы:
 - S14 – нервная ткань, ПЖ, 12-перстная кишка
 - S28 – желудок, подвздошная кишка
- Физиологические функции: подавляет секрецию соматотропин-рилизинг-гормона, соматотропного гормона и тиреотропного гормона, серотонина, инсулина, глюкагона, гастрина, холецистокинина, ВИП, ИФР-1
- В норме < 300 пг/мл
- Усиление секреции соматостатина – при инсулинзависимом типе сахарного диабета
- **> 800-1000 пг/мл – биохимический признак соматостатиномы**

S14 + S28

амкинокислот.



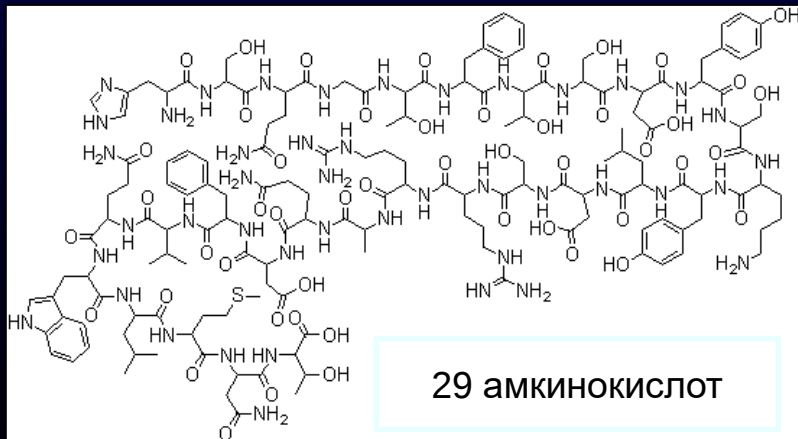
Глюкагон

1929 – Collins и Muir изолировали глюкагон

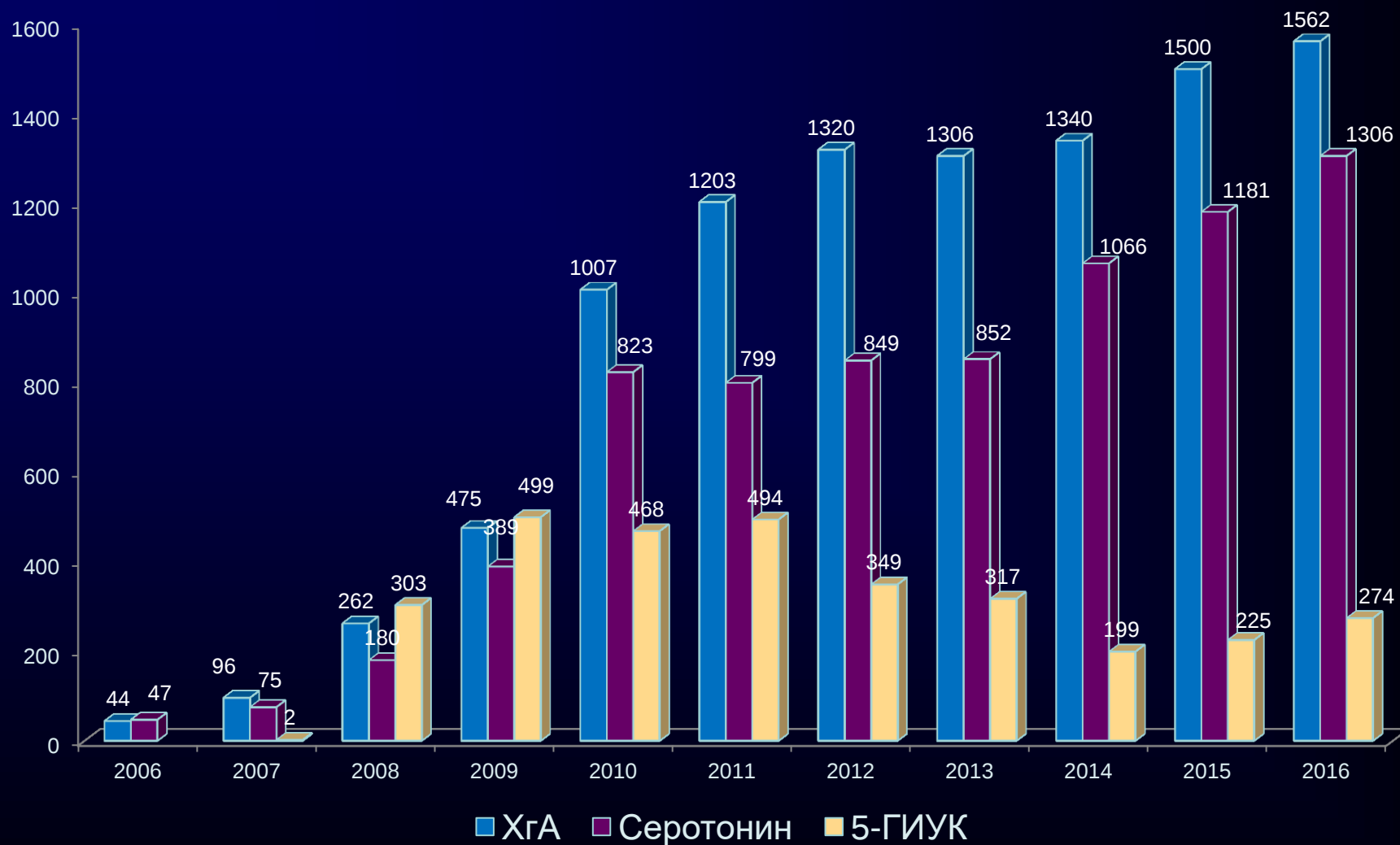
1942г. – Becker описал больного с необычной сыпью, диабетом, анемией, потерей в весе при наличии эндокринной опухоли поджелудочной железы

1966г. – McGavran сообщил о сходной клинической ситуации при которой наблюдалось повышение глюкагона, который стал использоваться для подтверждения глюкагономы

- Синтезируется альфа-клетками островков Лангенгарса поджелудочной железы и L-клетками слизистой кишечника
- Физиологические функции: регулятор гликемии, липолитическое действие, снижает липогенез и синтез белка
- В норме < 200 пг/мл
- Усиление секреции ВИП до 500 пг/мл – при диабетическом кетоацидозе, почечной и печеночной недостаточности, голодании, циррозе, синдроме Кушинга
- **> 1000 пг/мл – биохимический признак глюкагономы**



Количество анализов основных маркеров НЭО, выполненных в лаборатории клинической биохимии при обследовании пациентов РОНЦ и других медицинских учреждений



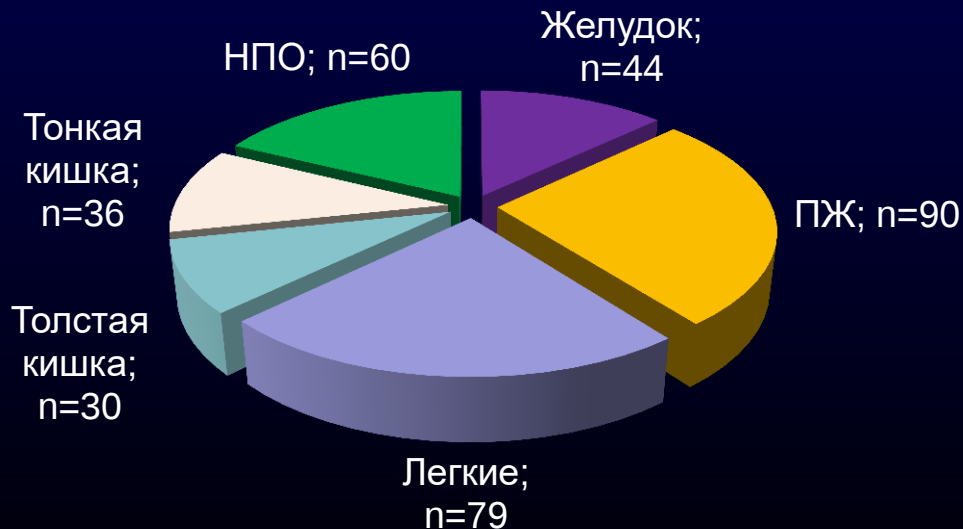
Биохимические маркеры НЭО, исследуемые в лаборатории клинической биохимии ФГБУ «НМИЦ онкологии им Н.Н. Блохина» МЗ РФ

Маркер	Метод, тест-система	Исследуемый биоматериал	Референсные уровни
Универсальные маркеры			
Хромогранин А	ИФА плащечный (Dako)	Плазма крови	<18 Ед/л
	ИФА плащечный (Eurodiagnostica)	Сыворотка крови	< 108 нг/мл
НСЕ	Электрохемилюминесцентный анализ (Cobas)	Сыворотка крови	<12,5 нг/мл
Панкреатический полипептид	ИФА плащечный (Peninsula Laboratories)	Плазма крови с ингибитором протеаз	<800 пг/мл
Специфические маркеры			
Серотонин	ИФА плащечный (IBL)	Сыворотка крови	30-200 нг/мл
5-ГИУК	ИФА плащечный (IBL)	Суточная моча с консервантом	<53 мкмоль/сут
Гистамин	ИФА плащечный (IBL)	Плазма крови	<1,0 нг/мл
Гастрин	Иммунохемилюминесцентный анализ (Immulite)	Сыворотка крови	13,0-115,0 пг/мл
Инсулин	Иммунохемилюминесцентный анализ (Immulite)	Сыворотка крови	<30 мкМЕ/мл
С-пептид	Иммунохемилюминесцентный анализ (Immulite)	Сыворотка крови	1,0-4,5 нг/мл
Глюкагон	ИФА плащечный (BioVendor)	Плазма крови с ингибитором протеаз	<400 пг/мл
Соматостатин	ИФА плащечный (Peninsula Laboratories; USCN Life Science)	Плазма крови с ингибитором протеаз	<300 пг/мл
ВИП	ИФА плащечный (Peninsula Laboratories; USCN Life Science)	Плазма крови с ингибитором протеаз	<280 пг/мл
Кальцитонин	Иммунохемилюминесцентный анализ (Immulite)	Сыворотка крови	<20 пг/мл
АКТГ	Иммунохемилюминесцентный анализ (Immulite)	Плазма крови	1,5-14 пкмоль/л
Кортизол	Иммунохемилюминесцентный анализ (Immulite)	Сыворотка крови	138-690 нмоль/л
Паратиреоидный гормон	Электрохемилюминесцентный анализ (Cobas)	Сыворотка крови	15-65 пкг/мл
Синаптофизин	ИФА плащечный (USCN Life Science)	Сыворотка крови	<0,12 нг/мл
Мозговой натрийуретический пропептид	Иммунохемилюминесцентный анализ (Immulite)	Сыворотка крови	<170 пг/мл

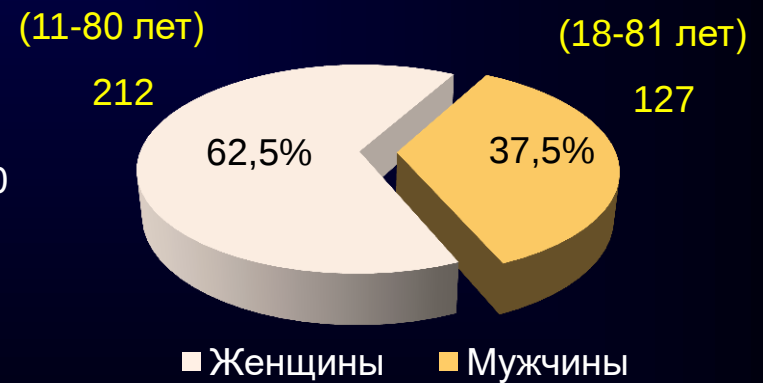
Характеристика больных НЭО



Распределение по локализациям



Распределение по полу



Уровни маркеров у больных НЭО различных локализаций

Группа	ХгА (Ед/л)	Серотонин (нг/мл)	5-ГИУК (мкмоль/сут)
Общая группа НЭО	118* (7,0-102000)	342* (30,3-6482)	98,0* (9,0-2063)
НЭО желудка	58,4* (7,3-102000)	213 (51,2-3183)	35,0 (25,0-172)
НЭО поджелудочной железы	114* (14,0-5828)	283* (40,2-5162)	45,5* (9,0-2063)
НЭО тонкой кишки	169* (14,2-1848)	1648* (77,4-3970)	332* (25,0-870)
НЭО толстой кишки	123* (7,0-1931)	1447* (30,3-2891)	320* (36,0-920)
НЭО легких	97,8* (8,8-29603)	267* (43,9-2177)	42,0 (31,0-1150,0)
МТС НЭО из НПО	494* (8,7-5290)	1098* (40,8-6482)	221* (15,0-658)
Контрольная группа	15,3 (2,8-47,2)	169 (36-480)	30,0 (15,3-61,1)

* - различия с контролем достоверны ($p < 0,05$). Результаты представлены в виде медиан и интервалов.

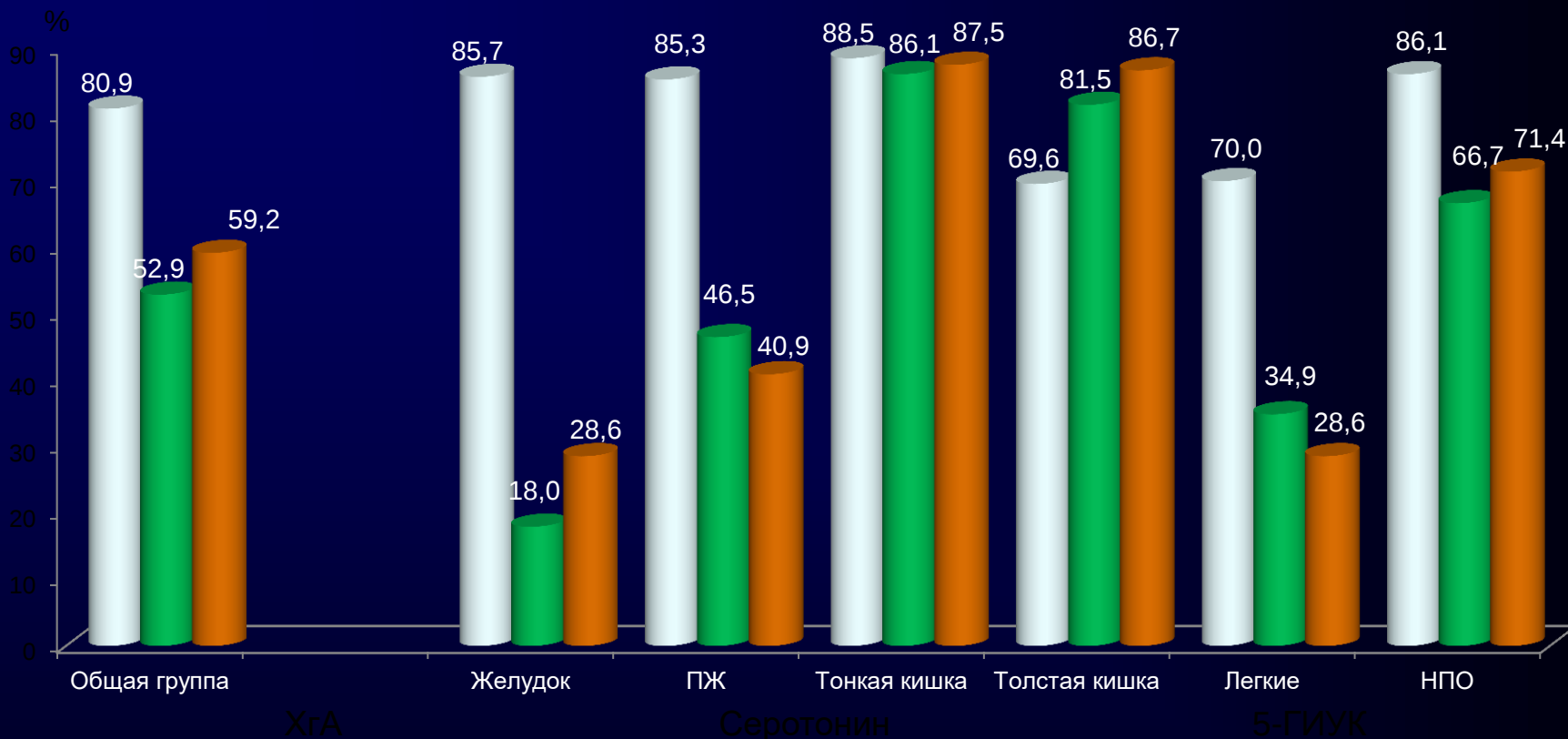
Зависимость уровней маркеров от клинических характеристик НЭО

Больные НЭО	ХгА (Ед/л)	Серотонин (нг/мл)	5-ГИУК (мкмоль/сут)
Без метастазов в печени	42,8* (7,7-487)	229* (51,2-2619)	35,0 (9,0-611)
С поражением печени	345* (7,3-102000)	714* (30,3-6482)	199,0* (15,0-2063)
Без карциноидного синдрома	62,1* (7,3-29603)	228* (30,3-3519)	45,5 (15,0-2063)
С карциноидным синдромом	315* (5,2-102000)	1209* (77,4-6482)	190* (9,0-920)

Степень гиперсекреции	ХгА	Серотонин	5-ГИУК
МТС+/МТС-	8	3	5
КС+/КС-	5	5	4

* - различия с контролем достоверны ($p < 0,05$)

Сравнение диагностической чувствительности ХгА, серотонина и 5-ГИУК при НЭО различных локализаций



Пороговый уровень: 33 Ед/л

Чувствительность: 69,6-88,5%

Специфичность: 98,5 %

Пороговый уровень: 320 нг/мл

Чувствительность: 18,0-86,1%

Специфичность: 94,5 %

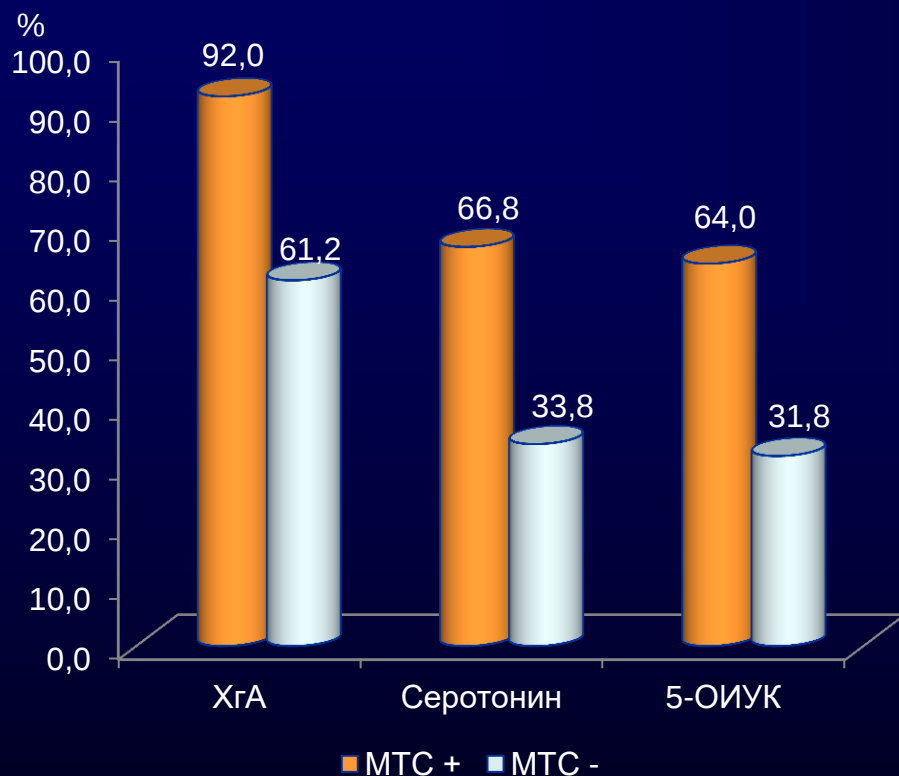
Пороговый уровень: 60 мкмоль/сут

Чувствительность: 28,6-87,5%

Специфичность: 94 %

Диагностическая чувствительность маркеров в зависимости от клинических характеристик НЭО

Метастазы в печени



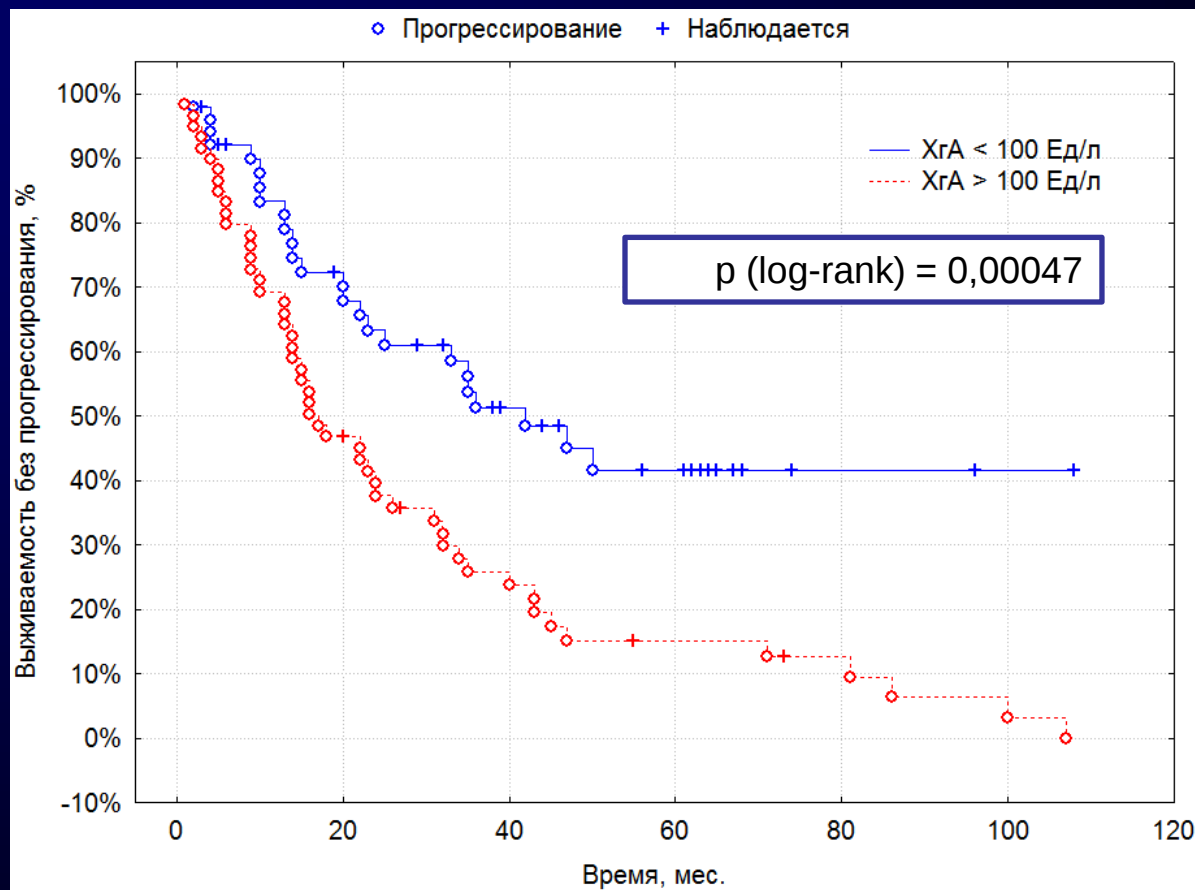
Карциноидный синдром



Серотонин и его метаболит 5-ОИУК (5-ГИУК) - маркеры, ассоциированные с карциноидным синдромом, реализующимся, как правило, на фоне метастатического поражения печени.

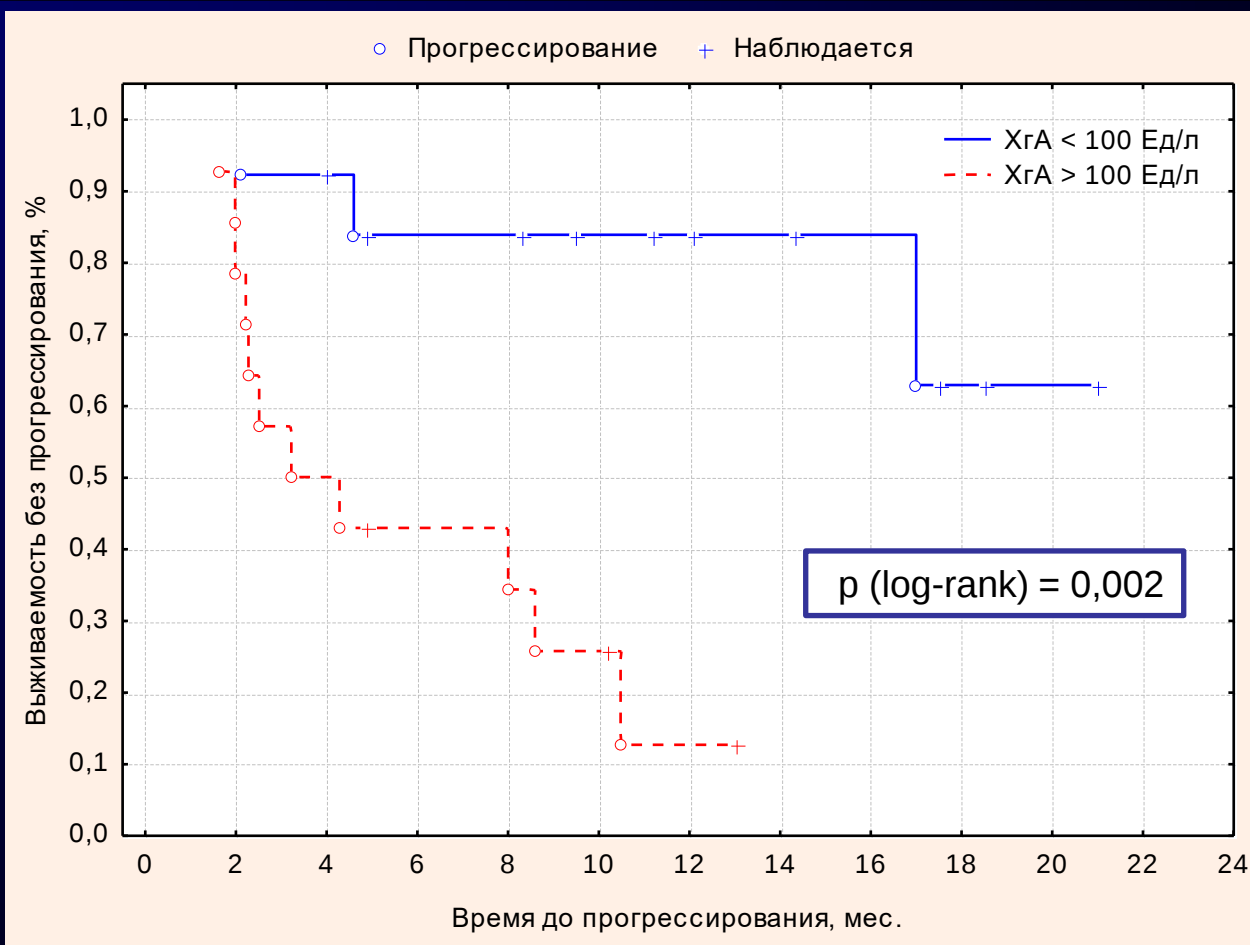
Хромогранин А обладает высокой диагностической чувствительностью независимо от клинических характеристик опухолевого процесса, что подтверждает его универсальность как маркера НЭО.

Уровни ХгА до лечения и выживаемость без прогрессирования у больных НЭО, получавших лечение в РОНЦ им Н.Н. Блохина с 2007 по 2017 гг.



Базальный уровень ХгА	ХгА < 100 Ед/л	ХгА > 100 Ед/л
Количество пациентов (n)	51	60
1-летняя выживаемость	83,5%	69,5%
3-летняя выживаемость	54,1%	25,7%
5-летняя выживаемость	41,2%	14,3%

Уровни ХгА до лечения и выживаемость без прогрессирования у больных НЭО, получавших терапию препаратом «Афинитор»

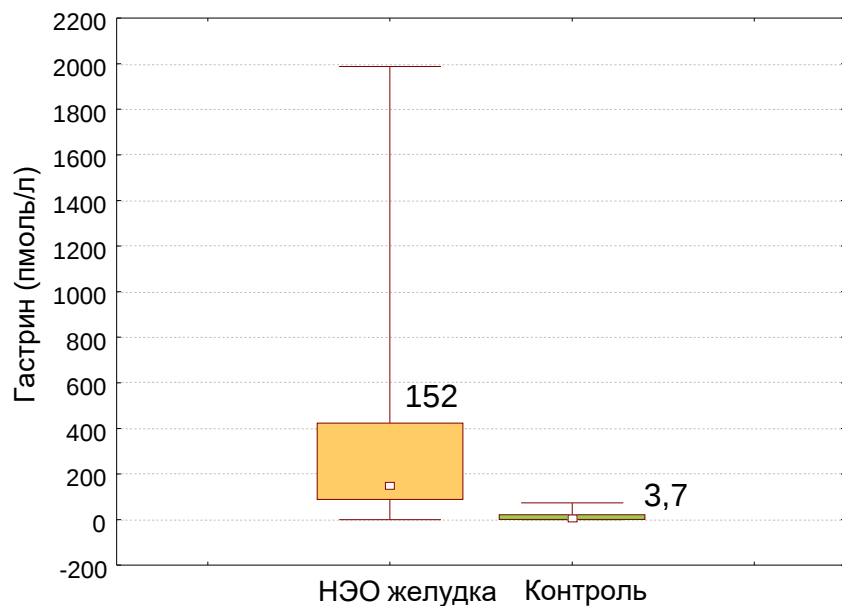


Базальный уровень ХгА	ХгА <100 Ед/л	ХгА > 100 Ед/л
1-летняя выживаемость	65,9%	13,7%

Уровни гастрина у пациентов с НЭО желудка и в контрольной группе

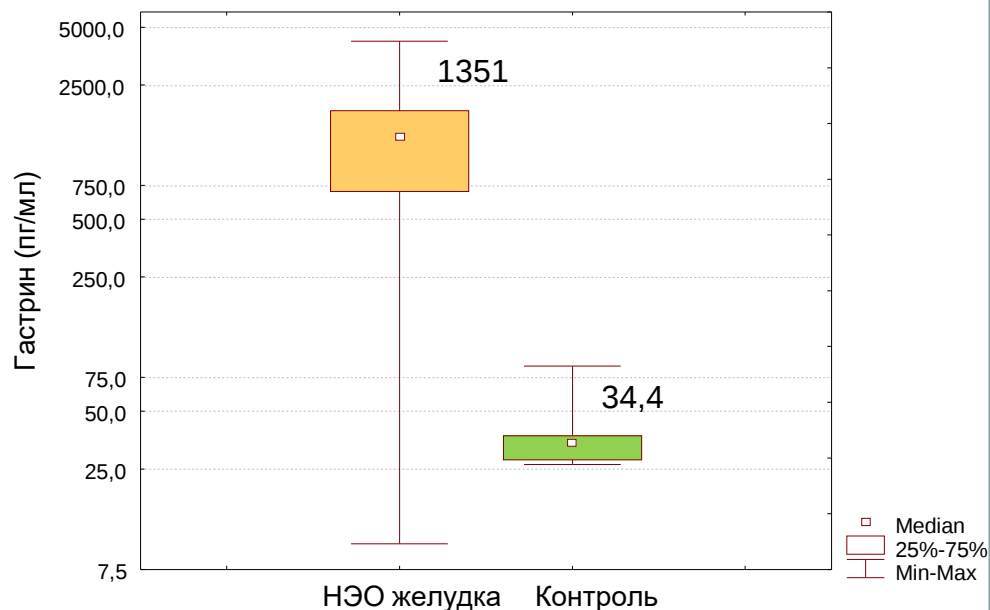
Гастрин-17 (Biohit)

Пороговое значение: 65 пмоль/л
Специфичность: 91,6%
Чувствительность: 80,0%



Гастрин общий (Immulite 2000)

Пороговое значение: 115 пг/мл
Специфичность: 94,7%
Чувствительность: 95,4%

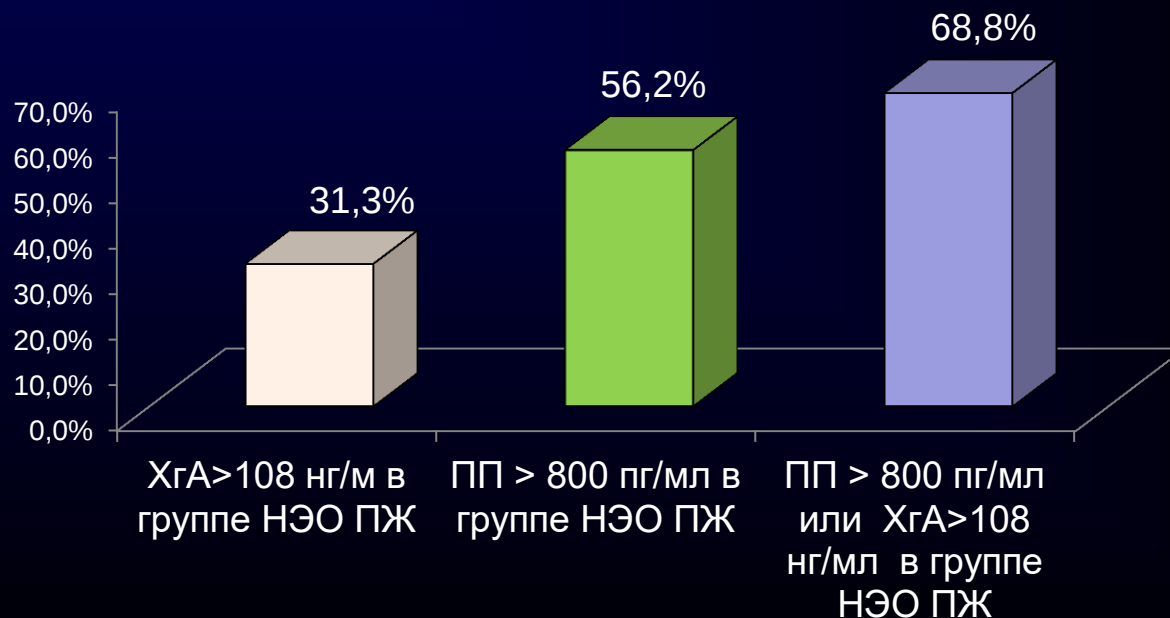


Панкреатический полипептид (ПП) и ХгА у больных НЭО поджелудочной железы

Группа (n)	ХгА	ПП
НЭО поджелудочной железы (16)	8649 ± 6861* (31,1-109458)	2541 ± 986,2* (28,0 – 15530)
Контрольная группа (30)	67,5 ± 4,98 (29,2-194)	453 ± 45,4 (20 – 790)

* - различия с контролем достоверны ($p < 0,05$). Результаты представлены в виде среднего со стандартной ошибкой

Повышение диагностической эффективности при комплексном исследовании ХгА и ПП



Общие требования к взятию биологического материала и исследованию маркеров НЭО

Взятие крови на биохимические маркеры проводится в утренние часы до выполнения любых диагностических и лечебных мероприятий, со строгим соблюдением необходимых преаналитических факторов, включая 12-часовое голодание.

Лабильность молекулярной структуры и особенности метаболизма маркеров НЭО требуют соблюдения специальных условий получения и обработки биологического материала: взятие крови на соматостатин, ПП, ВИП, глюкагон необходимо проводить в специальные вакуумные системы с антикоагулянтом и ингибитором протеолитической активности; сбор суточной мочи проводится с консервантом.

При сборе материала на серотонин и 5-ГИУК необходима подготовка пациентов с исключением продуктов питания, богатых триптофаном, а также ряда интерферирующих медикаментов в соответствии с лабораторной инструкцией.

Определение ХгА и гастрина необходимо проводить после отмены ингибиторов протонной помпы (2-3 недели), антагонистов гистаминовых рецепторов 2 типа (2 сут).

Серийные исследования маркеров должны выполняться с использованием одинаковых тест-систем на базе одной лаборатории. При переходе на другую тест-систему пациентам должны устанавливаться новые базальные уровни. Результаты, полученные при использовании тест-систем разных производителей, не должны сравниваться.

Рекомендации по использованию маркеров НЭО

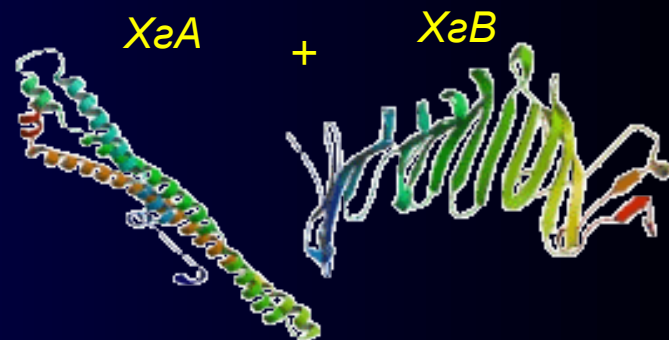
Тип НЭО	Маркеры
Нефункционирующие	- Хромогранин А - Панкреатический полипептид (НЭО ПЖ и ЖКТ)
Функционирующие	- Хромогранин А - Панкреатический полипептид (НЭО ПЖ и ЖКТ) Дополнительные маркеры в соответствии с клинической картиной: Карциноидный синдром 5-ГИУК - Серотонин Эутопическая и эктопическая гиперсекреция гормонов - Гастрин + РН-метрия - Инсулин + С-пептид + гликемия - Глюкагон - Соматостатин - Вазоактивный интестинальный пептид (ВИП) - АКТГ, кортизол - Кальцитонин - Паратиреоидный гормон (ПТГ) - Пролактин Карциноидная болезнь сердца - Мозговой натрийуретический пропептид (Pro-BNP): <i>при повышенной секреции серотонина (>1000 нг/мл) и гиперэкскреции 5-ГИУК (>350 мкмоль/сутки).</i>

Перспективы лабораторной диагностики НЭО

Расширение спектра биохимических маркеров НЭО: ХгВ, панкреастатин, нейрокинин А

ХгВ – маркер НЭО комплементарный ХгА, не зависит от экзо- и эндогенных факторов, влияющих на ХгА. Диагностическое значение: инсулинома, карциноид прямой кишки, НЭО легких.

Нейрокинин А – маркер карциноидного синдрома.



Разработка молекулярно-генетических методов:

Определение **циркулирующих информационных РНК-транскриптов**, продуцируемых НЭО, методом ПЦР предполагается использовать для выявления прогрессирования на ранних стадиях. Мультигенный NETest дифференцирует НЭО и незлокачественную патологию с диагностической чувствительностью и специфичностью до 90%.

Оценка профилей циркулирующих **микро-РНК** может использоваться для дифференциальной диагностики НЭО с другими типами опухолей (НЭО и аденокарциномы). Исследование микро-РНК используется в основном в научных целях. Клиническое применение метода ограничено.



Спасибо за внимание!