

БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ ОПУХОЛЕЙ: ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Любимова Н.В., Кушлинский Н.Е.

Нейроэндокринные опухоли (НЭО) представляют собой гетерогенную группу новообразований с локализацией практически в любом органе, отличительной характеристикой которых является способность продуцировать биологически активные соединения, проявляющие себя своеобразными клиническими синдромами и симптомами [6, 55]. Нейроэндокринная природа таких опухолей может быть верифицирована при комплексном морфологическом исследовании с включением иммуногистохимического анализа, позволяющего не только установить их нейроэндокринную структуру, но и верифицировать по типу биологически активного пептида, или экспрессируемого маркера. В то же время существенную помощь в постановке диагноза и последующем мониторинге эффективности лечения НЭО может оказать определение циркулирующих маркеров при биохимическом исследовании крови и мочи, перечень которых постоянно растет и в настоящее время включает более 30 показателей. Следует отметить, что, несмотря на возможную гетерогенность клеточного состава опухолей и сочетанную секрецию нескольких пептидов, клинически, как правило, проявляется гиперсекреция какого-либо одного биологически активного соединения; остальные продуцируемые опухолью пептиды могут модулировать выраженность отдельных клинических проявлений в пределах одного синдрома. В течение последних десятилетий достигнут значительный прогресс в изучении биологии опухолей нейроэндокринной природы, которые как группа опухолей характеризуются общими клинико-биологическими признаками, но в то же время имеют уникальный набор биохимических факторов, определяющих их ауто- и паракринные свойства и функциональные особенности. В этом аспекте идентификация генерального маркера НЭО, являющегося основой для дифференциальной диагностики, своевременного выявления рецидива и прогрессирования заболевания, а также осуществления индивидуального прогноза и мониторинга лечения, остается важной и в то же время сложной в техническом отношении лабораторной задачей. В настоящее время основным в группе общих маркеров и наиболее изученным циркулирующим биохимическим маркером, который в большинстве случаев идентифицирует опухоли нейроэндокринной природы, является хромогранин А (ХгА). Биохимическая диагностика НЭО дополняется специфическими маркерами в соответствии с типом опухоли и имеющейся у больного клинической картиной. Важными маркерами для оценки биологической активности НЭО и выявления карциноидного синдрома являются серотонин и его метаболит 5оксииндолилуксусная кислота (5-ОИУК), экскретирующаяся с мочой. При наличии клинической картины, характерной для эктопической или эутопической продукции биологически активных пептидов, а также при иммуногистохимическом выявлении экспрессии одного из перечисленных ниже специфических пептидов, рекомендуется дополнительно провести исследование соответствующего маркера в сыворотке или плазме крови. Спектр таких маркеров многообразен и включает гастрин, глюкагон, инсулин, С-пептид, панкреатический полипептид, вазоактивный интестинальный пептид, соматостатин, гистамин, кальцитонин, паратиреоидный, соматотропный, адренокортикотропный и тиреотропный гормоны, основные катехоламины (адреналин и норадреналин в сыворотке крови или моче) и их метаболиты (нор- и метанефрин в моче), альдостерон, кортизол, пролактин, ЛГ, ФСГ и некоторые другие гормоны и нейропептиды [63]. Ниже будут представлены общие молекулярно-биологические характеристики наиболее информативных биохимических маркеров НЭО, а также оценка их клинической значимости с учетом данных зарубежных авторов и результатов собственных исследований, выполненных в лаборатории клинической биохимии при обследовании больных, получавших лечение в отделении химиотерапии ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» с 2008 по 2013 годы.

Общие представления о биохимических маркерах нейроэндокринных опухолей

За последние полвека достигнут ощутимый прогресс в изучении молекулярнобиологических особенностей НЭО. Идентификация и изучение пептидных гормонов и биогенных аминов, продуцируемых нейроэндокринными клетками, стимулировали совершенствование методов лабораторного анализа и

способствовали разработке тест-систем на основе высокоспецифичных моноклональных антител, что сделало доступным определение этих биологически активных соединений в качестве циркулирующих маркеров НЭО. Следует отметить, что представления о НЭО развивались и подвергались переоценке на протяжении более чем вековой истории развития этого понятия по мере расширения возможностей лабораторных технологий. Впервые секреторные свойства НЭО были подтверждены в пятидесятые годы прошлого столетия несколькими группами авторов в результате исследования сыворотки крови и мочи больных с карциноидным синдромом, а также последующего выделения серотонина из карциноидной опухоли подвздошной кишки и энтерохромаффинных клеток животных и человека [23, 67]. Ключевая роль этого биогенного амина в проявлении карциноидной симптоматики нашла отражение в использовании термина «карциноид» до настоящего времени: несмотря на пересмотр используемой ранее терминологии и введения четкого понятия нейроэндокринной опухоли, этот термин остается в современной классификации в контексте карциноидного синдрома, характерного для опухолей, секретирующих серотонин [13, 43, 54]. Кроме того, этот научный факт явился основанием для использования серотонина в качестве основного маркера НЭО в течение длительного времени. Биохимическая идентификация типа нейроэндокринных опухолей стала возможной после разработки в шестидесятые годы прошлого столетия радиоиммунного и иммуноферментного методов определения концентрации гормонов, продуцируемых поджелудочной железой. В настоящее время перечень биохимических маркеров НЭО представлен широким спектром различных показателей, и этот список постоянно растет и пересматривается по мере развития научнотеоретической, методической и клинической базы. В соответствии с современными представлениями о молекулярно-биологических особенностях НЭО охарактеризованные в качестве маркеров соединения делят на две группы, одна из которых объединяет общие, или универсальные, маркеры, другая – специфические маркеры (табл. 1).

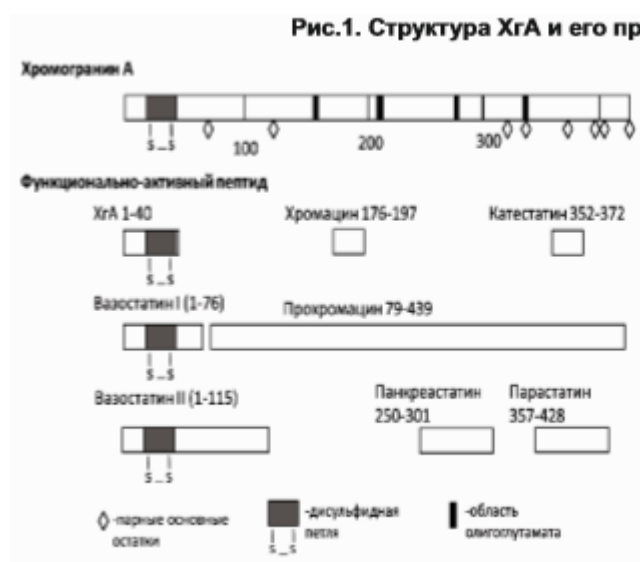
Таблица 1.

Биохимические маркеры нейроэндокринных опухолей (НЭО)	
Общие маркеры	Специфические маркеры
<i>Сыворотка или плазма крови</i> Хромогранин А (ХгА) Панкреатический полипептид (ПП) Нейронспецифическая енолаза (НСЕ) - субъединица гликопротеиновых гормонов	<i>Сыворотка или плазма крови</i> Серотонин (5-НТ) Гастрин Инсулин С-пептид Глюкагон Вазоактивный интестинальный пептид (ВИП) Гистамин Соматостатин Кальцитонин Паратиреоидный гормон (ПТГ) АКТГ Кортизол Катехоламины Тахикинины Нейропептиды <i>Суточная моча</i> Серотонин 5-оксииндолилуксусная кислота (5-ОИУК, 5-ГИУК, 5-НИАА) Метанефрины

Универсальные маркеры нейроэндокринных опухолей

Хромогранин А (ХгА) – основной маркер этой группы, представляет собой кислый гликопротеин с молекулярной массой 49 кДа, состоящий из 439 аминокислотных остатков. Ген белка локализован на хромосоме 14. ХгА относится к большому семейству растворимых высокомолекулярных кислых белков хромогранинов/секретогранинов, ассоциированных с секреторным процессом нейроэндокринных клеток [4]. По своей структуре гранины представляют собой одноцепочечную последовательность из 180-720 аминокислотных остатков и демонстрируют ряд общих свойств, наиболее важным из которых является термостабильность. Для этих гидрофильных белков характерно также наличие ряда основных аминокислотных остатков, обуславливающих посттрансляционные изменения и их общее распределение в секреторных гранулах. Точная функция данных белков до конца не выяснена и предполагается, что гранины функционируют как прогормоны. Они обладают многочисленными последовательностями аминокислотных

остатков, функционирующими как участки протеолитического процессинга, что способствует образованию множественных пептидных фрагментов с биологической и эндокринной активностью, характеристика которых будет представлена ниже. Первый член этого семейства ХгА (синоним: паратиреоидный секреторный белок I) был идентифицирован более 30 назад как совместный с катехоламинами продукт экзоцитоза хромоаффинных клеток надпочечников [24, 47]. Впоследствии были охарактеризованы ХгВ (секретогранин I), ХгС (секретогранин II), секретогранин III/1B1075 (SgIII), секретогранин IV/HISL-19 антиген (SgIV), секретогранин V, секретогранин VI [1], однако ХгА в связи с его биодоступностью остается наиболее изученным и важным в клиническом отношении представителем этого семейства гликопротеинов. Гранины внутри семейства в целом не обладают множеством структурных сходств. Всем белкам данного семейства свойственна только общая Стерминальная последовательность. Однако хромогранины А и В обладают схожими участками, локализованными в их N-терминальных регионах, которые отсутствуют в ХгС. Для первичной структуры ХгА характерно распределение десяти пар основных аминокислот по всей длине молекулы, которые являются участками, доступными для специфических эндогенных протеаз и в результате расщепления которых образуются различные статины (рис.1). В соответствии с этим циркулирующий в крови ХгА представлен разными молекулярными формами, среди которых идентифицировано по крайней мере 10 дополнительных к интактному ХгА пептидов, состоящих от 20 (катестатин) до 113 (вазостатин II) аминокислотных остатков [4, 26, 53].



Аналогично ХгА, ХгВ также является молекулой-предшественником, в результате посттрансляционных изменений которой при расщеплении под воздействием специфических эндогенных протеаз возникает целый ряд пептидов, гомологичных разным последовательностям молекулы ХгВ. Первые протеолитические пептиды этого гранина ССВ и GAWK были идентифицированы более 15 лет назад в качестве аминокислотных последовательностей 596-653 и 420-483, впоследствии были охарактеризованы другие фрагменты ХгВ [4, 61, 88]. В целом по своей молекулярной структуре N-концевой и С-концевой области ХгВ является гомологом ХгА с тем различием, что он имеет большую молекулярную массу (70 кДа), состоит из 657 аминокислот, которые формируют 15 потенциальных сайтов для эндогенных протеаз. Поэтому неудивительно, что в кровеносном русле ХгВ циркулирует в виде смеси интактного пептида и его множественных фрагментов, что существенно затрудняет создание специфической тест-системы для детекции циркулирующего гранина. При исследовании структуры и биохимических свойств основных гранинов было отмечено, что характерная для ХгА и ХгВ петлевая структура, связанная дисульфидными мостиками с высокогомологичной последовательностью аминокислотных остатков в области N-терминального региона этих пептидов, скорее всего, отвечает за внутриклеточный транспорт и способность связываться с мембраной, что, в конечном итоге, обеспечивает направление этих гранинов в соответствующую секреторную везикулу [4, 47, 88]. Для ХгС, также как и для других гранинов, установлена одна сходная аминокислотная последовательность в зоне С-концевого участка молекулы. Спектр его производных ограничен двумя пептидами, основным из которых является секретонейрин, циркулирующий в крови в виде биологически активной формы с высокой

иммунореактивностью [53]. Являясь обязательными структурными белками нейроэндокринных клеток, гранины участвуют в многочисленных внутри- и внеклеточных процессах. Предполагаемые внеклеточные функции гранинов взаимосвязаны с описанными выше особенностями их молекулярной структуры и прежде всего это касается их способности образовывать различные биологически активные пептиды, проявляющие ауто-, пара- и/или эндокринное действие. За последние 25 лет описан целый ряд производных гранинов, для которых характерны разнообразные регуляторные эффекты [24,47,53, 61]. Интересно, что в качестве первого биологически активного пептида был охарактеризован панкреастатин, предшественником которого оказался ХгА, для которого впоследствии было идентифицировано более 10 различных производных. Наиболее изученные производные ХгА и других гранинов, а также характеристика их разнообразной внеклеточной биологической активности представлены в табл.2. Следует отметить, что протеолитический процессинг гранинов, протекающий, скорее всего, в гранулярных везикулах, зависит от качественного и количественного состава протеаз и гранинов, что и обуславливает вариабельность состава их производных в различных нейроэндокринных тканях. В свою очередь, различие представительства гранинов и их фрагментов формирует многообразие проявлений биологической активности и функциональных характеристик нейроэндокринных клеток, как в норме, так и при их неопластической трансформации [17,53]. Интересные данные получены в отношении роли ХгА и его фрагментов в регуляции клеточной адгезии. Показано, что N-концевые фрагменты (1-78 и 1-115 последовательности аминокислотных остатков) способны индуцировать адгезию и распределение фибробластов, которые в результате их активации могут влиять на регуляцию развития и ремоделирования нейроэндокринной ткани. В соответствии с этим предполагается, что ХгА и продукты его протеолиза могут действовать как факторы роста для клеток НЭО, оказывая влияние на диссеминацию опухолей нейроэндокринной природы в целом [47,61].

Таблица 2

Предполагаемое действие производных основных гранинов	
Гранины, их фрагменты и последовательности	Биологическая активность фрагментов
Хромогранин А (ХгА)	
ХгА 1-40	Усиливает высвобождение кальцитонина и кальцитонин-подобного пептида в клетках опухолей легкого, ингибирует вазоконстрикцию, ингибирует секрецию паратиреоидного гормона главными клетками паращитовидной железы
Хромофунгин (ХгА 47-66)	Проявляет противогрибковую активность
Вазостатин I (ХгА 1-76)	Ингибирует вазоконстрикцию, активирует адгезию фибробластов, ингибирует секрецию паратиреоидного гормона главными клетками паращитовидной железы, включает опосредованный микроглией апоптоз нервных клеток, проявляет бактериолитические и антигрибковые свойства
Вазостатин II (ХгА 1-113)	Ингибирует вазоконстрикцию и секрецию паратиреоидного гормона
Прохромацин (ХгА 79-431)	Проявляет бактериолитические и антигрибковые свойства
Хромостатин (ХгА 124-143)	Ингибирует высвобождение катехоламинов из мозгового вещества надпочечников.
Хромацин I и II (ХгА 173-194 и ХгА 195-221)	Проявляют бактериолитические и антигрибковые свойства
Панкреастатин (ХгА 240-288)	Ингибирует секрецию инсулина и глюкагона клетками островков Лангенгарса поджелудочной железы, стимулирует гликогенолиз в печени, снижает инсулин-индуцированный синтез гликогена в скелетной мускулатуре, гепатоцитах, и адипоцитах, стимулирует высвобождение амилазы из клеток ацинусов поджелудочной железы, снижает синтез соляной кислоты в желудке, снижает захват глюкозы клетками скелетной мускулатуры
Катестатин (ХгА 344-364)	Ингибирует высвобождение катехоламинов из мозгового вещества надпочечников
Парастатин (ХгА 347-419)	Ингибирует секрецию паратиреоидного гормона главными клетками паращитовидной железы

Хромогранин В (ХгВ)	
ХгВ 1-41	Ингибирует секрецию паратиреоидного гормона главными клетками паращитовидной железы
Хромбацин (ХгВ 564-626)	Проявляет бактериолитические свойства
Секретолитин (ХгВ 614-626)	Проявляет бактериолитические свойства
ХгВ (1-657)	Ингибирует биосинтез и высвобождение инсулина
Секретогранин II (ХгС)	
Секретонейрин (SgII 154-186)	Стимулирует высвобождение дофамина из центральных стриарных нейронов и базального ганглия, стимулирует секрецию гонадотропина II гипофизом, ингибирует высвобождение серотонина и мелатонина пинеалоцитами, провоцирует хемотаксис моноцитов, эозинофилов и фибробластов, стимулирует миграцию и ингибирует пролиферацию эндотелиальных клеток, стимулирует трансэндотелиальную миграцию моноцитов, активирует адгезию нейтрофилов эндотелиальными клетками
Секретогранин V	
Амино-терминальный пептид (7B2 1-135)	Действует как активатор и шаперон для фермента пре-прогормон конвертазы 2 типа
Карбокси-терминальный пептид (7B2 155-185)	Ингибирует прогормон конвертазу 2
Секретогранин VI	
SgVI 159-162	Действует как антагонист 5-HT1B серотонинэргических рецепторов

Помимо внеклеточных функций, гранины также проявляют внутриклеточную активность. Все хромогранины богаты кислыми аминокислотными остатками, вследствие чего при низком pH проявляют способность к агрегации и высокую кальций-связывающую способность. В регуляции синтеза ХгА участвует ряд молекулярных факторов, таких как протеинкиназа А и С, гистамин, никотин, брадикинин, ангиотензин II, простагландин E2 и ионы калия, кальция. Молекулы гранинов претерпевают посттрансляционные модификации, которые включают карбоксиметилирование, гликозилирование, фосфорилирование и сульфатирование. Процессинг хромогранинов специфичен для разных типов тканей. После синтеза гранины транспортируются через эндоплазматическую сеть и аппарат Гольджи, в котором они аккумулируются в нейроэндокринных гранулах и в последующем процессе протеолиза преобразуются в биологически активные пептиды [17,47, 61]. Хромогранин А является кальций-связывающим белком с высокой емкостью и низкой аффинностью. Связывание хромогранулином кальция зависит от pH и может изменяться в ходе процесса созревания секреторной гранулы. Концентрация кальция и иона водорода оказывает значительное влияние на конформацию молекулы ХгА, изменения которой лежат в основе способности ХгА распределять нейротрансмиттеры и пептидные гормоны, после чего упаковывать их в секреторные гранулы. Хромогранины регулируют процессинг пептидных гормонов в ходе их транспорта в нейроэндокринные везикулы, функционируя как шапероны, распределяя различные секреторные белки [24,47]. Также одной из важнейших функций хромогранинов является связывание моноаминов, в том числе катехоламинов, за счет ионных взаимодействий. Таким образом, важнейшими внутриклеточными функциями ХгА являются: гранулогенез, или участие в формировании секреторных везикул, стабилизация секреторных везикул, связывание кальция и регуляция его содержания, связывание аминов и пептидных гормонов, а также регулировка процессов хранения и высвобождения молекул пептидных гормонов и катехоламинов. Анализ распределения гранинов в нормальных нейроэндокринных тканях показал, что ХгА и ХгВ являются наиболее распространенными гранинами и для большинства нейроэндокринных клеток характерна их комплементарность. В то же время, по своей экспрессии ХгА и ХгВ существенно различаются. Так, в хромоаффинных клетках надпочечников они экспрессируются в равной степени, тогда как в клетках паращитовидной железы и энтерохромоаффинных клетках желудочнокишечного тракта доминирует ХгА [17, 47]. Для ХгА характерна вариабельность распределения в нормальных тканях. Так, наибольшее количество ХгА содержится в хромоаффинных гранулах в мозговом веществе надпочечников и в плотных гранулах везикул симпатических нервов. В целом центральная и периферическая нервная система, гипофиз богаты ХгА [17]. Этот гликопротеин присутствует в кальцитонин-продуцирующих клетках щитовидной железы, в экзокринной ткани поджелудочной железы, в инсулин- и глюкагон-продуцирующих клетках, а также плаценте. ХгА обнаруживается в клетках диффузной нейроэндокринной системы легких, селезенки, предстательной железы, тимуса и др. При этом экспрессия других гранинов не коррелирует с таковой ХгА. С тех пор, когда была подтверждена связь фосфорилирования ХгА с секреторной активностью хромоаффинных клеток,

хромогранины стали рассматриваться в качестве иммуноцитохимических маркеров нейроэндокринных тканей, а затем и опухолей нейроэндокринной природы. По мере изучения молекулярных особенностей гранинов, а также их экспрессии в нейроэндокринных клетках стала очевидной возможность использования этих гликопротеинов и, прежде всего, ХгА в качестве циркулирующих маркеров. Первые работы, указывающие на диагностическую значимость ХгА как маркера НЭО, появились в 1983-1989 гг., когда стала доступной первая тест-система для определения ХгА на основе РИА. O'Connor и Deftos представили данные сравнительного определения ХгА в сыворотке крови практически здоровых людей и пациентов с феохромоцитомой, карциноидами, островковыми опухолями поджелудочной железы, МРЛ, медуллярным раком щитовидной железы, а также с аденомой и гиперплазией паращитовидной железы [64, 84]. С учетом того, что у большинства больных (81%) наряду с гиперсекрецией специфических пептидных гормонов были обнаружены высокие уровни ХгА, авторами был предложен термин «хромогранинома» для обозначения таких опухолей. Особый интерес представляет опубликованная в 1989 г. работа Sobol и Deftos, в которой были представлены клинические наблюдения медуллярного рака щитовидной железы и островковой опухоли поджелудочной железы, охарактеризованные как гормонально-негативные, но хромогранин-позитивные, что выражалось в многократном увеличении концентрации ХгА в сыворотке крови больных при отсутствии признаков гиперсекреции пептидных гормонов [83]. Это была практически первая работа, свидетельствующая о существовании эндокринных опухолей, для которых не характерна ко-секреция ХгА и пептидных гормонов, считавшаяся обязательной. Кроме того, было сделано заключение о возможности использования ХгА в диагностике и мониторинге «хромогранином», т.е. нефункционирующих опухолей, что впоследствии подтверждалось другими авторами. Таким образом, около 30 лет назад были инициированы отдельные исследования, в которых было продемонстрировано клиническое значение ХгА как биохимического маркера НЭО. С тех пор работы, посвященные ХгА, постоянно продолжаются [5, 9, 18, 21, 22, 26, 48] и в настоящее время исчисляются сотнями. Следует добавить, что по мере накопления данных сравнительных исследований секреции гранинов и их производных в норме и при различных типах НЭО появились работы, свидетельствующие о перспективности исследования некоторых пептидных фрагментов гранинов в качестве биохимических маркеров НЭО (табл.3). Однако пока эти данные ограничены отдельными наблюдениями и носят предварительный характер [16, 34, 80]. За последнее десятилетие накоплены убедительные данные, свидетельствующие о ведущей роли ХгА как биохимического маркера НЭО, которые будут представлены в разделе главы, посвященном клиническим аспектам использования циркулирующих маркеров. В то же время, необходимо отметить, что, несмотря на признанную диагностическую эффективность, существуют факторы, которые лимитируют клиническое использование ХгА. При этом частично они входят в состав общих факторов, которые необходимо учитывать при интерпретации результатов анализа большинства используемых в клинической практике маркеров, тогда как некоторые эндогенные и экзогенные факторы являются специфическими для ХгА. Основные факторы, которые могут оказывать влияние на конечный результат определения ХгА, систематизированы в табл. 4. Это, прежде всего, состояние функции почек, печени, желудочно-кишечного тракта, сердечнососудистой и иммунной системы, нарушения которых могут искажать (как правило, повышать) уровень ХгА в плазме крови [17, 47, 53]. Однако в большинстве случаев отклонения от нормы носят умеренный характер [61]. В частности, при почечной недостаточности ХгА достигает уровней, обнаруживаемых у больных НЭО лишь при концентрации креатинина сыворотки крови, превышающей 400 мкмоль/л. При выраженной дисфункции печени с гипербилирубинемией более 80 мкмоль/л ХгА повышается незначительно. Учитывая совместное с катехоламинами высвобождение ХгА из хромоаффинных гранул, можно было бы предположить выраженное усиление его секреции в условиях стресса, однако в отличие от серотонина даже в условиях интенсивной симпатoadреналовой стимуляции сывороточный уровень ХгА не повышался больше чем в 2 раза. Это может объясняться уже отмеченной ранее способностью многих нейроэндокринных тканей в норме секретировать ХгА, что обеспечивает его высокий плазменный пул, существенно превышающий таковой большинства пептидных гормонов. Как следствие, даже при наличии указанных выше факторов, не так часто наблюдаются случаи секреции ХгА, превышающей физиологический уровень. Это подтверждают данные работ различных авторов, представленные в табл. 5.

Как правило, при неонкологических заболеваниях ХгА лишь в отдельных случаях повышался до уровней, обнаруживаемых в плазме крови пациентов с НЭО.

Таблица 3

Нейроэндокринные опухоли, ассоциированные с повышенной концентрацией циркулирующих производных гистамина	
Производные хромогранина А (ХгА)	
Панкреастатин	Карцином ЖКТ с поражением печени Гастроинтестинальные опухоли Нейробластома Ганглионейрома Медуллярный рак щитовидной железы
Вазостатин-1	Карцином подвздошной кишки
WE-14	Феохромоцитома
Производные хромогранина В (ХгВ)	
GAWK	НЭО поджелудочной железы Карциномы Феохромоцитома АКТГ-продуцирующая опухоль
CCB	Мелкоклеточный рак легкого
Производные секретогранина II (ХгС)	
Секретонейрин	Карцином средней кишки Опухоли из островков Лангерганса Феохромоцитома Овсяноклеточный рак легкого Рак предстательной железы
EM-66	Феохромоцитома

Таблица 4

Факторы, ассоциированные с повышением концентрации хромогранина А в сыворотке крови	
Нейроэндокринные опухоли	НЭО желудка НЭО поджелудочной железы НЭО тонкой кишки Колоректальные НЭО Опухоли гипофиза Медуллярный рак щитовидной железы Мелкоклеточный рак легкого Нейробластома Феохромоцитома Парагангиома
Другие злокачественные опухоли с элементами нейроэндокринной дифференцировки	Рак молочной железы Рак поджелудочной железы Рак прямой кишки Рак яичников Рак предстательной железы Первичный рак печени
Системные воспалительные заболевания	Системный ревматоидный артрит Синдром системного воспалительного ответа Гигантоклеточный артрит
Гастроинтестинальные нарушения	Хронический атрофический гастрит Панкреатит Воспалительные заболевания кишечника Синдром раздраженного кишечника Цирроз печени Хронический гепатит
Эндокринные заболевания	Гиперпаратиреоз Гипертиреоз
Сердечно-сосудистые заболевания	Артериальная гипертензия Сердечная недостаточность Острый коронарный синдром
Заболевания легких	Хронический бронхит Хронические обструктивные заболевания легких
Заболевания почек	Почечная недостаточность
Заболевания почек Действие лекарственных препаратов	Ингибиторы протонной помпы Антагонисты рецептора гистамина Кортикостероиды

Как следует из табл.4, к специфическим факторам, ограничивающим исследование ХгА, относят препараты, снижающие кислотность желудочного сока (ингибиторы протонной помпы, антагонисты H₂-рецепторов гистамина), которые способствуют усилению секреции ХгА в результате энтерохромаффинноподобной гиперплазии слизистой желудка в ответ на возникающую гипергастринемию. В связи с этим рекомендуется

отменять прием таких препаратов за 2-3 недели до выполнения анализа [47, 61]. В то же время, применение аналогов соматостатина может сопровождаться значительным снижением уровня ХгА в плазме крови больных НЭО, что, скорее всего, связано с непосредственным угнетением синтеза и секреции пептидов, а не с уменьшением массы опухоли [50]. Кроме того, в целях стандартизации определения ХгА взятие крови необходимо проводить до приема пищи, которая может приводить к повышению концентрации маркера от 16 до 30%, иногда – до 100% [11, 37, 53]. При серийных исследованиях необходимо также учитывать индивидуальную вариабельность секреции ХгА как в норме, так и у больных НЭО, которая может достигать 25%.

Таблица 5

Уровни ХгА (Ед/л) в плазме крови практически здоровых людей и пациентов с неонкологическими заболеваниями, полученные при использовании тест-системы «Дак»						
Категория	Группа	N	Медиана (квартилы) (Ед/л)	Среднее±SD (Ед/л)	Интервалы (Ед/л)	Ссылки
Практически здоровые люди		85		11,3±4,33	2,6-20,4	Sciola V. et al., 2009
		65	12,1 (9,6-15,9)			Massironi S. et al., 2009
		129	10,4 (8,0-13,7)	12,3±10,1	5-106,5	Zatelli M.C. et al., 2007
		50	12,3 (9,3-15,3)			Perrachi M. et al., 2003
		45	12,3 (9,1-14,6)			Perrachi M. et al., 2005
		48		10,5±4,7		Campana R.A. et al., 2007
Больные с различными неонкологическими заболеваниями (воспалительные и сердечно-сосудистые)		59	12,8	16,6		Pirker R.A. et al., 1998
Пациенты с воспалительными заболеваниями кишечника		119		20,4±14,0	6,3-88,4	Sciola V. et al., 2009
Больные хроническим гепатитом		79	15,3 (10,9-29,2)			Massironi S. et al., 2009
Больные циррозом печени		14	26,4 (16,8-59,2)			
Пациенты с первичным гиперпаратиреозом		35	16,0 (11,0-26,9)			Peracchi M. et al., 2003
Пациенты с хроническим атрофическим гастритом		42		50,1±41,2		Campana D. et al., 2007
Пациенты с атрофическим гастритом		43	32 (22,2-41,5)			Peracchi M. et al., 2005

Необходимо также обсудить один из важнейших факторов, оказывающих влияние не только на непосредственный результат определения ХгА, но и на его диагностическую эффективность. Проблема стандартизации иммуноферментного анализа в целом возникла одновременно с появлением новой лабораторной технологии, основанной на использовании специфических антител, и, таким образом, насчитывает более 50 лет. Однако, несмотря на крайнюю важность ее решения, чему посвящены многочисленные высказывания, до сих пор критерии стандартизации ИФА отсутствуют. Очевидно, что основной причиной этой давней проблемы является использование в диагностических тест-системах различных производителей моно- и поликлональных антител с разной аналитической чувствительностью и специфичностью. Существенный вклад в вариабельность получаемых результатов вносит также различие принципов детекции, на которых основаны радиоиммунный (РИА) и иммуноферментный (ИФА) анализ. Кроме того, количественные расхождения используемых стандартов и различное выражение единиц измерения делают невозможным сравнение получаемых результатов. Как и в случае иммуноферментного анализа других биохимических показателей, результаты определения ХгА зависят, прежде всего, от аналитической чувствительности и специфичности используемых в тест-системах антител. Доступные для использования в клинической практике тест-системы разработаны на основе поликлональных и моноклональных антител к различным эпитопам, определяя, таким образом, как непосредственно ХгА, так и его производные. Сравнительный анализ нескольких тест-систем, используемых в клинической практике, а также при проведении научных исследований показал вариабельность получаемых результатов при использовании методов на основе РИА и ИФА [29, 56, 87]. При этом три тест-системы «CGA-RIA CT, CIS bio International», «DAKO Chromogranin A ELISA kit» и «CgA EuroDiagnostica» на одном и том же материале (46

пациентов с различными типами НЭО) проявили сравнимую специфичность (96%, 85%, 88%), при этом чувствительность составила 67%, 85% и 93% соответственно. Выполненный сравнительный анализ позволил сделать вывод о лучших аналитических и диагностических характеристиках наборов на основе ИФА. При этом необходимо учитывать также разную стандартизацию доступных для использования тест-систем, что делает невозможным сравнение результатов определения ХгА, полученных на основе наборов реагентов разных производителей. Этому фактору следует уделять особое внимание при обследовании больных в динамике, поскольку использование наборов реактивов, основанных на разных методических принципах и антителах с различной аналитической чувствительностью и специфичностью, может приводить к существенному расхождению результатов и, соответственно, ошибочной оценке течения опухолевого процесса. В качестве одного из подходов к повышению диагностической точности ХгА предлагается его одновременное определение на основе двух разных тест-систем, что, по мнению авторов, может способствовать повышению диагностической чувствительности [72]. При таком подходе негативный результат при использовании одной тест-системы является показанием для повторного анализа образца сыворотки крови пациента с подозрением на НЭО на основе другого набора реагентов. Предполагается, что комбинированное использование разных тест-систем позволит выявить гиперсекрецию разных пептидных производных гванина, что в целом будет способствовать увеличению числа пациентов, позитивных по результатам определения ХгА. В последнее время в качестве дополнительного к ХгА маркера среди представителей семейства хромогванинов/секретогванинов рассматривается, прежде всего, ХгВ. Однако уже отмечался тот факт, что в кровеносном русле ХгВ циркулирует в виде смеси интактного пептида и его множественных фрагментов и это существенно затрудняет создание специфической тест-системы для детекции циркулирующего гванина. Однако, появившиеся данные о том, что для ХгВ характерна менее выраженная физиологическая вариабельность и его уровень в сыворотке крови не зависит от факторов, оказывающих влияние на ХгА (в частности, состояния функции почек, желудка, приема препаратов), стимулировали интерес к разработке доступной тест-системы для количественного определения циркулирующего ХгВ как маркера НЭО, комплементарного ХгА [86].

Панкреатический полипептид (ПП) представляет собой линейный полипептид, состоящий из 36 аминокислотных остатков с молекулярной массой 4200Да. ПП продуцируется F (ПП)-клетками, локализованными преимущественно в островках Лангерганса задней части головки поджелудочной железы. Биосинтез и физиологическая роль полипептида на данный момент не совсем ясны и требуют более детального исследования. Известно, что ПП стимулирует секрецию желудочного сока, однако угнетает его секрецию, стимулированную пентагастрином; являясь антагонистом холецистокинина, подавляет секрецию панкреатических ферментов, стимулированную холецистокинином. Концентрация ПП в крови повышается при приеме смешанной пищи, тогда как внутривенное введение глюкозы или триглицеридов не влияет на его концентрацию в крови. Введение атропина и ваготомия блокируют секрецию ПП в ответ на прием пищи, и наоборот, стимуляция блуждающего нерва, а также введение гастрина, секретина или холецистокинина сопровождаются повышением уровня этого полипептида в крови. У здорового человека базальная концентрация ПП в плазме крови не превышает 200 пг/мл. С возрастом, при злоупотреблении алкоголем, диарее, почечной недостаточности, гипогликемии или воспалительных заболеваниях она повышается. Гиперплазия клеток, секретирующих ПП, обнаруживается в поджелудочной железе лиц, страдающих инсулинзависимым сахарным диабетом. Уровни ПП в плазме крови, превышающие 800-1000 пг/мл, регистрируются при различных НЭО поджелудочной железы, включая большинство случаев глюкагономы, ВИПомы, реже инсулиномы (20%) и гастриномы (30%). По данным итальянских авторов диагностическая чувствительность ПП составила 63% при НЭО поджелудочной железы, 53% – при гастроинтестинальных НЭО, 54% – при функционирующих НЭО [66]. Важно, что ПП часто секретируют также клинически нефункционирующие опухоли поджелудочной железы (57%), причем диагностическая чувствительность ПП в комбинации с ХГА увеличивалась до 94-96% при всех указанных типах НЭО [66, 93]. Если ПП является единственным гормональным продуктом НЭО, то клинический эндокринный синдром не развивается, даже если концентрация полипептида в крови многократно (до 1000 раз) превышает его нормальный уровень. При

НЭО поджелудочной железы, как правило, недооценивается диагностическая значимость ПП, гиперсекреция которого характерна для 74% опухолей [22].

Нейронспецифическая енолаза (НСЕ) является нейронспецифическим изоферментом широко распространенного цитоплазматического гликолитического фермента енолазы (2-фосфо-Д-глицерат-гидролаза). По молекулярной структуре представляет собой димер из полипептидов g-типа с молекулярной массой 80 кДа. Идентифицированы также изоформа енолазы из субъединиц а-типа и гибридный изофермент ag. Все изоформы обладают сходным сродством к субстрату 2-фосфоглицерату, превращая его в фосфоенолпируват. Изоферменты aa и ag синтезируются глиальными клетками мозга, в большинстве соматических тканей, обнаруживаются в эритроцитах и тромбоцитах крови и отличаются от НСЕ рядом структурных, физико-химических и иммунологических свойств. Впервые НСЕ была выделена в 1975 г. из экстрактов ткани мозга крысы, при использовании иммуногистохимического анализа в 1978 г. была обнаружена в нейроэндокринных клетках центральной и периферической нервной системы. В 1981 г. НСЕ впервые была охарактеризована как маркер НЭО, что сделало ее, таким образом, родоначальником опухолевых маркеров МРЛ. С тех пор опубликовано множество работ, подтверждающих экспрессию НСЕ в нейронах и нейроэндокринных клетках центральной и периферической нервной системы и клетках опухолей, развивающихся из них. До настоящего времени интерес к этому изоферменту как потенциальному маркеру остается в связи с его избирательной экспрессией в опухолях нейроэндокринного происхождения. При этом 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 крайне низкой (33%) специфичностью [5]. Повышение уровня НСЕ не дает специфической картины, чаще всего указывает на наличие низкодифференцированной опухоли. Диагностическая специфичность НСЕ ниже, чем у ХгА [96]. В то же время чувствительность комбинации ХгА и НСЕ выше, чем у каждого из них в отдельности [63].

Хорионический гонадотропин человека (ХГ) – относится к гликопротеинам и имеет молекулярную массу 36-40 кДа. Синтезируется во время беременности трофобластическими клетками плаценты и состоит из двух субъединиц (- и -ХГ) – мономеров, образующихся при диссоциации ХГ. Эти субъединицы отличаются по углеводному и аминокислотному составу и биологическому значению. Может эктопически синтезироваться опухолями. Определение интактного ХГ и его субъединиц используется в скрининге ряда НЭО ЖКТ, в частности у больных островковоклеточными опухолями поджелудочной железы: при клинически нефункционирующих панкреатических опухолях концентрации - и -ХГ часто оказываются повышенными [].

Специфические маркеры нейроэндокринных опухолей

Серотонин, или 5-гидрокситриптамин (5-НТ) является промежуточным продуктом метаболизма незаменимой аминокислоты триптофан (ТР), происходящего преимущественно в клетках желудочно-кишечного тракта и головного мозга. Именно серотонин оказался первым биологически активным соединением, идентифицированным в результате исследования сыворотки крови и мочи больных с карциноидным синдромом. Этим клиническим исследованиям предшествовали экспериментальные работы, в результате которых вначале из сыворотки крови животных было выделено биологически активное соединение со свойствами вазоконстриктора, которое затем при его выделении из экстрактов энтерохромаффинных тканей осьминога и лягушки было охарактеризовано как энтерамин, или 5-гидрокситриптамин [23]. Впоследствии 5-гидрокситриптамин был выделен из карциноидной опухоли подвздошной кишки, что подтверждало присутствие этого биогенного амина в энтерохромаффинных клетках человека. Установленные факты позволили связать серотонин с эндокринной системой кишечника, а с учетом цитохимических характеристик и таких свойств энтерохромаффинных клеток, как способность захватывать 5-гидрокситриптофан с последующим его декарбоксилированием до серотонина, сформулировать понятие APUD-системы [67]. Открытие такой связи в конечном итоге привело к пониманию того, что серотонин и его метаболиты могут

играть ключевую роль в проявлении карциноидной симптоматики, что послужило основанием для последующего изучения этого биогенного амина как маркера карциноида. Образование серотонина происходит в 2 этапа, каждый из которых катализируется определенной ферментной системой: в результате гидроксирования в пятом положении, осуществляемого триптофангидроксилазой, триптофан превращается в непосредственный предшественник серотонина 5-окситриптофан (5-HTP), последующее декарбоксилирование которого при участии триптофандекарбоксилазы приводит к образованию 5-окситриптамина, т.е. серотонина [46]. Триптофандекарбоксилаза, катализирующая превращение 5-HTP в серотонин, содержится в значительных количествах в различных органах и тканях, особенно в головном мозге, слизистой оболочке ЖКТ, печени, почках. Активность ферментов регулируется концентрацией триптофана, чрезвычайно высокая скорость метаболизма которого обеспечивается наличием запасов аминокислоты, которые характерны, прежде всего, для глиальных клеток и клеток слизистой оболочки кишечника. Следует отметить, что синтез серотонина не является единственным или главным путем метаболизма триптофана. В норме лишь около 1-3% триптофана идет на образование серотонина, тогда как его основной метаболический путь – синтез никотиновой кислоты. В соответствии с особенностями распределения триптофана и участвующих в его метаболизме ферментов, серотонин синтезируется и накапливается в основном в энтерохромаффинных клетках кишечника (до 80%) и серотонинэргических нейронах головного мозга с последующим его депонированием в тромбоцитах крови, где осуществляется хранение этого биогенного амина [92]. Образовавшийся серотонин накапливается и хранится в связанной в гранулах и свободной цитоплазматической формах, при этом последняя составляет меньшую (до 25%), но физиологически активную фракцию. Большая часть циркулирующего в крови серотонина сконцентрирована в тромбоцитах, что делает возможным его определение как в сыворотке и плазме крови, так и непосредственно в тромбоцитах. Серотонин относится к важнейшим нейромедиаторам и нейротрансмиттерам центральной нервной системы [46]. Он участвует в сокращении гладкой мускулатуры, регуляции кровяного давления и нейротрансмиссии как на периферии, так и в центральной нервной системе, при этом механизм различных эффектов серотонина реализуется через множество сигнальных систем в цитоплазме и мембране клеток, включая и аппарат транскрипции. Его биологическое действие опосредуется расположенными на поверхностной плазматической мембране клеток рецепторами с семью трансмембранными доменами, в свою очередь, сопряженными с G-белками (трансдукторами), которые относятся к семейству гетеротримерных белков, регулирующих активность эффекторных молекул, в частности, ферментов или ионных каналов, что и обуславливает в конечном итоге биологическую реакцию. На уровне сопряженных с G-белками рецепторов осуществляется двоякая регуляция их активности, что в конечном итоге выражается в разной направленности биологических эффектов биогенного амина. Изменение концентрации циркулирующего серотонина выявляется в некоторых патологических условиях, включая острую кишечную непроходимость, хроническую головную боль напряжения, рассеянный склероз, шизофрению, гипертензию, мышечную дистрофию Дюшенна, демпинг-синдром и др. Определение концентрации серотонина в крови и моче имеет важное клиническое значение при диагностике и мониторинге НЭО. Следует отметить, что по данным крупного клинического исследования EORTC подтверждена обратная взаимосвязь между депрессией и высоким уровнем серотонина в сыворотке крови больных НЭО [92]. Особую значимость исследование серотонина в сыворотке крови приобретает при наличии карциноидного синдрома и нормальной экскреции с мочой его метаболита 5-ГИУК, что может наблюдаться при некоторых видах опухолей нейроэндокринной природы. Серотонин отвечает за симптомы, связанные с карциноидным синдромом, который более чем в 60% сопутствует опухолям из средней кишки (ЕМ). Так, серотонин увеличивает секрецию жидкости в кишечнике и скорость прохождения пищевых масс, что создает предпосылки к развитию диареи [46,92]. Кроме того, он является составляющим каскада факторов, приводящих к появлению связанного с опухолью фиброза. Установлено, что створки клапанов сердца у пациентов с карциноидом выделяют большое количество TGF- β . Именно серотонин вызывает повышение продукции TGF- β и стимулирует синтез коллагена интерстициальными клетками клапанов [36]. У больных с карциноидной кардиопатией наличие ее эхографических признаков коррелирует с уровнем серотонина и тахикинина. Серотонин также играет ключевую роль и в развитии перитонеального фиброза. В одном из исследований была показана зависимость присутствия тканевых образований в

брыжейке кишки и соединительнотканых тяжей брюшной полости и малого таза в зависимости от уровня связанного тромбоцитами серотонина и 5-ГИУК в моче. Как было отмечено выше, фиброз при карциноидном синдроме связан не только с серотонином, но и с другими гормональными медиаторами, к которым относятся допамин, эпинефрин, норэпинефрин и гистамин, а также брадикинин, глюкагон, мотилин, нейрокинин В, нейрокинин К, вещество Р, вазоактивный интестинальный пептид, ХгА [13, 15, 39]. Теоретически одно или несколько из этих веществ могут вызывать фиброз сердца и без участия серотонина, но, скорее всего, они лишь дополняют действие последнего. В целом для развития фиброза, по-видимому, важны как пиковый уровень серотонина, так и длительность его экспозиции, что трудно оценить по данным клинического обследования пациентов, так как болезнь длительное время протекает бессимптомно. Исследуется роль серотонина, как фактора, участвующего в реализации метастатического потенциала НЭО. На основе модели логистической регрессии было показано, что наличие метастазов в печени коррелирует с уровнем сывороточного и связанного с тромбоцитами серотонина, а также с экскрецией 5-ГИУК [8]. Как уже было указано выше, повышение уровня серотонина в сыворотке крови или продукта его метаболизма в суточной моче является фактором, позволяющим в первую очередь заподозрить наличие НЭО из производных средней кишки. Опухоли из передней кишки (вилочковая железа, легкое, пищевод, желудок, двенадцатиперстная кишка) также вырабатывают серотонин, но в меньшем объеме, тогда как для НЭО задней кишки (дистальные отделы толстой кишки и прямая кишка) продукция этого биогенного амина не характерна. *Следует отметить, что уровень серотонина в сыворотке крови существенно варьирует в зависимости от времени суток, потребляемых продуктов питания, лекарственных препаратов, стрессорных реакций при взятии крови и др., что существенно снижает его диагностическую специфичность.*

5-окси-3-индолилуксусная кислота. В норме значительное количество циркулирующего в крови серотонина превращается в 5-окси-3-индолилуксусную кислоту (5-ГИУК). Этот конечный продукт метаболизма серотонина выводится с мочой. Суточная экскреция 5-ГИУК – более стабильный и менее подверженный вариабельности показатель, чем концентрация серотонина в периферической крови, поскольку на него в меньшей степени влияют индивидуальные особенности больных, их психоэмоциональное состояние в момент взятия крови, суточные биоритмы. Как правило, при повышенном уровне серотонина в сыворотке крови наблюдается координированное увеличение экскреции 5-ГИУК с суточной мочой (совпадение результатов отмечено примерно в 65% случаев), однако существуют и исключения из данного правила. Повышение серотонина при нормальной экскреции 5-ГИУК наблюдается значительно чаще (примерно у 30% больных), чем противоположное соотношение (5-7%). Расхождения могут быть связаны как с индивидуальными особенностями метаболизма серотонина, так и с особенностями психоэмоционального статуса больного. Уровень серотонина при нормальной экскреции 5-ГИУК может быть, в частности, повышен у больных с синдромом раздраженной толстой кишки, сопровождающимся диареей [46].

На показатели экскреции 5-ГИУК могут также влиять различные эндогенные и экзогенные факторы [38]. Так, заниженные результаты могут наблюдаться у больных с нарушениями функции почек и особенно у пациентов, находящихся на гемодиализе. С другой стороны, этот показатель может быть повышен у пациентов с нарушениями всасывания аминокислот и повышенным выведением метаболитов триптофана, что характерно для таких заболеваний как целиакия, трофические афты, болезнь Уиппла, кишечный стаз или хроническая непроходимость [46]. Существенное влияние на показатели 5-ГИУК и серотонина может оказать употребление в пищу богатых триптофаном продуктов. К ним относятся сливы, ананасы, бананы, баклажаны, помидоры, авокадо, грецкие орехи, шоколад, кофе. Пациентам следует воздерживаться от употребления этих продуктов в течение трех суток до начала сбора мочи или взятия крови на серотонин [25]. На уровень 5-ГИУК в суточной моче влияют также некоторые лекарственные препараты. При этом повышение его концентрации могут вызвать парацетамол, кофеин, ацетанилид (анальгетик), фенацетин, резерпин, цисплатин, фторурацил, мелфалан, гваяколовый эфир глицерина (часто входит в состав различных сиропов от кашля), препараты на основе раувольфии. В то же время аспирин, леводопа, метилдопа, ингибиторы моноаминоксидазы, фенотиазины,

трициклические антидепрессанты, кортикотропин, хлорпромазин, гепарин, имипрайд, октреотид могут привести к обратному, ложноотрицательному или заниженному результату. При исследовании 5-ГИУК, в особенности в диагностических целях, пациенты должны по возможности воздерживаться от приема этих препаратов [46]. С особым вниманием к влияющим на определение 5-ГИУК факторам нужно подходить при назначении анализа в диагностических целях: учитывая ингибирующий эффект аналогов соматостатина на синтез серотонина, необходимо проводить первичное исследование его метаболита до назначения специфического противоопухолевого лечения. При определении 5-ГИУК в процессе или после проведения даже одного курса октреотида или сандостатина, результаты его экскреции с последующей интерпретацией полученных данных могут быть ошибочными. Кроме того, назначение и оценка результатов серийного исследования 5-ГИУК при мониторинге заболевания должны проводиться с учетом получаемого пациентом препарата и его дозы. Одним из важнейших преаналитических факторов, влияющих на конечный результат анализа, является точность сбора суточной мочи. Известна цикличность экскреции 5-ГИУК на протяжении суток с ее пиком в утренние и снижением в вечерние часы [99]. В этом аспекте необходимость специальной подготовки и проблемы, связанные со сбором суточной мочи для определения 5-ГИУК, ограничивают практическое использование этого маркера.

Гистамин (-имидазолилэтиламин) является одним из важнейших медиаторов, который образуется при ферментативном декарбоксилировании аминокислоты гистидина. Его биологическое действие опосредуется тремя различными рецепторами (H1, H2, H3), локализующимися на поверхности клеточной мембраны. В организме гистамин присутствует во всех тканях, при этом его основным депо являются метакроматические гранулы тучных клеток и базофилов, где он находится в неактивном связанном состоянии. В желудке гистамин продуцируется энтерохромаффиноподобными клетками (ECL-клетками) которые составляют 35% нейроэндокринных клеток желудка здорового человека. Гистамин ECL-клеток обеспечивает паракринную стимуляцию секреции соляной кислоты париетальными клетками желудка. В меньших количествах он обнаружен в печени, почках, клетках кишечника. Являясь медиатором аллергических реакций быстрого типа, гистамин определяется в высоких концентрациях в основном на начальных стадиях анафилактических кризов. Как и некоторые другие медиаторы, гистамин опосредует не только клинические симптомы анафилаксии, но также индуцирует серию эффектов, направленных на ингибирование анафилактических реакций. Избыток гистамина в крови быстро исчезает в процессе метаболизма. В норме концентрация гистамина в плазме крови составляет 0,2-1,0 нг/мл, а с мочой экскретируется 5-56 мкг/сутки. Гиперэкспрессия гистамина характерна для НЭО преимущественно передней кишки, при этом клинически секреция этого амина проявляется зудом, кожными реакциями, приливами, дуоденальными язвами [39].

Вазоактивный интестинальный полипептид (ВИП) - полипептид, состоящий из 28 аминокислотных остатков, является нейромедиатором и паракринным регулятором клеток ЖКТ. Подобно другим гастроинтестинальным пептидам, ВИП синтезируется в виде молекулы-предшественника с сигнальной пептидной последовательностью, содержащей 22 аминокислоты, которая процессируется до активной формы, содержащей 28 аминокислот. Идентифицированы также несколько других пептидов – продуктов экспрессии гена, кодирующего ВИП, функция которых не выяснена. Известно только, что один из этих продуктов (пептид гистидинизолейцин), так же, как и ВИП, стимулирует секрецию жидкости в тонкой кишке. Эффекты ВИП опосредованы двумя специфическими рецепторами, которые принадлежат к уникальному классу рецепторов, сопряженных с G-белком [28]. Впервые ВИП был выделен из стенки толстой кишки. Максимальное его количество экстрагируется из тонкой и толстой кишки. Обнаружен ВИП также в нервах кишечника и в нейронах центральной нервной системы, что указывает на роль этого пептида в нейротрансмиссивных процессах, помимо его основной роли в регуляции деятельности ЖКТ. ВИП обладает наиболее выраженным среди гастроинтестинальных гормонов сосудорасширяющим и гипотензивным действием. В пищеварительной системе ВИП ингибирует секрецию соляной кислоты, регулируемую гастрином и гистамином; ингибирует секрецию пепсина и способствует релаксации гладкой мускулатуры желудка. Он также стимулирует секрецию воды и электролитов в тонкой кишке и образование желчи.

Уровень ВИП в плазме крови в норме достаточно низкий (не превышает 200-300 пг/мл) и не изменяется после приема пищи [76]. В то же время известно об усилении секреции ВИП при некоторых воспалительных заболеваниях кишечника, сопровождающихся осмотической (целиакия, мальабсорбция глюкозы, нарушение толерантности к лактозе) или секреторной (энтериты, вызванные *E. Coli* и *V.cholerae*, целиакия, гипертиреоз, мальабсорбция желчных солей после резекции подвздошной кишки) диареей. Определение концентрации ВИП в плазме крови имеет важное значение для подтверждения синдрома ВИПомы, который впервые был описан в 1958г. Вернером и Моррисоном. Диагностика синдрома Вернера-Моррисона (панкреатическая холера) – тяжелой, иногда смертельной диареи, достигающей 10 л в день, с гипокалиемией и гипохлоридрией, обезвоживанием, похуданием, представляет собой сложную проблему. ВИП продуцируется ВИПомы – функционирующими НЭО из островковых клеток ПЖ (до 90%); описаны также опухоли с гиперсекрецией ВИП, локализующиеся вне ПЖ (в тонкой кишке, надпочечниках, средостении, легких, печени, симпатических ганглиях). Панкреатические ВИПомы почти всегда злокачественные (в 80% метастазируют в печень), тогда как экстрапанкреатические имеют доброкачественный характер. Концентрация полипептида в плазме крови при ВИПоме достигает высоких значений. Биохимическим признаком ВИПомы является концентрация ВИП более 800 пг/мл. При выраженной диарее иной этиологии его секреция превышает нормальную (>300 пг/мл), но не достигает уровней, характерных для ВИПомы. Измерение концентрации ВИП используется для скрининга ВИП-секретирующих опухолей, для выявления скрытых метастазов, а также для осуществления мониторинга и оценки эффективности хирургического или лекарственного лечения [28, 49,60,76]. Необходимо отметить лабильность молекулярной структуры ВИПа, время полужизни которого в циркуляторном русле составляет 1 минуту, что требует соблюдения определенных преаналитических и аналитических условий при его определении на основе иммуноферментного анализа.

Соматостатин (СС) – пептидный гормон дельта-клеток островков Лангерганса ПЖ, а также один из гормонов гипоталамуса. Соматостатин был идентифицирован в 1973 году при выделении из экстрактов гипоталамуса как полипептид, проявляющий ингибирующий эффект на секрецию гипофизарного гормона роста. Впоследствии были описаны многие центральные эффекты соматостатина, хотя данные литературы носят противоречивый характер. СС существует в двух биологически активных формах, происходящих от одного предшественника – SST-14 и SST-28 (14 и 28 N-концевых аминокислотных остатков, соответственно). В ЦНС и ПЖ преобладает СС-14, в тонкой кишке преобладает СС-28. Эффекты СС опосредованы, по крайней мере, 6 рецепторами с 7 трансмембранными доменами, которые относятся к семейству рецепторов, сопряженных с G-белком. Эти рецепторы, за исключением sst2, кодируются разными генами, в то время, как sst2A и sst2B являются сплайсинг-вариантами одного и того же гена. Рецепторы соматостатина подразделяются на 2 группы (SRIF 1 – sst2, sst3, sst5) и SRIF2 (sst1, sst4) – на основании связывания с классическими октапептидными и гексапептидными аналогами соматостатина (октреотид, лантреотид, сеглитид, вапреотид) – с ними легко связываются SRIF 1 рецепторы, но не SRIF2-рецепторы. Высокоаффинные рецепторы СС обнаруживаются в большей части аденом гипофиза, секретирующих гормон роста, в большинстве метастатических НЭО поджелудочной железы, и в карциноидах, а также в нефункционирующих НЭО [14]. Основная функция СС в ЖКТ заключается в паракринной регуляции активности островковой ткани ПЖ и ЖКТ. В норме СС тормозит выделение, но не синтез гормона роста и тиреотропного гормона в гипофизе, в ЖКТ он угнетает секрецию гастрина, энтеро글укагона, мотилина, нейротензина, бомбезина, секретина, холецистокинина, ВИП, в ПЖ – инсулина, глюкагона, ПП, ИФР-1. Одновременно с этим СС угнетает желудочную секрецию, секрецию панкреатических ферментов и бикарбонатов, снижает скорость кровотока в сосудах ЖКТ, замедляет прохождение содержимого по кишечнику, блокирует всасывание воды, электролитов, нутритивных факторов в кишечнике [22]. В норме концентрация СС в сыворотке крови редко превышает 80-100 пг/мл. У больных соматостатиномой (опухоль островкового аппарата ПЖ, состоящая из дельта-клеток) выявляется повышенное содержание СС в плазме крови (>800-1000 пг/мл), уровень инсулина и глюкагона резко снижен (выявляется умеренный сахарный диабет без значительной гипергликемии и кетоза). У больных инсулинзависимым типом сахарного диабета наблюдается гипертрофия дельта-клеток, что указывает на их повышенную функциональную активность, и, соответственно, может повышаться

концентрация СС в плазме крови. Соматостатиномы – редкие типы НЭО, локализующиеся в поджелудочной железе или тонком кишечнике (чаще в 12-перстной кишке около Фатерова соска), и могут быть составляющей синдрома фон Реклингаузена. Панкреатические соматостатиномы обычно больших размеров и в 70-92% случаев дают метастазы на момент постановки диагноза. Клинические проявления синдрома соматостатиномы с распространенным ингибирующим эффектом СС включают умеренный сахарный диабет, холелитиаз, диарею и стеаторею, гипохлоргидрию, боли в брюшной полости, потерю массы тела и анемию. Как правило, концентрации циркулирующего СС при соматостатиноме поджелудочной железы достигают высоких значений [1]. Инсулин – гормон бета-клеток островков Лангерганса ПЖ. Инсулин представляет собой белок, состоящий из 51 аминокислоты, образующих две полипептидные цепи, соединенные дисульфидным мостиком – А-цепь (21 аминокислота) и В-цепь (30 аминокислот). Инсулин образуется в процессе протеолиза проинсулина в эквимолярных количествах с С-пептидом. Его действие опосредуется рецепторами поверхностной мембраны клеток-мишеней и проявляется паракринными и эндокринными эффектами. Паракринным путем инсулин ингибирует секреторную активность альфа-клеток островков Лангерганса. В свою очередь эндокринная активность инсулина оказывает влияние главным образом на печень, мышечную и жировую ткани. Так, в печени инсулин стимулирует анаболические процессы, усиливая синтез и депонирование гликогена, при одновременном ингибировании катаболических процессов. В мышцах инсулин активирует синтез гликогена и белка, усиливая транспорт глюкозы в мышечные клетки. В жировой ткани гормон стимулирует запасание триглицеридов. Базальная концентрация инсулина в сыворотке крови не превышает 30 мкЕд/мл (1,2 нг/мл). С-пептид состоит из 31 аминокислоты, биологически неактивен, имеет большой период полужизни, что обеспечивает ему более высокую стабильность по сравнению с инсулином, поэтому при ряде клинических ситуаций определение Спептида приобретает решающее значение. Базальный уровень С-пептида в сыворотке крови составляет 1,0-4,5 нг/мл [6]. Инсулинома была первой эндокринной опухолью поджелудочной железы, которая была описана в виде отдельных клинических наблюдений почти 100 лет назад. Для инсулиномы типично длительное существование периодических гипогликемических приступов, со временем более частых и тяжелее протекающих. При этом симптомы гипогликемии обычно нарастают в течение нескольких часов, чаще развиваются ночью или рано утром натощак и провоцируются голоданием, физической нагрузкой и быстро купируются внутривенным введением глюкозы или приемом сахара внутрь. Единственным надежным дифференциально-диагностическим критерием служит демонстрация неадекватно (по отношению к уровню гликемии) высокого уровня инсулина в периферической плазме крови, взятой во время гипогликемии. Обычно для подтверждения диагноза инсулиномы у больного с типичным анамнезом и клиникой достаточно определить базальный уровень инсулина (натощак после ночного голодания) с одновременной регистрацией гликемии. При гликемии менее 2,2 ммоль/л любые измеримые количества инсулина в сыворотке крови (более 6-7 мкЕд/мл) подтверждают диагноз инсулиномы, т.к. секреция неопухолевыми β -клетками при этом полностью подавляется. При отсутствии базальной гиперинсулинемии должна быть проведена проба с голоданием. У 70-80% больных с инсулиномой гипогликемия развивается в течение первых суток голодания и за 72 часа - практически у всех. Следует также иметь в виду, что инсулин в сыворотке крови при инсулиноме очень редко превышает 200 мкЕд/мл и чаще значительно ниже этой величины; при более высоких уровнях инсулина можно предполагать его экзогенное введение. Наиболее важное значение имеет не абсолютный уровень инсулина в плазме, а его соотношение с уровнем глюкозы в крови. В норме соотношение инсулина и глюкозы всегда меньше 0,4, у пациентов с инсулиномой отношение уровня инсулина к глюкозе обычно превышает 1. При отсутствии клинической симптоматики диагноз гормонпродуцирующей инсулиномы сомнителен. Для подтверждения диагноза необходимо также определить уровень проинсулина и С-пептида в сыворотке крови. В норме концентрация проинсулина составляет 22% от концентрации иммунореактивного инсулина плазмы. При инсулиномах концентрация проинсулина составляет более 25% от концентрации иммунореактивного инсулина в сыворотке крови. Если концентрация проинсулина выше 50% концентрации инсулина, следует предполагать, что инсулинома является злокачественной, отличительной особенностью которой является мультисекреторная активность [1, 70]. Для диагноза инсулиномы требуется наличие комплекса факторов, выявленных при биохимическом обследовании пациентов. К таким основным лабораторным критериям относятся:

выраженная гипогликемия (глюкоза <2,2 ммоль/л) в сочетании с инсулинемией от 6 мкЕд/мл (36 пмоль/л) и выше, концентрацией С-пептида в сыворотке крови эквивалентной или выше 200 пмоль/л и уровнем проинсулина более 5 пмоль/л [1, 91].

Глюкагон – полипептид из 29 аминокислотных остатков, секретируемый альфа-клетками островков Лангерганса. Панкреатический глюкагон, наряду с несколькими другими пептидами образуется из более крупного предшественника преглюкагона. В L-клетках тонкой кишки и альфа-клетках панкреатических островков проглюкагон расщепляется тканеспецифичными прогормоноконвертазами на разные пептиды, которым принадлежит важная роль в метаболизме питательных веществ и в регуляции продукции СС, глюкагона и инсулина. Образующиеся биологически активные пептиды осуществляют свои эффекты, связываясь с рецепторами (сопряженными с G-белком), сходными с рецепторами глюкагона. При этом главной мишенью одного из глюкагонподобных пептидов ГПП-1 являются островковые клетки ПЖ, где он стимулирует продукцию и секрецию инсулина и СС и, наоборот, ингибирует секрецию глюкагона, а также препятствует деструкции бетаклеток и стимулирует их пролиферацию. Являясь антагонистом инсулина, глюкагон участвует в регуляции гликемии путем усиления секреции в ответ на понижение уровня глюкозы крови; попадая по портальной вене в печень, он стимулирует гликогенолиз, снижает утилизацию глюкозы и синтез гликогена, повышает глюконеогенез и образование кетоновых тел. Суммарным эффектом этих воздействий является увеличение мобилизации глюкозы из печени. В периферических тканях глюкагон оказывает липолитическое действие, снижает липогенез и синтез белка. Метаболизм глюкагона осуществляется печенью и почками. В норме базальный уровень (натощак) глюкагона в плазме крови составляет не более 75 пг/мл и не превышает 200 пг/мл при физиологической гипогликемии. Как и другие островковые НЭО, глюкагонома помимо гиперсекреции глюкагона и глюкагонподобных пептидов характеризуется множественной секреторной активностью. При глюкагономах может наблюдаться секреция таких пептидных гормонов, как инсулин, гастрин, VIP, ПП, СС, АКГ, ПТГ, меланоцитстимулирующий гормон, а также серотонина. Однако биохимическое подтверждение диагноза глюкагономы производится при выраженной гиперглюкагонемии (уровень гормона в плазме крови более 1000 пг/мл). Необходимо учитывать, что повышение концентрации глюкагона в плазме крови может наблюдаться при диабетическом кетоацидозе, почечной и печеночной недостаточности, сепсисе, длительном голодании, циррозе, синдроме Кушинга, но его секреция при этом не превышает 500 пг/мл [91]. Следует отметить, что глюкагонома является практически единственной эндокринной опухолью ПЖ, патогномоничные признаки которой позволяют устанавливать диагноз по клинической картине [1]

Гастрин – полипептидный гормон ЖКТ, регулирующий секрецию соляной кислоты париетальными клетками дна желудка и пролиферацию клеток слизистой оболочки. Другими функциями гастрина является стимуляция выделения пепсиногена, внутреннего фактора, секретина, а также ферментов поджелудочной железой и желчи в печени. Кроме того, гастрин активирует моторику ЖКТ. Гормон вырабатывается специализированными G-клетками, рассеянными по слизистой оболочке почти всего пищеварительного тракта, которые в наибольшем количестве локализуются в антральном отделе желудка и двенадцатиперстной кишке. Экстраантральные клетки оказывают незначительный вклад в общую секрецию гастрина в норме. С момента выделения гастрина из ткани желудка в эксперименте в 1964г. и последующей характеристики его структуры и биологических свойств [31] потребовалось лишь несколько лет для создания тест-системы на основе РИА. Однако гастрин оказался непростой молекулой для его определения. Оказалось, что в циркуляторном русле он существует, по крайней мере, в пяти биологически активных формах: гастрин-71, гастрин-52, гастрин-34, или “большой” гастрин, гастрин-17 (составляет С-концевой участок пептидной цепи гастрина-34), гастрин-14, известный под названием “минигастрин” (рис.2). Идентифицированы также короткие гепта- и тетрапептидные амидированные фрагменты гастрина, кроме того все известные формы гормона могут находиться в сульфатированном и несulfатированном состоянии. При детальном изучении клеточного синтеза гастрина стало понятным, что в G-клетках вначале синтезируется высокомолекулярный белокпредшественник (прогастрин), включающий аминокислотную последовательность гастрина-34. В

результате его специфического ограниченного протеолиза образуется гастрин-34, а затем гастрин-17. Таким образом, как результат множественности этапов постоянно действующих путей его синтеза и протеолиза, гастрин секретируется G-клетками в виде гетерогенной смеси прогастрина и его производных. При этом в норме более 95% биологически активного гастрина находится в амидированном состоянии. В свою очередь в G-клетках гастрин-17 является доминирующей формой (85-90%), на долю гастрина-34 приходится 5-10% и около 5% представлено другими формами. В настоящее время установлено, что в норме гастрин-17 и гастрин-34 являются преобладающими формами, которые циркулируют как в сульфатированном, так и несulfатированном виде и их уровни в сыворотке крови примерно одинаковы, что обусловлено более медленным метаболическим клиренсом гастрина-34 [74].

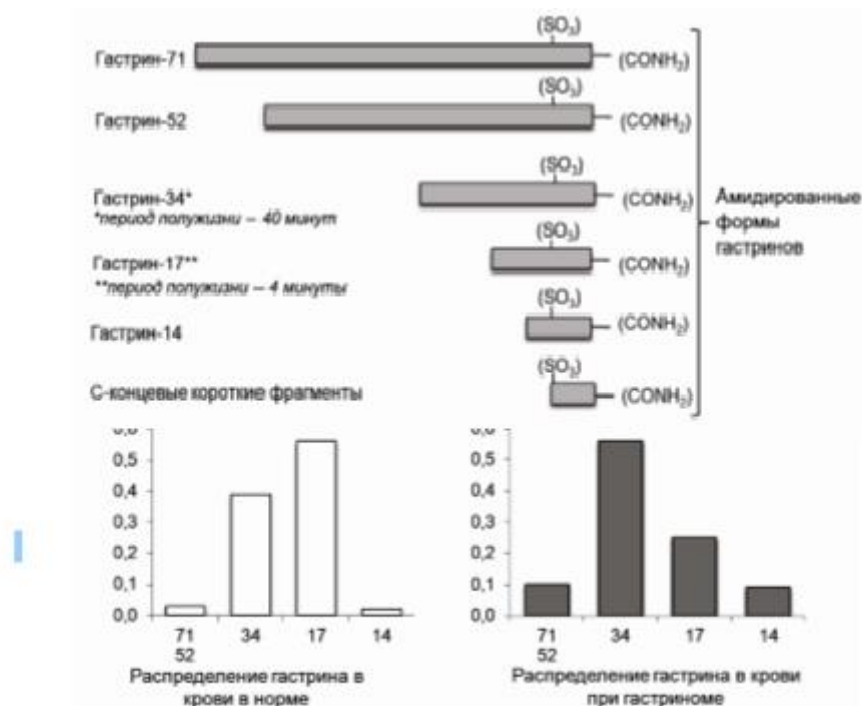


Рис 2. Молекулярные особенности циркулирующих гастринов.

Следует отметить, что в клетках гастриномы нарушены механизмы регуляции секреции гормона, что приводит к изменению соотношения форм гастрина в циркулирующей плазме крови. Гастриномы, являясь гастринсекретирующими опухолями двенадцатиперстной кишки или поджелудочной железы, характеризуются развитием синдрома Золлингера-Эллисона (гиперхлоргидрия и утолщение слизистой желудка) как результат избытка циркулирующего гастрина. В отличие от нормы, при гастриномах повышен уровень крупных молекулярных форм гастрина – гастрина-34 и гастрина-71. Причем уровень гастрина-34 значительно превышает уровень гастрина-17, который в сыворотке крови при гастриномах находится в низких количествах или практически отсутствует [74]. Такое нарушение секреции делает необходимыми диагностические методы, которые выявляют как крупные, так и малые формы гастрина с одинаковой чувствительностью. Тест-системы, которые измеряют лишь уровень гастрина-17, дают заниженные или непредсказуемые концентрации гастрина в сыворотке крови больных гастриномами. Как правило, общий уровень гастрина после ночного голодания у больных с синдромом Золлингера-Эллисона значительно превышает верхние референсные пределы (110-115 пг/мл), достигая многократно более высокие значения. В соответствии с рекомендациями Европейского общества по нейроэндокринным опухолям (2006г.) для диагностики гастриномы приоритетное значение имеют исследование гастрина и базальной кислотности желудочного сока. При соблюдении важнейших преаналитических факторов этих исследований, к которым относится длительное (более 12 часов) ночное голодание и перерыв в приеме антисекреторных препаратов в течение 1-4 недель, диагноз гастриномы подтверждается при уровне гастрина более 1000 пг/мл и pH<2,5. В противном случае требуется провокационная проба [91]. Определение концентрации гастрина в сыворотке крови играет важную роль в диагностике опухолей, секретирующих гастрин. Для больных гастриномами, при которых повышенный уровень гастрина приводит к гиперсекреции кислоты, характерна язвенная болезнь

агрессивного течения, развитие диареи и других тяжелых нарушений деятельности ЖКТ. В этом аспекте при обследовании больных НЭО необходимо использовать тест-системы для иммуно-ферментного анализа гастрина на основе антител как к мелким, так и крупным его молекулярным формам, что способствует более точной и своевременной детекции гиперсекреции этого гормона [75]. Один из таких методических подходов реализован на основе иммунохемилюминесцентного анализа, определяющего гастрин-17 и гастрин-34 [20]. Как следует из табл.6, в которой представлена характеристика различных методов определения гастрина, наилучшие показатели диагностической эффективности, рассчитанные по результатам определения гормона в сыворотке крови 27 пациентов с гастриномами и 13 – без опухолевого процесса, продемонстрировали лишь 5. При этом ни одна из тест-систем на основе ИФА не достигала требующейся для дифференциальной диагностики гипергастринемии чувствительности и специфичности. В то же время ИХЛА характеризовался сопоставимой с референсным методом определения гастрина на основе РИА (Euro-Diagnostica) диагностической эффективностью (соответственно 90% и 100%). Важным преимуществом этого метода является его автоматизация, обеспечивающая высокую точность и своевременность получения результата, что особенно важно при таком тяжелом гиперфункциональном синдроме, как гастринома. Однако недостаточная специфичность за счет повышенной аналитической чувствительности к сульфатированной форме гастрин-17 может приводить к завышению результата определения общего гастрин, что ограничивает применение ИХЛА при оценке умеренной гипергастринемии.

Таблица 6

Сравнительная характеристика различных методов определения гастрина					
Метод	Производитель	Специфичность к формам гастрин*	Референсный лимит	Рекомендации по использованию	Диагностическая эффективность
РИА	DiaSorin	Гастрин-17 (нс) Гастрин-17 (с) Гастрин-34 (нс)	< 108 пг/мл	Диагностика ГГ	60%
	DRG Diagnostics	Гастрин-17 (нс) Гастрин-17 (с) Гастрин-34 (нс)	< 111 пг/мл	Диагностика ГГ	90%
	Euro-Diagnostica	Гастрин-17 (нс) Гастрин-17 (с) Гастрин-34 (нс)	< 128 пг/мл	Диагностика ГГ	100%
	MP Biomed	Гастрин-17 (нс) Гастрин-17 (с) Гастрин-34 (нс)	< 111 пг/мл	Диагностика ГГ	95%
	Peninsula	Гастрин-17 (нс) Гастрин-34 (нс)		Для научных исследований	75%
	Phoenix RIA	Гастрин-17 (нс) Гастрин-34 (нс)		Диагностика ГГ (с экстракцией)	40%
	Siemens RIA	Гастрин-17 (нс) Гастрин-17 (с) Гастрин-34 (нс)	< 90 пг/мл	Диагностика ГГ	95%
ИФА	Biohit	Гастрин-17 (нс)		Диагностика ГГ	60%
	Correlate	Гастрин-14 (нс) Гастрин-17 (нс) Гастрин-17 (с) Гастрин-34 (нс)		Для научных исследований	
	Phoenix EIA	Гастрин-17 (нс) Гастрин-34 (нс)		Диагностика ГГ	75%
	US Biological	Гастрин-17 (нс)		Для научных исследований	55%
ИХЛА	Siemens, Immulite 2000	Гастрин-17 (нс) Гастрин-17 (с) Гастрин-34 (нс) Гастрин-34 (с)	< 115 пг/мл	Диагностика ГГ	90%

* нс – несульфатированная форма, с – сульфатированная форма.

В то же время появляются и другие методические подходы к оценке гастринемии. Однако проблемы вариабельности получаемых результатов при определении гормона на основе доступных в настоящее время тест-систем существенно затрудняют применение гастрин в диагностике гастриномы [30, 78].

Кальцитонин (КТ) – пептидный гормон из 32 аминокислот с молекулярной массой 3500Да, секретируемый в основном парафолликулярными или С-клетками щитовидной железы. Его физиологическая роль в регуляции фосфорнокальциевого обмена хорошо изучена у животных, но место в поддержании фосфорного гомеостаза в организме человека, однако, остается не определенным. Более того, не наблюдалось изменений метаболизма фосфора или костного ремоделирования при отсутствии КТ (после тиреоидэктомии) или при его высоких уровнях у больных медуллярным раком щитовидной железы. Рецепторы к КТ обнаруживаются во многих тканях (мозг, легкие, лимфоидные клетки), однако роль этого гормона до сих пор остается неизвестной. Циркулирующие формы КТ очень гетерогенны, при этом помимо биологически активного мономера в крови присутствуют многие предшественники с различными молекулярными характеристиками (прокальцитонин), димеры или агрегаты, также определяющиеся совместно с кальцитонином при проведении ИФА. У лиц без патологии щитовидной железы базальный уровень КТ, как правило, составляет менее 20 пг/мл. Кальцитонин является важнейшим маркером в диагностике и мониторинге медуллярного рака щитовидной железы (МРЩЖ). Причины повышения уровней КТ, не связанные с наличием МРЩЖ, могут быть разнообразны. Первые методы РИА кальцитонина выявляли повышение уровней КТ при раке легких, предстательной и молочной железы, но в дальнейшем эти наблюдения не подтвердились. Помимо МРЩЖ, другие эндокринные опухоли, в частности, НЭО легких и ЖКТ, также могут секретировать предшественники гормона и КТ [27]. Таким образом, КТ можно рассматривать как маркер НЭО переднекишечного происхождения. Среди других причин гиперкальцитонинемии можно назвать гипергастринемии, ХПН, псевдогипопаратиреоз, гиперплазию С-клеток. Следует с осторожностью подходить к интерпретации результатов КТ у инфицированных пациентов, т.к. в иммунологическую реакцию соответствующей тест-системы может вступать прокальцитонин (предшественник КТ, состоящий из 166 аминокислот), что приводит к существенному завышению результатов исследования. При этом секреция прокальцитонина при сепсисе и тяжёлых бактериальных и паразитарных инфекциях осуществляется не С-клетками ЩЖ, т.к. обнаруживается даже после тиреоидэктомии; при МРЩЖ, напротив, С-клетки секретируют прокальцитонин. В то же время важность своевременной диагностики МРЩЖ обуславливает продолжающиеся исследования КТ в качестве диагностического и прогностического критерия. Показано, что базальный уровень КТ, превышающий 100 пг/мл, является практически 100% диагностическим фактором при МРЩЖ. Кроме того, КТ рассматривают не только как маркер диагностики. Выявлена зависимость его уровней от размера опухоли и наличия метастазов, что обеспечивает прогностическое значение этому гормону [91].

Синаптофизин – это трансмембранный гликопротеин с молекулярной массой 38 кДа, выделенный из нейронов головного и спинного мозга, а также сетчатки глаза. С тех пор, как в 1986 г. синаптофизин был обнаружен в нейроэндокринных клетках и соответствующих опухолях, исследование его экспрессии входит в гистологическую характеристику НЭО [15]. Несмотря на то, что синаптофизин был первым клонированным белком синаптических пузырьков, его функция остается до конца неясной по сравнению с идентифицированными значительно позже другими синаптическими белками. Так, один из трансмембранных гликопротеинов синаптических везикул и секреторных гранул синаптотагмин играет ведущую роль в процессах освобождения нейротрансмиттеров путем экзоцитоза. Он относится к кальцийсвязывающим белкам и его активатором является внутриклеточный Ca^{2+} . Амфифизин вовлечен в процессы эндоцитоза и требуется для эффективного восстановления синаптических пузырьков, а также для других трансмембранных эффектов [16]. Первоначально роль синаптофизина ограничивалась образованием синаптических пузырьков и экзоцитозом. Последующими исследованиями было показано, что в мембранах синаптических пузырьков синаптофизин подобно синаптотагмину проявляет свойства Ca^{2+} -связывающих белков. Синаптофизин вовлечен в многочисленные процессы эндо- и экзоцитоза, включая образование каналов в мембранах, инициирующих высвобождение нейротрансмиттеров и биогенез синаптических

пузырьков [17]. Функция синаптофизина в опухолевых клетках не установлена, однако работами разных авторов показано, что клетки рака легкого и, в частности, МРЛ способны продуцировать нейротрансмиттеры (серотонин, ацетилхолин), которые при их высвобождении проявляют аутокринную активность [18, 19]. Более того, клетки МРЛ экспрессируют множество функциональных синаптических белков. Этот факт позволяет сделать предположение о том, что синаптофизин в опухолевых клетках также ассоциирован с экзоцитозом микропузырьков, подобных синаптическим и имеющим непосредственно опухолевое происхождение [20]. Необходимо отметить, что в настоящее время синаптофизин представляет собой один из наиболее специфических маркеров нейроэндокринных клеток, однако до последнего времени его определение в крови затруднено в связи с отсутствием надежной тест-системы на основе стандартного иммуноферментного анализа. Клиническое значение этого белка в основном рассматривается в рамках паранеопластических синдромов, ассоциированных с опухолями нейроэндокринной природы и, прежде всего, МРЛ, одним из патогенетических механизмов которых является образование аутоантител к охарактеризованным выше синаптическим белкам.

Н-концевой мозговой На-уретический пропептид (NT-proBNP) – маркер ассоциированного с НЭО специфического поражения миокарда, развивающегося у 35-60% пациентов с метастатическим карциноидом. Карциноидная болезнь сердца (КБС) в качестве первого проявления карциноидной опухоли наблюдается у 20% больных, являясь при этом причиной смерти в 30-35% случаев. КБС обычно развивается при карциноидах, метастазирующих в печень, и обусловлена высоким содержанием в крови серотонина, брадикинина и других биологически активных веществ, метаболизм которых в печени значительно нарушен в связи с ее поражением при сопутствующем снижении их инактивация в легких и головном мозге. Существуют экспериментальные и клинические доказательства того, что серотонин играет ключевую роль в развитии фиброза сердца. Высокий уровень серотонина в сыворотке крови больных НЭО (> 1000 нг/мл) считается основным предрасполагающим фактором для развития КБС [91]. Кроме того, высокий риск повреждения миокарда сопряжен с длительной экспозицией гиперэкскреции с мочой 5-ГИУК (> 75 мг/сутки или >400 мкмоль/сутки) [57]. В этом аспекте назначение терапии, способствующей снижению уровня серотонина в сыворотке крови больных НЭО, является важным компонентом терапевтической тактики. Мониторинг секреции серотонина и экскреции 5-ГИУК как факторов фиброза помогает в оценке эффективности лечения НЭО аналогами соматостатина, которые снижают фиброз. Как отмечалось выше, ассоциированный с серотонином карциноидный кардиофиброз представляет собой хронический процесс, сопровождающийся накоплением в интерстициальных клетках клапанов актина, а также усилением биосинтеза коллагена и глюкозаминогликанов в результате нарушения регуляции TGF- β [94]. Повышенная чувствительность интерстициальных клеток клапанов сердца к серотонину обосновывает необходимость мониторинга концентрации биогенного амина в сыворотке крови больных НЭО. Известно, что у больных с карциноидной кардиопатией наличие ее эхографических признаков коррелирует с уровнем серотонина. В то же время в алгоритм обследования пациентов с карциноидами для своевременного выявления КБС должен также входить биохимический маркер кардиофиброза, которым является мозговой натрийуретический пептид. Мозговой натрийуретический пептид (brain natriuretic peptide – BNP) получил свое название в связи с тем, что впервые был обнаружен в мозгу животных. У человека этот пептид синтезируется кардиомиоцитами и кардиальными фибробластами всех камер сердца, при этом его основным источником является левый желудочек, миокард которого превалирует над массой миокарда других камер сердца. Стимулирующими факторами для высвобождения BNP являются растяжение стенки миокарда и повышение внутрисердечного давления в предсердиях и желудочках, а также ишемия миокарда. Основные эффекты BNP (усиление натрийуреза и диуреза, вазодилатация, снижение АД, подавление секреции ренина и альдостерона) осуществляются посредством специфических рецепторов, имеющих в мозге, сосудах, надпочечниках, почках и легких. BNP относится к семейству натрийуретических пептидов, которые были идентифицированы около 30 лет назад и охарактеризованы как гормоны, секретируемые предсердием (атриальный натрийуретический пептид), желудочком (мозговой натрийуретический пептид) и эндотелиальными клетками сосудов (С- натрийуретический пептид). Несмотря на разную генетическую детерминированность, пептиды

имеют общую кольцевую структуру из 17 аминокислот, сформированную дисульфидными мостиками, которая необходима для проявления биологической активности в виде диуретических, натрийуретических и гипотензивных эффектов (рис.3).

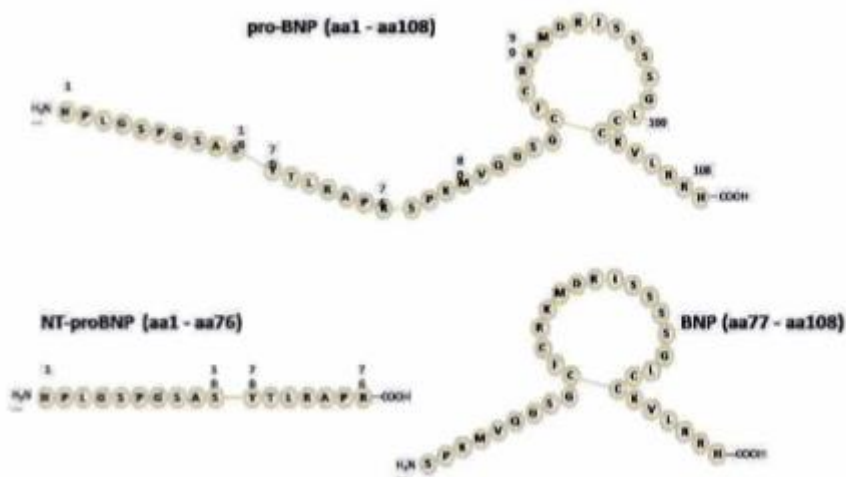


Рис. 3. Молекулярные формы циркулирующего в крови мозгового натрийуретического пептида

Как следует из табл.7, предсердный и мозговой натрийуретические пептиды вначале синтезируются как прогормоны, которые под воздействием разнообразных факторов и стимулов расщепляются с образованием соответствующих гормонально активных С-концевых фрагментов ANP и BNP, оказывающих регулирующее влияние на сердечно-сосудистую, мочевую и эндокринную системы. При этом в циркуляторном русле в эквивалентных количествах присутствуют также и соответствующие N- концевые неактивные фрагменты, а также другие более мелкие пептиды, проявляющие разнообразные аутокринные и паракринные эффекты.

Таблица 7

Характеристики натрийуретических пептидов					
	ANP	NT-proANP	BNP	NT-proBNP	CNP
Аминокислоты	28	98	32	76	22
Молекулярная масса (дальтон)	3082	10615	3465	8457	2199
Синтез	предсердия (частично желудочки, ткани мозга, легкие, почки)		предсердия, желудочки		эндотелий сосудов, эпителий канальцев почек
Биологическая активность	натрийуретический и диуретический эффект, снижение уровня альдостерона		натрийуретический и диуретический эффект, регуляция ренин-ангиотензиновой системы	не проявляет	вазодилатация
Период полувыведения (мин.)	3-4	60	20	60-120	-
Концентрация (средняя) в сыворотке крови практически здоровых людей (пмоль/л)	20	140	6,5	15	8

Установленные теоретические предпосылки, касающиеся участия натрийуретических пептидов в патофизиологии сердечно-сосудистой системы, явились основой для их использования в клинической практике. При этом в соответствии со своими молекулярно-биологическими особенностями мозговой по сравнению с предсердным пептидом оказался более чувствительным и специфичным показателем нарушения функции сердца. В частности, повышение уровня BNP в сыворотке крови позволяет выявить у пациентов дисфункцию левого желудочка раньше, чем по появлению клинико-инструментальных признаков, включая начальные изменения на эхокардиограмме. Это прежде всего обусловлено тем, что его N-концевой неактивный фрагмент (NT-proBNP), накапливающийся в специфических гранулах кардиомиоцитов и находящийся в норме в эквиволярных с BNP концентрациях, при нарастании дисфункции левого желудочка секретируется в кровь с последующим значительным превышением соответствующего уровня функционально

активного пептида. Обладая более продолжительным периодом полувыведения из системы кровообращения, NT-proBNP оказался наиболее стабильной молекулярной структурой для определения на основе ИФА в качестве биохимического маркера сердечной недостаточности. В последние годы получены также подтверждения наибольшей точности NT-proBNP в диагностике КБС по сравнению с предсердным натрийуретическим пептидом, о высокой диагностической чувствительности которого свидетельствует его почти 100% повышение в сыворотке крови пациентов с карциноидом и клиническими признаками кардиофиброза [42, 98]. Таким образом, охарактеризованные выше наиболее важные биохимические маркеры НЭО, а также связанные с гиперпродукцией биологически активных соединений симптомы и синдромы отражают существующее представление о том, что НЭО представляют собой наиболее разнородную группу неоплазий, сложную в диагностическом отношении в соответствии с их клиническими и биологическими особенностями. С учетом гормональной активности опухоли и сопутствующим ей клиническим проявлениям НЭО делятся на функционирующие и нефункционирующие. Функционирующие опухоли составляют примерно 60% и включают в себя такие клинические состояния, как синдром Золлингера-Эллисона, синдром Вернера-Моррисона, гипогликемию, глюкагономы и др. В табл.8. представлены обобщенные рекомендации по использованию биохимических маркеров с учетом имеющихся клинических признаков, синдромов и типа НЭО [1, 55, 62, 65, 73, 91].

Таблица 8

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

Изучению клинического значения определения биохимических маркеров НЭО посвящены работы многочисленных авторов, анализ которых в обобщенном варианте представлен ниже.

Клиническое значение определения биохимических маркеров нейроэндокринных опухолей

Как уже отмечалось, в целом как группа опухолей, НЭО характеризуются общими клинко-биологическими признаками, но в то же время имеют уникальный набор биохимических факторов, определяющих их ауто- и паракринные свойства и функциональные особенности. Следует отметить, что биохимическая идентификация типа эндокринных опухолей стала возможной после разработки в шестидесятые годы прошлого столетия радиоиммунного, а затем иммуноферментного методов определения концентрации гормонов, продуцируемых ПЖ, что позволило выявлять функционирующие НЭО. Однако потребовались десятилетия до реального внедрения в клиническую практику охарактеризованных в первом разделе пептидов, гормонов и биогенных аминов в качестве маркеров НЭО. В соответствии с современными представлениями о молекулярнобиологических особенностях НЭО, а также имеющейся методической базы, Европейским обществом по НЭО (ENETS) были разработаны рекомендации по стандартизации обследования

больных. Необходимо отметить особое место ХгА в группе общих маркеров, обладающего в отличие от других биологически активных соединений наилучшим сочетанием диагностической чувствительности и специфичности, что делает его основным маркером НЭО, и анализ которого входит в алгоритм обследования больных НЭО в качестве обязательного показателя [65].

Повышение эффективности биохимической диагностики НЭО может быть достигнуто при расширении спектра исследуемых маркеров, как общих, так и специфических, в соответствии с типом опухоли и имеющейся у больного клинической картиной: I. Карциноидный синдром: ХгА, серотонин, и/или 5-ГИУК; II. Гастроэнтеропанкреатические опухоли: ХгА, гастрин, глюкагон, инсулин, проинсулин, С-пептид, панкреатический полипептид, вазоактивный интестинальный пептид, соматостатин, гистамин, АКТГ, СТГ, тахикинины, и субъединицы ХГ; III. НЭО легких и средостения: ХгА, кальцитонин, ПТГ, НСЕ, СТГ, гистамин, проинсулин, АКТГ; IV. Феохромоцитома: ХгА, основные катехоламины (адреналин, норадреналин), метаболиты катехоламинов (метанефрин, норметанефрин); V. Опухоли гипофиза: ХгА, пролактин, ЛГ, ФСГ, эстрадиол, тестостерон, ТТГ, свободные Т3 и Т4; VI. АКТГ-эктопический синдром: ХгА, АКТГ, кортизол.

В соответствии с рекомендациями ENETS ХгА является обязательным маркером биохимического обследования больных в целях диагностики, мониторинга и прогноза НЭО. ХгА характеризуется высокой диагностической чувствительностью при НЭО желудка (95%), которая достигает 100% при гастриномах, подвздошной кишки (80%), синдроме множественных эндокринных неоплазий (78%), бронхо-легочной системы (70%), при этом в различных исследованиях была выявлена зависимость ХгА от распространенности процесса. Особое значение определение маркеров приобретает при отсутствии гиперфункциональных синдромов: диагностическая чувствительность комплексного определения ХгА и панкреатического полипептида достигает 90-95% у больных с нефункционирующими НЭО поджелудочной железы. Самые высокие концентрации ХгА в плазме наблюдаются у пациентов с НЭО тонкой кишки, которые обычно ассоциированы с карциноидным синдромом. В различных исследованиях была показана связь уровня ХгА с распространением заболевания, опухолевой массой и наличием метастазов. Получены убедительные доказательства значительного увеличения уровня маркера у пациентов с прогрессирующим заболеванием или с метастазами в печени по сравнению с локализованным процессом [35]. О высокой диагностической чувствительности ХгА свидетельствует повышение его уровня в плазме крови до клинической манифестации рецидива у пациентов с НЭО средней кишки после радикального удаления опухоли. Примечательно, что уровень маркера повышался задолго до обнаружения прогрессии на КТ или МРТ [95]. ХгА является ранним маркером карциноидных опухолей передней и задней кишки [54, 55]. Если не доказана другая причина, повышение ХгА в плазме крови следует рассматривать как биохимическое проявление НЭО. Концентрация уровня ХгА может использоваться для оценки проводимого лечения. При этом, снижение уровня маркера более чем на 80% после циторедуктивных операций связано с ослаблением симптомов и улучшением контроля заболевания и прогноза. В табл. 9 систематизированы результаты исследования ХгА при различных типах НЭО, полученные разными авторами в период с 1998г. по настоящее время на основе иммуноферментного анализа при использовании тест-системы DAKO, что сделало возможным сравнительный анализ данных. Согласно представленным данным, наибольшие медианы уровней ХгА были характерны для пациентов с распространенными формами НЭО и рецидивами заболевания. Анализ данных других авторов, выполненный на основе средних значений, продемонстрировал выраженную вариабельность значений ХгА с наиболее высокими уровнями при синдроме Золлингера-Эллисона и рецидивах НЭО. Повышенные уровни ХгА описываются также и при впервые выявленных НЭО, в том числе при НЭО поджелудочной железы, кишки, желудка, спорадических карциноидах. В то же время хорошо прослеживается снижение как средних значений, так и медиан в группах после хирургического или химиотерапевтического лечения, что демонстрирует возможности ХгА как маркера для мониторинга эффективности лечения.

Таблица 9

Уровни ХгА (Ед/л) в плазме крови больных НЭО в зависимости от типа и распространенности опухоли (тест-система «Dako»)					
Группа	N	Медиана (квартилы)	Среднее±SD	Интервалы	Авторы
Карциномы					
Спорадические карциномы	29	90 (42,6-551,0)			Peracchi M. et al., 2003
Карциномы (рецидивы)	48	96,0	173,4		Pirker R. et al., 1998
Карциномы (после лечения)	28	15,7	10,3		Pirker R. et al., 1998
Гастроинтестинальные карциномы с метастазами	31			>100Sciola	V. et al., 2009
Атрофическим гастритом с карциномами	9	58,1 (44,5-65,3)			Peracchi M. et al., 2005
НЭО различных типов					
НЭО легкого	20		46,3±94,6		Campana D. et al., 2007
НЭО желудка	14		78,0±69,2		
НЭО поджелудочной железы	94		322,2±952,7		
НЭО поджелудочной железы	32	93,4 (25,5-300,0)			Massironi S. et al., 2009
НЭО кишечника	85		380,1±1224,9		Campana D. et al., 2007
Синдром множественной эндокринной неоплазии 1 типа	25	35,3 (21,0-239)			Peracchi M. et al., 2003
НЭО с учетом течения заболевания					
ГЭП НЭО: впервые выявленные	81	67 (27-215)	349,2±1020,6	5-8170	Zafar M. C. et al., 2007
ГЭП НЭО: рецидив	27	104 (41-476)	364,6±1441,7	7-3018	
ГЭП НЭО: стабилизация	49	30 (15-171)	160,5±375,5	5-2489	
ГЭП НЭО: ремиссия	45	15 (15-24)	19,0±14,1	5-66	
ГЭП НЭО: без метастазов в печени	22	65 (28-234)	256,8±449,4	5-1798	
ГЭП НЭО: с метастазами в печени	39	219 (95-562)	515,2±773,2	8-3300	
НЭО с синдромом Золлингера-Эллисона	25		1490,5±3819,3		Campana D. et al., 2007
НЭО (рецидив или метастазы)	106	84,8	1528,5±9104,6	1,7-92520	
Пациенты с НЭО до лечения октреотидом	38	146		18-8610	Massironi S. et al., 2010
Пациенты с НЭО после лечения октреотидом	38	66		10-8535	
Другие опухоли					
Гепатоцеллюлярная карцинома	30	44,5 (21-145,9)			Massironi S. et al., 2009
Аденомы гипофиза	46	12,7 (10,0-19,3)			Peracchi M. et al., 2003

В табл. 10 представлена информация, касающаяся исследования диагностической эффективности ХгА как маркера НЭО по данным работ авторов, использующих тест-систему «Dako». В таблице приведены предлагаемые различными авторами пороговые значения, рассчитанные по результатам определения ХгА в плазме крови практически здоровых людей, а также пациентов с воспалительными и эндокринологическими заболеваниями.

**Диагностическая чувствительность и специфичность ХгА
по данным разных авторов с учетом пороговых уровней, полученных
при использовании тест-системы «Дако»**

Группы (n)	Пороговое значение ХгА (Ед/л)	Чувствительность(%)	Специфичность(%)	Авторы
Контрольная группа (103) * Пациенты с НЭО (127): НЭО с МТС:	34,7	67,9 64,7-80,0	85,7 85,7	Bajetta E. et.al., 1999
Пациенты с НЭО (123): ГЭП-НЭО:	18	81 86	56 56	Stivanello M. et.al., 2001
Контрольная группа (28) Больные НЭО (80): Больные НЭО до резекции: Карциномы: Нефункционирующие НЭО ПЖЖ: Функционирующие НЭО ПЖЖ:	17	56,3 84,9 58,8 57,1 50,0	100 100 100 100 100	Tomassetti P. et.al., 2001
Контрольная группа (35) Пациенты с НЭО (63) НЭО ранних стадий: НЭО поздней стадий:	34	55 43 57	94 93 100	Cimitan M. et. al., 2003
Контрольная группа (50) Пациенты с НЭО (61) Группа сравнения, включая пациентов с гиперпаратиреозом и опухолями гипофиза (131): Пациенты с НЭО (61)	20 100	92 47	83 99	Peracchi M. et.al., 2003
НЭО после хирургического лечения (27): Пациенты с впервые выявленными ГЭП-НЭО (68) Функционирующие: Нефункционирующие: Ограниченное заболевание: Распространенное заболевание: НЭО поджелудочной железы: Гастроинтестинальные НЭО:	22	84 96 75 80 89 74 68	89 89 89 89 89 89 89	Panzuto F. et.al., 2004
Контрольная группа (48): Пациенты с НЭО (238): Пациенты с хроническим атрофическим гастритом (42): Пациенты с НЭО (238): Ограниченные НЭО: Диффузные НЭО:	19 54 282	85,3 66,5 71,1	95,8 71,4 78,8	Campana D. et.al., 2007
Контрольная группа (129) Впервые выявленные НЭО (202) НЭО без метастазов: НЭО с метастазами:	16 67,3	84,0 63,3	85,3 71,4	Zatelli M.C. et. al., 2007
Пациенты с удаленными карциномами: Пациенты с рецидивами и/или метастазами карциномов:	30,3	91,7	96,4	Pirker R.A. et. al., 1998

* - Контрольная группа представлена практически здоровыми людьми (n)

Диагностическая чувствительность ХгА по данным разных авторов для впервые выявленных НЭО составила 55-85%, при специфичности метода от 56 до 100% относительно контрольных групп. При этом наибольшая чувствительность ХгА была характерна для функционирующих и метастатических НЭО. Особый интерес представляет высокая частота повышения ХгА (до 57-75%) при нефункционирующих опухолях, диагностика которых осложняется отсутствием симптоматики и продукции биологически-активных соединений. Однако по данным авторов, использующих метод определения ХгА на основе РИА, диагностическая чувствительность и специфичность маркера были существенно ниже (45% и 73% соответственно) [58]. В целом продемонстрированные данные свидетельствуют о достаточно высокой диагностической чувствительности и специфичности ХгА как маркера НЭО. В последнее время активно изучается прогностическое значение ХгА. Ведущие специалисты в области исследования маркеров НЭО отмечают достоверную связь уровней ХгА с показателями выживаемости (табл. 11). В одном из первых исследований, проведенных Janson и соавт., в группе пациентов со злокачественными карциномами средней кишки медиана общей выживаемости при высоких значениях ХгА была достоверно ($p < 0,01$) ниже, чем у пациентов с низкими значениями маркера, при этом 5-летняя выживаемость также достоверно различалась (22% и 63% соответственно) [35]. Более поздние работы демонстрируют аналогичные данные. Так, у пациентов с метастатическими ГЭП-НЭО общая выживаемость и медиана общей выживаемости при высоких уровнях ХгА (>200 Ед/л) была достоверно

($p < 0,001$) ниже, чем в группе пациентов со значениями ХгА ниже пороговых [3]. В группе пациентов с тяжелыми формами НЭО, получающих химиотерапию по схеме FCISt, ХгА являлся независимым предиктором выживаемости без прогрессирования ($p = 0,017$) и общей выживаемости ($p < 0,001$) [90]. В исследовании RADIANT-1 анализировалась связь выживаемости с базальными уровнями ХгА у пациентов с нерезецированными НЭО и прогрессированием заболевания в ходе цитотоксической терапии (эверолимус, октреотид). Медианы выживаемости без прогрессирования и медианы общей выживаемости достоверно различались в группах с высоким и низким базальным уровнем ХгА до начала специфического лечения ($p < 0,01-0,0001$) [62]. В то же время, в исследовании RADIANT-3 результаты были менее показательными. Oberg и соавт. сравнивали выживаемость в группе пациентов с НЭО поджелудочной железы низкой и средней степени злокачественности при лечении эверолимусом и в группе плацебо с учетом базальных уровней ХгА. Медиана выживаемости без прогрессирования при лечении эверолимусом не показала достоверных различий у пациентов с высокими и низкими значениями ХгА. Однако в группе плацебо при высоких значениях ХгА медиана выживаемости без прогрессирования была достоверно ($p = 0,035$) ниже, чем у пациентов с низкими уровнями ХгА. Представляя собственные данные, необходимо охарактеризовать используемые в лаборатории клинической биохимии ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» методы определения маркеров НЭО, которые были внедрены в клиническую практику в 2007-2008 гг. и выполняются на постоянной основе до настоящего времени. Как следует из табл.12, для полноценного обследования пациентов с опухолями нейроэндокринной природы в лаборатории используется панель биохимических маркеров на основе стандартизованных тест-систем в автоматизированном и плащечном формате. Налаженная методическая база позволяет использовать широкий спектр маркеров для исследования не только универсальных, но и специфических маркеров, необходимых для выявления НЭО, оценки их биологической активности, распространенности и прогноза, а также мониторинга терапии.

Таблица 11

Прогностическое значение хромогранина А при НЭО			
Исследуемые группы (n)	Значения ХгА	Полученные результаты	Авторы
Пациенты со злокачественными карциномами средней кишки (86)	≥ 5000 Ед/л < 5000 Ед/л	Медиана общей выживаемости 33 мес. Медиана общей выживаемости 57 мес.	Janson et al., 1997
Пациенты с метастатическими ГЭП-НЭО (344)	≥ 200 Ед/л < 200 Ед/л	Медиана общей выживаемости 29 мес. 5-летняя выживаемость 26% Медиана общей выживаемости 84 мес. 5-летняя выживаемость 76%.	Turner N.C. et al., 2010
Пациенты с тяжелыми формами НЭО, получающие химиотерапию по схеме: 5-Fu, Pt, Str (82)	> 60 Ед/л	Независимый предиктор выживаемости без прогрессирования (HR: 2.77; 99% CI: 0.88-8.66, $p = 0,017$) и общей выживаемости (HR: 6.77; 99% CI: 1,26-36,5, $p < 0,001$)	Turner N.C. et al., 2010
Пациенты с нерезецированными НЭО и прогрессированием заболевания в ходе цитотоксической терапии (эверолимус, октреотид) (160)	$> 72,8$ нг/мл	Медиана выживаемости без прогрессирования 9,3 мес. Медиана общей выживаемости 20,2 мес.	Turner N.C. et al., 2010
	$< 72,8$ нг/мл	Медиана выживаемости без прогрессирования 16,7 мес. Медиана общей выживаемости не достигнута.	
Пациенты с НЭО поджелудочной железы низкой и средней степени злокачественности (410)	$> 72,8$ нг/мл	Медиана выживаемости без прогрессирования при лечении эверолимусом 8,5 мес. Медиана выживаемости без прогрессирования в группе плацебо 4,9 мес.	Oberg et al., 2011, RADIANT-3
	$< 72,8$ нг/мл	Медиана выживаемости без прогрессирования при лечении эверолимусом 11,2 мес. Медиана выживаемости без прогрессирования в группе плацебо 4,3 мес.	

Необходимо отметить, что определение ХгА с 2008г. по 2013г. проводилось при помощи набора «DAKO Chromogranin A ELISA kit» на основе двух поликлональных антител к С-концевому фрагменту человеческого ХгА с молекулярной массой 23 кДа, которая зарекомендовала себя в качестве чувствительной, хорошо

стандартизированной и стабильной тест-системы. Начиная с 2014 года в связи с прекращением производства набора «Dako», лаборатория была вынуждена перейти на тестсистему компании «Eurodiagnostica». В связи с недопустимостью сравнения данных, полученных разными тест-системами, ниже будет представлен анализ результатов определения ХгА более чем у 200 пациентов, полученных нами на основе тест-системы «Dako». В соответствии с результатами сравнительного анализа, представленными в табл.13, базальные уровни ХгА в плазме крови больных НЭО высокодостоверно ($p < 0,000001$) превышали соответствующий показатель практически здоровых мужчин и женщин. В контрольной группе медиана ХгА составила 15,3 Ед/л при вариабельности от 2,8 до 47 Ед/л с выходом в отдельных случаях за пределы рекомендуемой нормы (18 Ед/л).

Таблица 12

Используемые в клинической практике маркеры НЭО			
Маркер	Метод, тест система	Используемый биоматериал	Референсные уровни
Универсальные маркеры			
Хромогранин А	ИФА плащечный, Dako	Плазма крови	< 18 Ед/л
	ИФА плащечный (Eurodiagnostica)	Сыворотка крови	< 108 нг/мл
НСЕ	Электрехемилюминесцентный анализ, Cobas	Сыворотка крови	<12,5 нг/мл
Панкреатический полипептид	ИФА плащечный, Peninsula Laboratories	Плазма крови с ингибитором протеаз	20-200 пг/мл
Специфические маркеры			
Серотонин	ИФА плащечный, IBL	Сыворотка крови	30-200 нг/мл
5-ОИУК	ИФА плащечный, IBL	Суточная моча, собранная с консервантом	< 53 мкмоль/сут
Гистамин	ИФА плащечный, IBL	Плазма крови	0,2-1,0 нг/мл
Гастрин	Иммунохемилюминесцентный анализ, Immulite	Сыворотка крови	13,0-115,0 пг/мл
Инсулин	Иммунохемилюминесцентный анализ, Immulite	Сыворотка крови	< 29,1 мкМЕ/мл
С-пептид	Иммунохемилюминесцентный анализ, Immulite	Сыворотка крови	0,3-2,4 нмоль/л
Глюкагон	ИФА плащечный, BioVendor	Плазма крови с ингибитором протеаз	< 200 пг/мл
Соматостатин	ИФА плащечный, Peninsula Laboratories, USCN Life Science	Плазма крови с ингибитором протеаз	< 100нг/мл
ВИП	ИФА плащечный, Peninsula Laboratories, USCN Life Science	Плазма крови с ингибитором протеаз	< 300 пг/мл
Кальцитонин	Иммунохемилюминесцентный анализ (Immulin)	Сыворотка крови	< 11 пг/мл
Гормон роста	Иммунохемилюминесцентный анализ (Immulin)	Сыворотка крови	< 10,0 нг/мл
Кортизол	Иммунохемилюминесцентный анализ, Immulin	Сыворотка крови	138-690 нмоль/л
Паратиреоидный гормон	Электрехемилюминесцентный анализ, Cobas	Сыворотка крови	15-65 пг/мл
Синаптофизин	ИФА плащечный, USCN Life Science	Сыворотка крови	< 0,12 нг/мл
Pro-BNP	Иммунохемилюминесцентный анализ, Immulin	Сыворотка крови	< 170 пг/мл

Для больных НЭО была характерна выраженная вариабельность ХгА, при этом максимальные концентрации были зафиксированы у больных НЭО желудка (102000 Ед/л) и легкого (29603 Ед/л). Наиболее высокие медианы ХгА были выявлены при НЭО тонкой кишки (183,9 Ед/л), толстой кишки (148,4 Ед/л) и поджелудочной железы (135,9 Ед/л). В группе больных НЭО с метастазами из невыявленного первичного очага (НПО) медиана была максимальной (557,8 Ед/л) при наиболее высоких значениях квартилей (234,5-1114,9 Ед/л), что подтверждало зависимость секреции ХгА от распространенности опухолевого процесса. В этой группе пациентов медиана ХгА была достоверно ($p < 0,01$) повышена по отношению к медианам, полученным в группах больных с верифицированной локализацией НЭО.

Таблица 13

Концентрация хромогранина А (Ед/л) в плазме крови пациентов с НЭО различной локализации и в контрольной группе			
Группа	n	Медиана (квартили)	Среднее±SD (Интервалы)
Общая группа НЭО ¹	227	168,4 (55,6-668,2)	1215,5±7040,7 (7,3-102000)
НЭО желудка ²	33	59,1 (39,4-434,4)	3677,5±17710 (7,3-102000)
НЭО поджелудочной железы ³	60	135,9 (53,9-616,6)	568,9±974,9 (16,9-5828,1)
НЭО тонкой кишки ⁴	32	183,9 (83,6-534,6)	395,7±751,5 (10,8-1848,0)
НЭО толстой кишки ⁵	21	148,4 (101,7-426,6)	529,4±751,5 (14,6-2743,4)
НЭО легких ⁶	41	97,4 (37,4-487,7)	1439,8±5156,9 (8,8-29603,2)
Метастазы НЭО из НПО ⁷	40	557,8 (234,5-1114,9)	1015,4±1243,4 (8,7-5289,5)
Контрольная группа ⁸	66	15,3 (9,8-19,4)	15,6±8,4 (2,8-47,2)

Примечание: p (1-7 vs 8) = 0,000001; p (1-6 vs 7) < 0,01

Оценка диагностической значимости ХгА проводилась с учетом порогового уровня 33 Ед/л, который был рассчитан по результатам определения гликопротеина в контрольной группе и соответствовал специфичности 98,5%. Как следует из табл.14, в общей группе больных НЭО диагностическая чувствительность составила 85,8%, при этом она достигала максимума при НЭО поджелудочной железы (92,8%) и тонкой кишки (87,5%). Высокая частота значений ХгА, превышавших пороговый уровень, была характерна для группы больных НЭО без выявленного первичного очага (95%), что, по-видимому, было обусловлено распространенностью процесса.

Таблица 14

Диагностическая чувствительность ХгА в группах больных НЭО			
Группа		n	Чувствительность (%)
Общая группа НЭО		227	85,8
НЭО различных локализаций	Желудок	33	84,9
	Поджелудочная железа	60	92,9
	Тонкая кишка	32	87,5
	Толстая кишка	21	66,7
	Легкие	41	78,1
	НПО	40	95,0
Метастазы в печени	Нет	57	63,2
	Есть	156	93,6
Карциноидный синдром	Нет	98	77,6
	Есть	113	92,9

Зависимость секреции ХгА от распространенности и активности НЭО была дополнительно подтверждена при сравнительном анализе результатов определения ХгА в плазме крови больных с наличием и отсутствием метастазов в печени и карциноидного синдрома (рис.4).

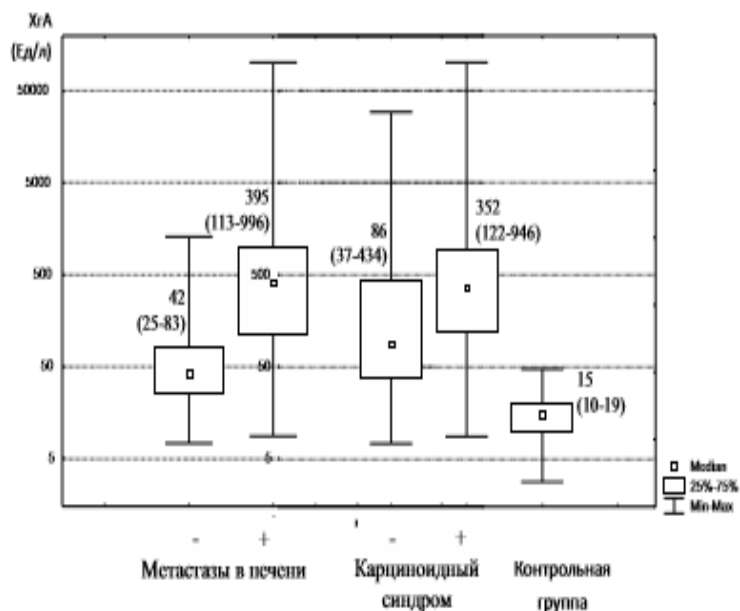


Рис.4. Зависимость уровня ХгА (Ед/л) от клинических характеристик НЭО

Как следует из рисунка, медиана ХгА при метастатическом поражении печени более 9 раз превышала показатель у пациентов без поражения печени ($p < 0,0046$). Кроме того, медиана ХгА была также существенно (более 4 раз) повышена у больных с карциноидным синдромом по сравнению с подгруппой больных без клинических признаков карциноидного синдрома ($p < 0,000008$). При этом медианы во всех подгруппах пациентов были достоверно выше по отношению к показателю группы контроля ($p < 0,000001$). Эта зависимость прослеживалась также при анализе диагностической чувствительности ХгА в подгруппах больных НЭО с метастатическим поражением печени и клиническими проявлениями карциноидного синдрома, при которых она была максимально высокой (93,6% и 92,9%). У пациентов без соответствующих клинических признаков частота показателей, превышавших пороговый уровень, была ниже. В то же время достаточно высокая частота гиперсекреции ХгА у пациентов без метастазов в печени (63,2%) и клинических признаков карциноидного синдрома (77,6%) свидетельствует о возможности его использования в диагностических целях независимо от распространенности и активности опухолевого процесса (табл.14). Несмотря на ведущую роль ХгА в качестве универсального маркера опухолей нейроэндокринной природы, важными маркерами для оценки биологической активности НЭО и карциноидного синдрома до сих пор остаются серотонин, продукция которого является одним из главных этиологических факторов, а также метаболит серотонина 5-ГИУК. В клинической практике в качестве маркера карциноидных опухолей наиболее оправдано исследование 5-ГИУК, суточная экскреция которого является более стабильным и менее подверженным вариабельности показателем, чем концентрация серотонина в периферической крови, т.к. на него в меньшей степени влияют индивидуальные особенности больных, их психоэмоциональное состояние в момент взятия крови, суточные биоритмы. В то же время необходимость специальной подготовки и проблемы, связанные со сбором суточной мочи для определения 5-ГИУК, ограничивают применение этого маркера в практике обследования больных НЭО. Полученные нами данные (табл. 15) подтверждают высокую информативность ХгА наряду со специфическими маркерами карциноидного синдрома.

Таблица 15

Зависимость уровней маркеров от клинических характеристик НЭО

Больные НЭО	Медиана (квартили)		
	ХгА (Ед/л)	Серотонин (нг/мл)	5-ГИУК (мкмоль/сут)
без метастазов в печени	42,1 (24,9-83,0)	237,3 (141,3-372,1)	37,0 (27,0-45,0)
с поражением печени	394,8 (112,6-996,1)	929,4 (271,3-1834)	141,0 (36,0-433,0)
без карциноидного синдрома	86,2 (37,0-434,4)	261,7 (155,2-758,2)	42,0 (31,0 -157,5)
с карциноидным синдромом	352,3 (122,5-945,5)	1266 (334,8-1924)	152,0 (35,0-433,0)
Контрольная группа	15,3 (9,8-19,4)	168,0 (130,0-234,8)	30,0 (25,0-44,0)

Уровни серотонина и 5-ГИУК в группе больных НЭО с метастазами в печени достоверно превышали соответствующие медианы у пациентов с локализованными формами НЭО ($p<0,0019$) и контроля ($p<0,00018$). Медиана серотонина у пациентов с локализованными формами НЭО также отличалась от контроля ($p=0,00087$), в то время как для экскреции 5-ГИУК различия отсутствовали ($p=0,24$). При карциноидном синдроме уровни серотонина были достоверно ($p=0,000001$) выше, чем при НЭО без соответствующих клинических признаков, тогда как для 5ГИУК различия носили характер тенденции ($p=0,08$). В обеих группах НЭО значения серотонина и 5-ГИУК достоверно ($p<0,012$) отличались от контрольной группы. Необходимо отметить, что выявленные различия для специфических маркеров карциноидного синдрома были выражены в меньшей степени по сравнению с описанными выше изменениями для ХгА. Диагностическая чувствительность серотонина и 5-ГИУК была ниже, чем чувствительность ХгА как в общей группе, так и при всех локализациях НЭО. В общей группе больных НЭО частота повышенных по отношению к соответствующим пороговым уровням для серотонина составила 60,7%, для 5-ГИУК – 53,7%. Чувствительность серотонина и 5-ГИУК при метастазах в печени (69,6% и 60,5%, соответственно) и карциноидном синдроме (76,5% и 58,6%) были ниже, чем у ХгА. У пациентов без поражения печени и клинических признаков карциноидного синдрома частота превышения соответствующих пороговых уровней была значительно ниже и составляла для серотонина 38,8 и 42,9% и для экскреции 5-ГИУК – 18,2% и 37,5%. Полученные данные свидетельствуют о большей диагностической чувствительности ХгА как маркера, независимого от клинических характеристик опухоли. Для оценки взаимосвязи между биохимическими маркерами НЭО был предпринят дополнительный корреляционный анализ, в результате которого была выявлена прямая зависимость разной степени, выраженность которой усиливалась при неблагоприятных факторах, в частности, карциноидном синдроме. При проведении корреляционного анализа по методу Спирмена в общей группе НЭО была выявлена достоверная положительная корреляционная связь средней силы ($R=0,67$, $p=0,0000001$) между уровнями серотонина и 5-ГИУК. Наиболее сильная связь между данными показателями выявлена в группе больных НЭО с карциноидным синдромом ($R=0,74$, $p=0,0000001$), а также в группе больных НЭО из НПО ($R=0,69$, $p=0,00067$). Для ХгА и серотонина положительная корреляционная связь была выявлена в группе больных НЭО желудка ($R=0,84$, $p=0,0000001$) и тонкой кишки ($R=0,55$, $p=0,0012$). При других локализациях корреляция между уровнем ХгА и серотонином не обладала статистической достоверностью. Данные корреляционного анализа отражают вариабельность рассмотренных выше маркеров, что свидетельствует о целесообразности их комплексного исследования у больных НЭО. Таким образом, в соответствии с данными зарубежных исследователей, а также собственными результатами, определение биохимических маркеров НЭО может быть использовано в диагностике, мониторинге и прогнозе этого типа опухолей.

Полученные нами закономерности соответствуют основным положениям Европейского общества по нейроэндокринным опухолям [65,73]:

- *Хромогранин А – общий, клинически наиболее значимый маркер функционально активных и нефункционирующих НЭО;*
- *Хромогранин А – высокочувствительный (87-100%) и специфичный (100%) маркер НЭО с метастазами в отдаленных органах;*
- *Хромогранин А – маркер карциноидного синдрома, более чувствительный по сравнению с экскрецией 5-ГИУК при НЭО с метастазами в отдаленных органах.*

Следует отметить наиболее важную, до сих пор нерешенную проблему стандартизации иммуноферментного анализа маркеров НЭО. В соответствии с этим в лаборатории клинической биохимии РОНЦ обследование больных НЭО проводится с учетом общих рекомендаций ENETS по определению, интерпретации и стандартизации результатов исследования ХгА:

- серийные исследования ХгА должны проводиться с использованием одних и тех же тест-систем;
- референсные интервалы и индивидуальные результаты ХгА значительно различаются при использовании разных тест-систем и не должны сравниваться;
- при переходе на другую тест-систему пациентам должен быть установлен новый базальный уровень;
- с учетом большого числа факторов, влияющих на точность определения ХгА, его исследование следует проводить в специальных референсных лабораториях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В течение последних десятилетий достигнут существенный прогресс в изучении биологии опухолей нейроэндокринной природы, которые как группа опухолей характеризуются общими клинико-биологическими признаками, но в то же время имеют уникальный набор биохимических факторов, определяющих их ауто- и паракринные свойства и функциональные особенности. Современная лабораторная диагностика НЭО основывается на исследовании продуцируемых опухолевыми клетками соединений, которые могут определяться в различных видах биологического материала [1, 2, 22]. Очевидна необходимость в совершенствовании методов лабораторного анализа с целью повышения их диагностической чувствительности и специфичности. Одним из перспективных направлений в улучшении диагностики НЭО является разработка современных методов лабораторного анализа на основе высокоспецифичных моноклональных антител, а также ПЦР в режиме реального времени с целью внедрения в клиническую практику наиболее чувствительных и специфичных опухолевых маркеров. Дифференциальная диагностика опухолей нейроэндокринного характера может основываться на исследовании панелей маркеров с учетом особенностей их секреции. Без сомнения, последнее слово в отношении значимости гранинов как биохимических маркеров НЭО еще не сказано. До сих пор ХгА рассматривается в качестве ведущего маркера опухолей нейроэндокринной природы [14, 40, 44, 45, 82, 91]. В то же время для повышения точности диагностики целесообразно дополнительное исследование ХгВ в качестве комплементарного биохимического маркера НЭО [86]. Следует отметить, что в последние годы существенно расширились возможности определения маркеров НЭО, что связано с разработкой тест-систем на основе высокоспецифичных моноклональных антител. В то же время используемые различными разработчиками антитела обладают разной аналитической чувствительностью. Этот факт необходимо учитывать при обследовании больных в динамике, поскольку использование наборов реактивов, основанных на разных методологических принципах и антителах, может привести к получению неадекватного для конкретного больного результата и, соответственно, ошибочной оценке течения опухолевого процесса. Несмотря на важность и актуальность стандартизации иммуноферментного анализа в его различных модификациях, эта проблема, несмотря на ее универсальный характер, до сих пор не решена. Как отмечалось выше, биохимическое обследование больных с опухолями нейроэндокринной природы требует строгого соблюдения целого ряда преаналитических и аналитических факторов в соответствии с особенностями метаболизма и экскреции определяемых маркеров. Большинство маркеров этой группы нестабильны и требуют особых условий взятия, обработки, транспортировки и хранения биологического материала. В частности, исследование таких пептидов, как ПП, ВИП, глюкагон, соматостатин требует взятия крови с добавлением ингибитора протеаз. В каждом конкретном случае перед взятием крови необходимо проконсультироваться в лаборатории, где будет проводиться анализ. В целом, методики определения маркеров этой группы более трудоемки и сложны, чем стандартные ИФА исследования, поэтому они должны выполняться в специализированных лабораториях онкологических учреждений с высококвалифицированным

персоналом в области ИФА, в которых обязательным условием является оценка контроля качества, вариабельности и воспроизводимости анализа с учетом контингента обследуемых больных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Ardill JE. Circulating markers for endocrine tumours of the gastroenteropancreatic tract. *Ann ClinBiochem.* 2008; 45 (6): 539-559.
2. Ardill JE., B.Eriksson. The importance of the measurement of circulating markers in patients with neuroendocrine tumours of the pancreas and gut. *Endocrine-Related Cancer.* 2003 – 10 – 459-462.
3. Arnold R, Wilke A, Rinke A, Mayer C, Kann PH, Klose KJ, Scherag A, Hahmann M, Müller HH, Barth P. Plasma chromogranin A as marker for survival in patients with metastatic endocrine gastroenteropancreatic tumors. *Clin. GastroenterolHepatol.* 2008; 6(7):820-7.
4. Aunis D, Metz-Boutigue MH. Chromogranins: current concepts. Structural and functional aspects. *AdvExp Med Biol.* 2000; 482:21-38.
5. Bajetta E, Ferrari L, Martinetti A, Celio L, Procopio G, Artale S, Zilembo N, Di Bartolomeo M, Seregini E, Bombardieri E. Chromogranin A, neuron specific enolase, carcinoembryonic antigen, and hydroxyindole acetic acid evaluation in patients with neuroendocrine tumors. *Cancer.* 1999; 86(5):858-865.
6. Barakat MT, Meeran K, Bloom SR. Neuroendocrine tumours. *Endocr. Relat. Cancer.* 2004; 11:1-18.
7. Bashir S, Gibril F, Ojeaburu JV, Asgharian B, Entsuaeh LK, Ferraro G, Crafa P, Bordi C, Jensen RT. Prospective study of the ability of histamine, serotonin or serum chromogranin A levels to identify gastric carcinoids in patients with gastrinomas. *Aliment PharmacolTher.* 2002; 16(7):1367-1382.
8. Bhattacharyya S, Davar J, Dreifus J., Caplin C.M. Carcinoid heart disease. *Circulation.* 2007; 116: 2860-2865.
9. Bílek R, Safarik L, Ciprová V, Vlcek P, Lisá L. Chromogranin A, a member of neuroendocrine secretory proteins as a selective marker for laboratory diagnosis of pheochromocytoma. *Physiol Res.* 2008; 57. Suppl 1:S171-179.
10. Biondi A., Malaguaners G., Vacane M., Beretta M., D'Agata V., Malaguanera M., Basile F., Drago F., Bertino G. Elevated serum levels of Chromogranin in hepatocellular carcinoma. *BMC Syrgery* 2012, 12 (Suppl 1): S7
11. Braga F, Ferraro S, Mozzi R, Dolci A, Panteghini M. Biological variation of neuroendocrine tumor markers chromogranin A and neuron-specific enolase. *ClinBiochem.* 2012; 12: 535-538.
12. Campana D, Nori F, Piscitelli L, Morselli-Labate AM, Pezzilli R, Corinaldesi R, Tomassetti P. Chromogranin A: is it a useful marker of neuroendocrine tumors? *J ClinOncol.* 2007; 25(15):1967-1973.
13. Caplin ME, Buscombe JR, Hilson AJ, Jones AL, Watkinson AF, Burroughs AK. Carcinoid tumour. *Lancet.* 1998; 352:799-805.
14. Cimitan M, Buonadonna A, Cannizzaro R, Canzonieri V, Borsatti E, Ruffo R, De Apollonia L. Somatostatin receptor scintigraphy versus chromogranin A assay in the management of patients with neuroendocrine tumors of different types: clinical role. *Ann Oncol.* 2003; 14(7):1135-41.
15. Conlon JM, Deacon CF, Richter G, Stöckmann F, Creutzfeldt W. Circulating tachykinins (substance P, neurokinin A, neuropeptide K) and the carcinoid flush. *Scand J Gastroenterol.* 1987; 22(1):97-105.
16. Conlon JM. Granin-derived peptides as diagnostic and prognostic markers for endocrine tumors. *RegulPept.* 2010; 165(1):5-11.
17. Deftos LJ. Chromogranin A: its role in endocrine function and as an endocrine and neuroendocrine tumor marker. *Endocr Rev.* 1991; 12(2):181-187.
18. Deftos LJ, O'Connor DT, Wilson CB, Fitzgerald PA. Human pituitary tumors secrete chromogranin-A. *J ClinEndocrinolMetab.* 1989; 68(5):869-872.
19. de Herder WW. Biochemistry of neuroendocrine tumours. *Best Pract Res ClinEndocrinolMetab.* 2007; 21(1):33-41.
20. Eastvold ML, Wallinder HW, Preissner CM, Singh RJ, Löwbeer C, Grebe SK. A two-center international evaluation of the Immulite 2000 automated serum gastrin assay. *ClinBiochem.* 2006; 39(4):387-90.
21. Eriksson B, Arnberg H, Oberg K, Hellman U, Lundqvist G, Wernstedt C, Wilander E. Chromogranins-new sensitive markers for neuroendocrine tumors. *ActaOncol.* 1989; 28(3):325-329.

22. Eriksson B., Oberg K., Stridsberg. Tumor markers in neuroendocrine tumors. *Digestion*, 2000, 62, 33-38.
23. Esparmer V, Avero B. Identification of enteroamine the specific hormone of the enterochromaffine cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature*. 1952; 169:800-801.
24. Feldman SA, Eiden LE. The chromogranins: their roles in secretion from neuroendocrine cells and as markers for neuroendocrine neoplasia. *EndocrPathol*. 2003 Spring;14(1):3-23.
25. Feldman JM, Lee EM. Serotonin content of foods: effect on urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid. *Am J Clin Nutr*. 1985;42(4):639-43.
26. Ferrari L, Seregini E, Bajetta E, Martinetti A, Bombardieri E. The biological characteristics of chromogranin A and its role as a circulating marker in neuroendocrine tumours. *Anticancer Res*. 1999; 19(4C):3415-27
27. Fleury A, Fléjou JF, Sauvanet A, Molas G, Vissuzaine C, Hammel P, Lévy P, Belghiti J, Bernades P, Ruszniewski P. Calcitonin-secreting tumors of the pancreas: about six cases. *Pancreas*. 1998;16(4):545-50.
28. Ghaferi A.A., Chojnacki K.A., Long W.D., Cameron J.L., C.J. Yeo. Pancreatic VIPomas: subject review and one institutional experience. *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 382-393.
29. Glinicki P, Kapuścińska R, Jeske W. The differences in chromogranin A (CgA) concentrations measured in serum and in plasma by IRMA and ELISA methods. *Endokrynol Pol*. 2010; 61(4):346-50.
30. Goebel SU, Serrano J, Yu F, Gibril F, Venzon DJ, Jensen RT. Prospective study of the value of serum chromogranin A or serum gastrin levels in the assessment of the presence, extent, or growth of gastrinomas. *Cancer*. 1999 Apr 1;85(7):1470-1483.
31. Gregory H., Hardy PM., Jones DS., et al. The antral hormone gastrin: structure of gastrin. *Nature* 1964; 204; 931-933.
32. Guignat L, Bidart JM, Nocera M, Comoy E, Schlumberger M, Baudin E. Chromogranin A and the alpha-subunit of glycoprotein hormones in medullary thyroid carcinoma and pheochromocytoma. *Br J Cancer*. 2001;84(6):808-12.
33. Ichimura T, Kondo S, Okushiba S, Morikawa T, Katoh H. A calcitonin and vasoactive intestinal peptide-producing pancreatic endocrine tumor associated with the WDHA syndrome. *Int J Gastrointest Cancer*. 2003;33(2-3):99-102.
34. Ito T, Igarashi H, Jensen RT. Serum pancreastatin: the long sought universal, sensitive, specific tumor marker for neuroendocrine tumors? *Pancreas*. 2012;41(4):505-7.
35. Janson E.T. Holmberg L., Stridsberg M., Erikson B., Theodorsson E., Wilander E., Oberg K. Carcinoid tumors. Analysis of prognostic factors and survival in 301 patients from a referral center. *Ann Oncol* 1997;8:685-690
36. Jian B, Xu J, Connolly J, Savani RC, Narula N, Liang B, Levy RJ. Serotonin mechanisms in heart valve disease I: serotonin-induced up-regulation of transforming growth factor-beta1 via G-protein signal transduction in aortic valve interstitial cells. *Am J Pathol*. 2002;161(6):2111-21.
37. Jianu CS, Fossmark R, Syversen U, Hauso Ø, Waldum HL. A meal test improves the specificity of chromogranin A as a marker of neuroendocrine neoplasia. *Tumour Biol*. 2010;31(5):373-80.
38. Kema IP, de Vries EG, Muskiet FA. Measurement of 5-HIAA in urine. *Ann Clin Biochem*. 1995; 32 (Pt 1):102-104
39. Kema IP, de Vries EG, Slooff MJ, Biesma B, Muskiet FA. Serotonin, catecholamines, histamine, and their metabolites in urine, platelets, and tumor tissue of patients with carcinoid tumors. *Clin Chem*. 1994;40(1):86-95.
40. Korse CM, Bonfrer JM, Aaronson NK, Hart AA, Taal BG. Chromogranin A as an alternative to 5-hydroxyindoleacetic acid in the evaluation of symptoms during treatment of patients with neuroendocrine Tumors. *Neuroendocrinology*. 2009;89(3):296-301.
41. Korse CM, Taal BG, Bonfrer JM, Vincent A, van Velthuysen ML, Baas P. An elevated progastrin-releasing peptide level in patients with well-differentiated neuroendocrine tumours indicates a primary tumour in the lung and predicts a shorter survival. *Ann Oncol*. 2011;22(12):2625-30.

42. Korse CM, Taal BG, de Groot CA, Bakker RH, Bonfrer JM. Chromogranin-A and N-terminal pro-brain natriuretic peptide: an excellent pair of biomarkers for diagnostics in patients with neuroendocrine tumor. *J ClinOncol*. 2009; 27(26):4293-9.
43. Kulke MH, Mayer RJ. Carcinoid tumors. *N Engl J Med*. 1999;340 (11):858-868.
44. Lamberts S.W.J., Hofland L.J., Nobels F.R.E. Neuroendocrine tumor markers. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2001. 22 p.309-339.
45. Lawrence B, Gustafsson BI, Kidd M, Pavel M, Svejda B, Modlin IM. The clinical relevance of chromogranin A as a biomarker for gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *EndocrinolMetabClin North Am*. 2011;40(1):111-34.
46. Lesurtel M, Soll C, Graf R, Clavien PA. Role of serotonin in the hepatogastrointestinal tract: an old molecule for new perspectives. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(6):940-52.
47. Louthan O. Chromogranin A in physiology and oncology. *Folia Biol (Praha)*. 2011;57(5):173-181.
48. Manf  AZ, Norberto L, Marchesini M, Lumachi F. Usefulness of chromogranin A, neuron-specific enolase and 5-hydroxyindolacetic acid measurements in patients with malignant carcinoids. *In Vivo*. 2011;25(6):1027-9.
49. Masel S.L., Brennan B.A., Turner J.H. et al. Pancreatic vasoactive intestinal polypeptide-oma as cause of secretory diarrhoea. *J of Gastroent and Hepatol* 2009; 15, 457-460.
50. Massironi S, Conte D, Sciola V, Spampatti MP, Ciafardini C, Valenti L, Rossi RE, Peracchi M. Plasma chromogranin A response to octreotide test: prognostic value for clinical outcome in endocrine digestive tumors. *Am J Gastroenterol*. 2010; 105(9):2072-2078.
51. Massironi S., Fraquelli M., Paggi S., Sangiovanni A., Conte D., Sciola V., Ciafardini C., Colombo M., Peracchi M. Chromogranin A levels in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis*. 2009;41(1):31-35.
52. Massironi S, Sciola V, Peracchi M, Ciafardini C, Spampatti MP, Conte D. Neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic system. *World J Gastroenterol*. 2008;14(35):5377-84.
53. Modlin IM, Gustafsson BI, Moss SF, Pavel M, Tsolakis AV, Kidd M. Chromogranin A-biological function and clinical utility in neuro endocrine tumor disease. *Ann SurgOncol*. 2010;17(9):2427-2443.
54. Modlin IM., Latich I., Zikusoka M., Kidd M., Eick G., Chan A.K.C. Gastrointestinal carcinoids: the evolution of diagnostic strategies. *J. ClinGastroenterol*. 2006; 40:572-82.
55. Modlin IM, Oberg K, Chung DC, Jensen RT, de Herder WW, Thakker RV, Caplin M, DelleFave G, Kaltsas GA, Krenning EP, Moss SF, Nilsson O, Rindi G, Salazar R, Ruszniewski P, Sundin A. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncol*. 2008; 9(1):61-72.
56. Molina R, Alvarez E, Aniel-Quiroga A, Borque M, Cand s B, Leon A, Poyatos RM, Gelabert M. Evaluation of chromogranin A determined by three different procedures in patients with benign diseases, neuroendocrine tumors and other malignancies. *Tumour Biol*. 2011;32(1):13-22.
57. Moller JE, Connolly HM, Rubin J, Seward JB, Modesto K, Pellikka PA. Factors associated with progression of carcinoid heart disease. *N Engl J Med*. 2003;348(11):1005-15.
58. Nehar D., Lombard-Bohas C., Olivieri S., Claustral B., Chayvialle J.A., Penes M.C., Sassolas G., Borson-Chazot F., Interest of Chromogranin A for diagnosis and followup of endocrine tumours. *Clin. End* (2004) 60, 644-652
59. Nikou GC, Marinou K, Thomakos P, Papageorgiou D, Sanzanidis V, Nikolaou P, Kosmidis C, Moulakakis A, Mallas E. Chromogranin a levels in diagnosis, treatment and follow-up of 42 patients with non-functioning pancreatic endocrine tumours. *Pancreatology*. 2008;8(4-5):510-9.
60. Nikou G.C., Toubanakis C. VIPomas: an update in diagnosis and management in a series of 11 patients. *Hepatogastroenterology* 2005; 52(64): 1259-1265.
61. Nobels FR, Kwekkeboom DJ, Bouillon R, Lamberts SW. Chromogranin A: its clinical value as marker of neuroendocrine tumours. *Eur J Clin Invest*. 1998;28(6):431-40.
62. Oberg K. Circulating biomarkers in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *EndocrRelat Cancer*. 2011; 18Suppl 1:S17-25.

63. Oberg K. Diagnostic Pathways. Handbook of neuroendocrine tumors: their current and future management. 2006. P. 103-119.
64. O'Connor D.T., Deftos M.S. Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms. *N Engl Med* 1986; 314(18):1145-51
65. O'Toole D, Grossman A, Gross D, DelleFave G, Barkmanova J, O'Connor J, Pape UF, Plöckinger U; Mallorca Consensus Conference participants; European Neuroendocrine Tumor Society. ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: biochemical markers. *Neuroendocrinology*. 2009;90(2):194-202.
66. Panzuto F, Severi C, Cannizzaro R, Falconi M, Angeletti S, Pasquali A, Corleto VD, Annibale B, Buonadonna A, Pederzoli P, DelleFave G. Utility of combined use of plasma levels of chromogranin A and pancreatic polypeptide in the diagnosis of gastrointestinal and pancreatic endocrine tumors. *J Endocrinol Invest*. 2004;27(1):6-11.
67. Pearse A., Barter R. Mammalian enterochromaffin cells as the source of serotonin (5-hydroxytryptamin). *J. of Pathol. And Bacteriol.* 1955;
68. 25-31. 68. Peracchi M, Conte D, Gebbia C, Penati C, Pizzinelli S, Arosio M, Corbetta S, Spada A. Plasma chromogranin A in patients with sporadic gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumors or multiple endocrine neoplasia type 1. *Eur J Endocrinol*. 2003;148(1):39-43.
69. Peracchi M, Gebbia C, Basilisco G, Quatrini M, Tarantino C, Vescarelli C, Massironi S, Conte D. Plasma chromogranin A in patients with autoimmune chronic atrophic gastritis, enterochromaffin-like cell lesions and gastric carcinoids. *Eur J Endocrinol*. 2005;152(3):443-8.
70. Piovesan A, Pia A, Visconti G, Terzolo M, Leone A, Magro G, Cesario F, Borretta G. Proinsulin-secreting neuroendocrine tumor of the pancreas. *Endocrinol Invest*. 2003;26(8):758-61.
71. Pirker RA, Pont J, Pöhl R, Schütz W, Griesmacher A, Müller MM. Usefulness of chromogranin A as a marker for detection of relapses of carcinoid tumours. *ClinChem Lab Med*. 1998;36(11):837-40.
72. Ramachandran R, Bech P, Murphy KG, Dhillo WS, Meeran KM, Chapman RS, Caplin M, Ghatei MA, Bloom SR, Martin NM. Improved diagnostic accuracy for neuroendocrine neoplasms using two chromograninA assays. *ClinEndocrinol (Oxf)*. 2012;76(6):831-6.
73. Ramage JK, Davies AH, Ardill J, Bax N, Caplin M, Grossman A, Hawkins R, McNicol AM, Reed N, Sutton R, Thakker R, Aylwin S, Breen D, Britton K, Buchanan K, Corrie P, Gillams A, Lewington V, McCance D, Meeran K, Watkinson A; UKNETwork for Neuroendocrine Tumours. Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoid) tumours. *Gut*. 2005;54Suppl 4:iv1-16.
74. Rehfeld JF. The art of measuring gastrin in plasma: A dwindling diagnostic discipline? *Scand J Clin Lab Invest*. 2008;68(5):353-361.
75. Rehfeld JF, Gingras MH, Bardram L, Hilsted L, Goetze JP, Poitras P, The Zollinger-Ellison Syndrome and Mismeasurement of gastrin. *Gastroenterology* 2011;140:1444-1453.
76. Remme C.A., Groot G.H., Schrijver G. Diagnosis and treatment of VIPoma in a female patient. *Eur J of Gastroenterol and hepatol*. 2006; 18: 93-99
77. Rindi G, Villanacci V, Ubioli A. Biological and molecular aspects of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Digestion*. 2000; 62 Suppl 1:19-26.
78. Sanduleanu S, Stridsberg M, Jonkers D, Hameeteman W, Biemond I, Lundqvist G, Lamers C, Stockbrügger RW. Serum gastrin and chromogranin A during medium- and long-term acid suppressive therapy: a case-control study. *Aliment Pharmacol Ther*. 1999;13(2):145-53.
79. Sciola V., Massironi S., Conte D., Caprioli F., Ferrero S., Ciafardini C., Peracchi M., Bardella M.T., Piodi L. Plasma chromogranin A in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15(6):867-71.
80. Sekiya K, Ghatei MA, Salahuddin MJ, Bishop AE, Hamid QA, Ibayashi H, Polak JM, Bloom SR. Production of GAWK (chromogranin-B 420-493)-like immunoreactivity by endocrine tumors and its possible diagnostic value. *J Clin Invest*. 1989 Jun;83(6):1834-42.
81. Shah T, Srirajaskanthan R, Bhogal M, Toubanakakis C, Meyer T, Noonan A, Witney-Smith C, Amin T, Bhogal P, Sivathasan N, Warner B, Hochhauser D, Caplin ME. Alpha-fetoprotein and human chorionic

- gonadotrophin-beta as prognostic markers in neuroendocrine tumour patients. *Br J Cancer*. 2008; 99(1):72-7.
82. Singh S, Law C. Chromogranin A: a sensitive biomarker for the detection and post-treatment monitoring of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012; 6(3):313-34.
 83. Sobol R.E., Memoli V., Deftos L.J., Hormone-negative chromogranin A-positive endocrine tumors. *N Engl Med* 1989; 320(7):444-446
 84. Sobol RE, O'Connor DT, Addison J, Suchocki K, Royston I, Deftos LJ. Elevated serum chromogranin A concentrations in small-cell lung carcinoma. *Ann Intern Med*. 1986;105(5):698-700.
 85. Stivanello M, Berruti A, Torta M, Termine A, Tampellini M, Gorzegno G, Angeli A, Dogliotti L. Circulating chromogranin A in the assessment of patients with neuroendocrine tumours. A single institution experience. *Ann Oncol*. 2001;12Suppl 2:S73-7.
 86. Stridsberg M, Eriksson B, Fellström B, Kristiansson G, Tiensuu-Janson E. Measurements of chromogranin B can serve as a complement to chromogranin A. *Regul Pept*. 2007; 139(1-3):80-3.
 87. Stridsberg M, Eriksson B, Oberg K, Janson ET. A comparison between three commercial kits for chromogranin A measurements. *J Endocrinol*. 2003; 177(2):337-341.
 88. Taupenot L, Harper K.L., O'Connor D.T., The Chromogranin-Secretogranin Family. *N Engl Med* 2003; 348:1134-1149.
 89. Tomassetti P, Migliori M, Simoni P, Casadei R, De lasio R, Corinaldesi R, Gullò L. Diagnostic value of plasma chromogranin A in neuroendocrine tumours. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001;13(1):55-58.
 90. Turner GB, Johnston BT, McCance DR, McGinty A, Watson RG, Patterson CC, Ardill JE. Circulating markers of prognosis and response to treatment in patients with midgut carcinoid tumours. *Gut*. 2006;55(11):1586-1591.
 91. Vinik AI, Silva MP, Woltering EA, Go VL, Warner R, Caplin M. Biochemical testing for neuroendocrine tumors. *Pancreas*. 2009;38(8):876-89.
 92. Vinik E, Silva MP, Vinik AI. Measuring the relationship of quality of life and health status, including tumor burden, symptoms, and biochemical measures in patients with neuroendocrine tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2011;40(1):97-109.
 93. Walter T, Chardon L, Chopin-Ialy X, Raverot V, Caffin AG, Chayvialle JA, Scoazec JY, Lombard-Bohas C. Is the combination of chromogranin A and pancreatic polypeptide serum determinations of interest in the diagnosis and follow-up of gastroentero-pancreatic neuroendocrine tumours? *Eur J Cancer*. 2012;48(12):1766-1773.
 94. Waltenberger J., Lundin L., Oberg K., Wilander E., Miyazono K., Heldin CH., Funa K. Involvement of transforming growth factor- β in the formation of fibrotic lesions in carcinoid heart disease. *American J. of Pathology*. 1993; 142(1):71-78.
 95. Welin S, Stridsberg M, Cunningham J, Granberg D, Skogseid B, Oberg K, Eriksson B, Janson ET. Elevated plasma chromogranin A is the first indication of recurrence in radically operated midgut carcinoid tumors. *Neuroendocrinology*. 2009;89(3):302-307.
 96. Yao JC, Pavel M, Phan AT, Kulke MH, Hoosen S, St Peter J, Cherfi A, Öberg KE. Chromogranin A and neuron-specific enolase as prognostic markers in patients with advanced pNET treated with everolimus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(12):3741-3749.
 97. Zatelli M.C., Torta M., Leon A., Ambrosio M.R., Gion M., Tomassetti P., De Braud F., Delle Fave G., Dogliotti L., degli Uberti E.C. Chromogranin A as a marker of neuroendocrine neoplasia: an Italian Multicenter Study. *Endocr Relat Cancer*. 2007;14(2):473-482.
 98. Zietenhorst JM, Bonfrer JM, Korse CM, Bakker R, van Tinteren H, Taal DG. Role of natriuretic peptides in the diagnosis and treatment of patients with carcinoid heart disease. *British J of Cancer*, 2004. 50(9): 1634-1639.
 99. Zietenhorst JM, Korse CM, Bonfrer JM, Peter E, Lamers CB, Taal BG. Daily cyclic changes in the urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid in patients with carcinoid tumors. *Clin Chem*. 2004, 50(9):1634-1639.

