



Школа по нейроэндокринным опухолям

10-11 мая 2016 г.

Роль биохимических маркеров в диагностике и прогнозе НЭО: возможности, проблемы, перспективы

Любимова Н.В.

Лаборатория клинической биохимии

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина» МЗ РФ

Биохимические маркеры нейроэндокринных опухолей

Универсальные маркеры

Сыворотка или плазма крови:

Хромогранин А
(ХгА)

Панкреатический полипептид
(ПП)

Нейрон-специфическая енолаза
(НСЕ)

α -субъединица
гликопротеиновых гормонов

Специфические маркеры

Сыворотка или плазма крови

Серотонин (5-НТ)

Гастрин

Инсулин

С-пептид

Глюкагон

ВИП

Гистамин

Соматостатин

АКТГ

ПТГ

Кальцитонин

Катехоламины

Нейропептиды: ProGRP, вещество Р, нейропептид К, Y, нейрокинин А

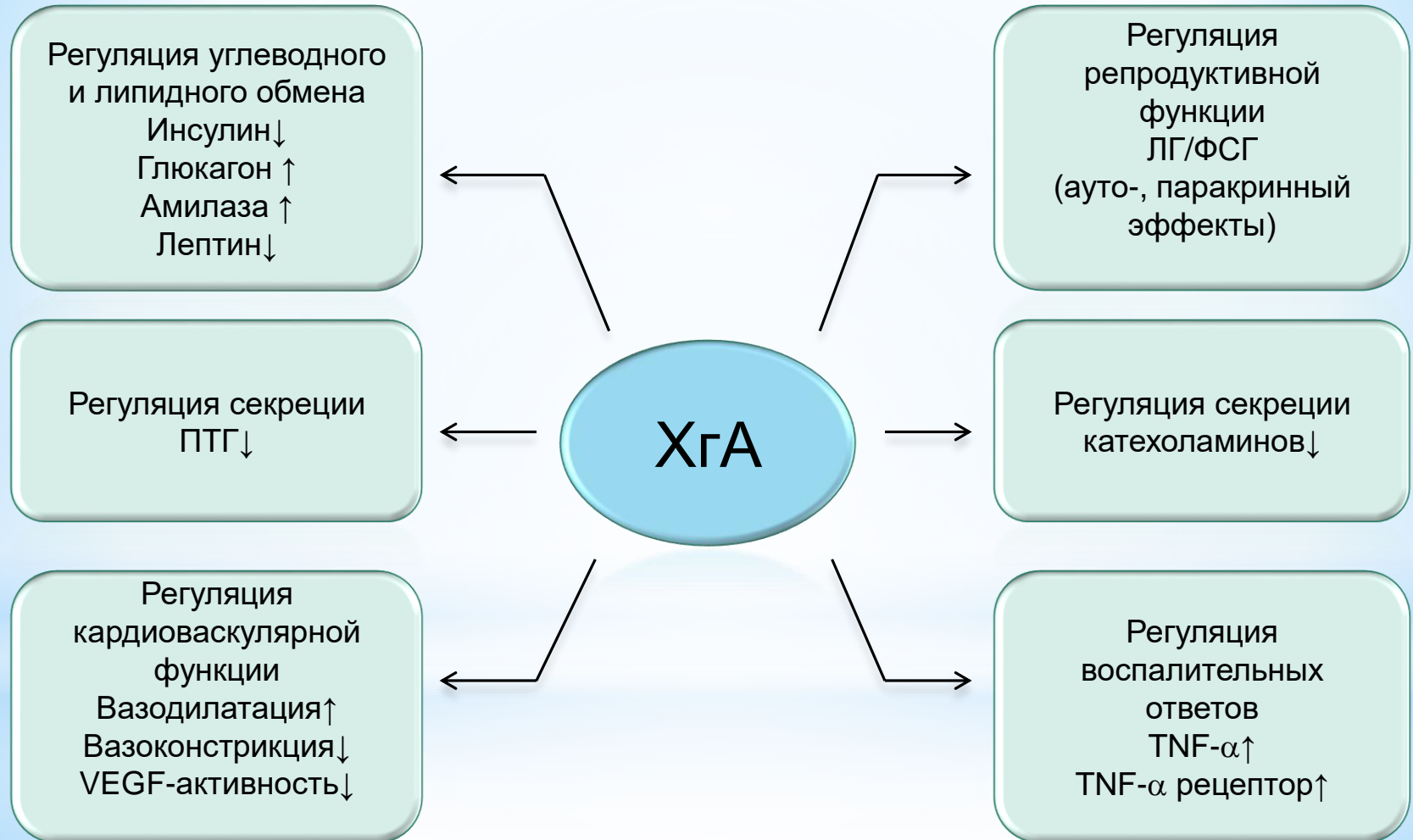
Суточная моча:

5-ГИУК

Серотонин

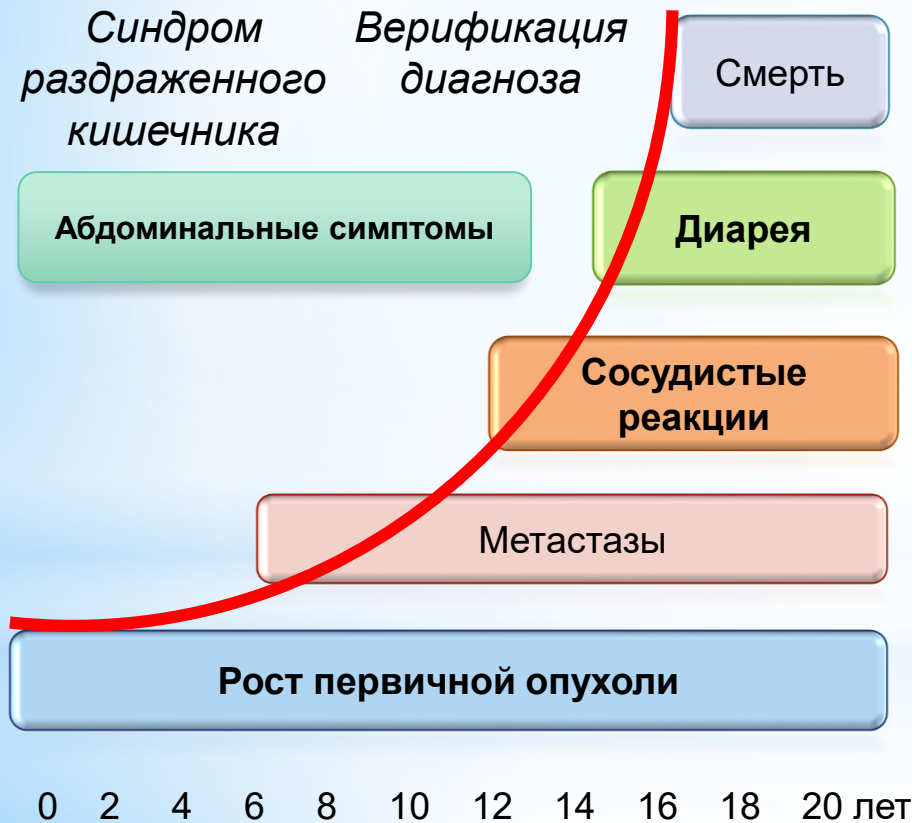
Метанефрины

Биологические функции хромогранина А и других представителей семейства гранинов

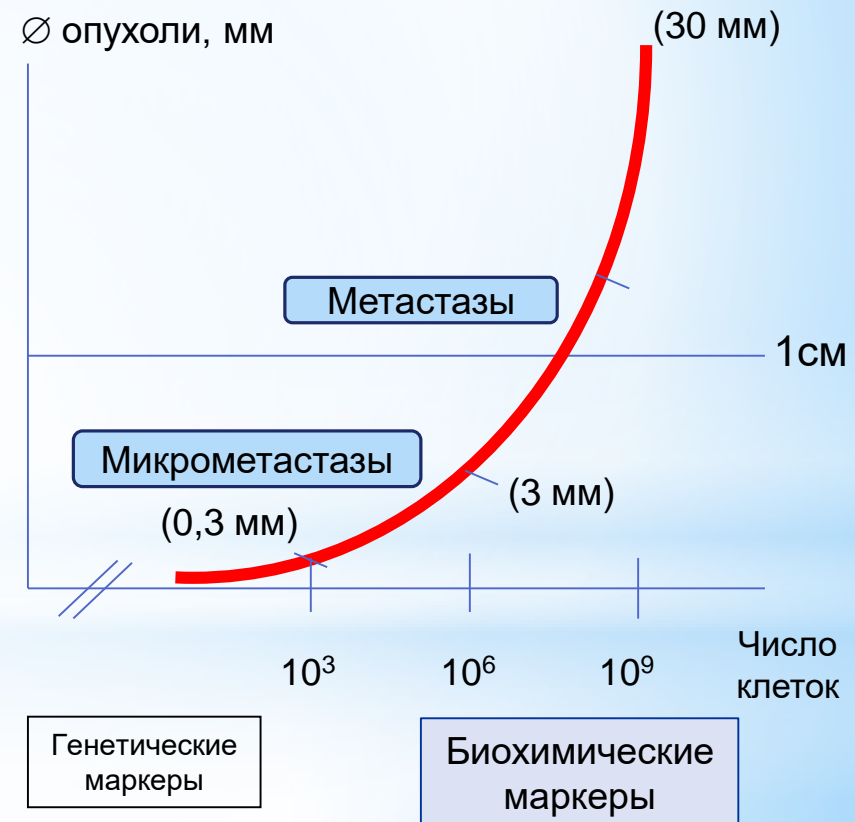


Нейроэндокринные опухоли (НЭО)

Естественная история развития

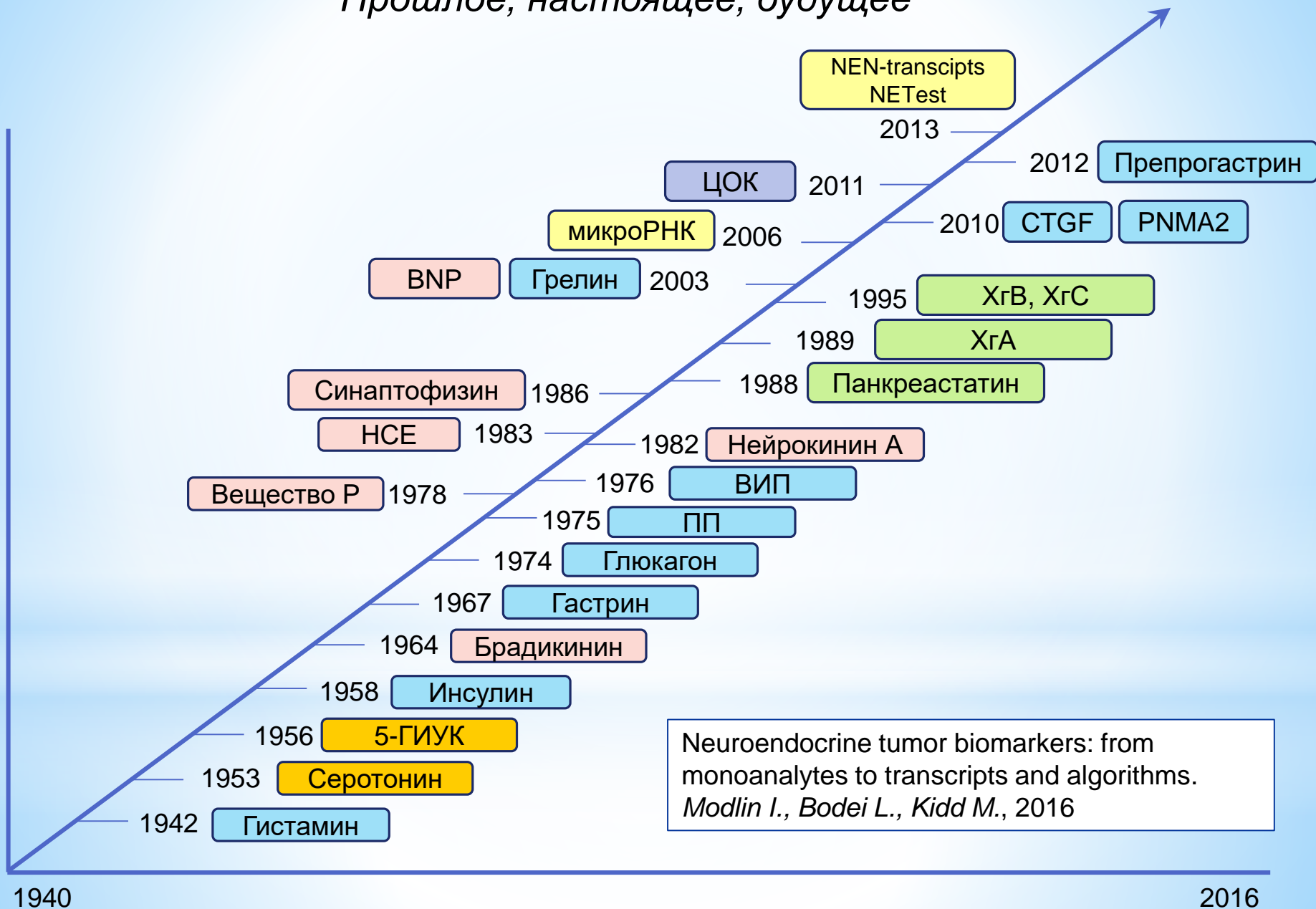


Выявление в зависимости от размера опухоли, количества клеток и маркеров



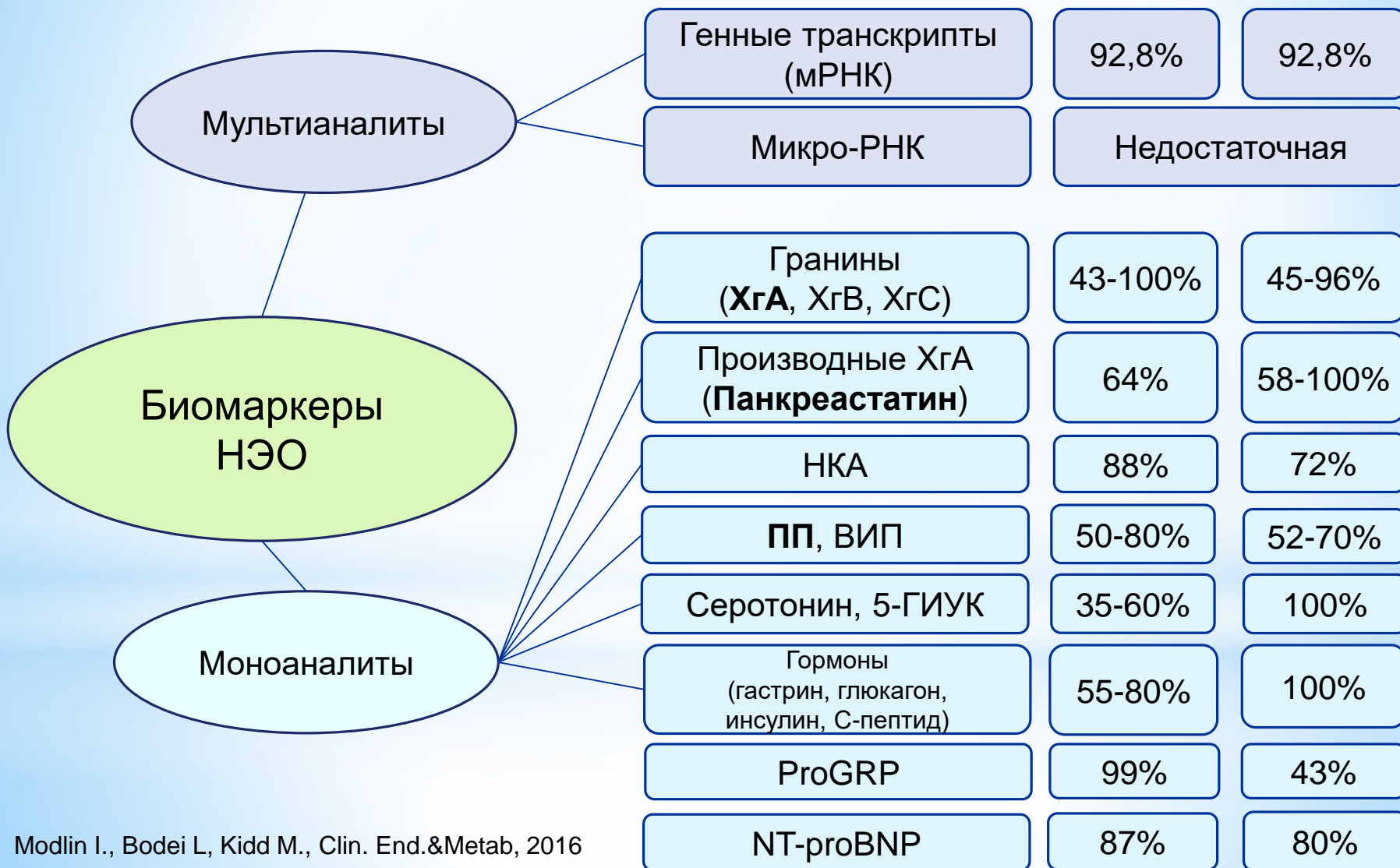
История биомаркеров НЭО

Прошлое, настоящее, будущее



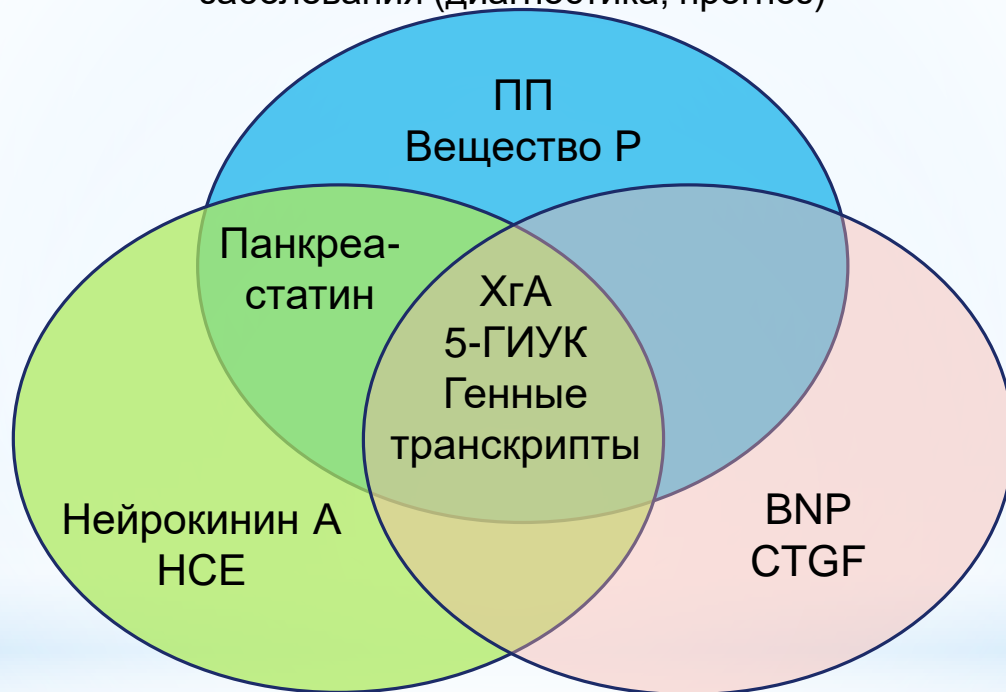
Neuroendocrine tumor biomarkers: from monoanalytes to transcripts and algorithms.
Modlin I., Bodei L., Kidd M., 2016

Эффективность циркулирующих маркеров НЭО с учетом чувствительности и специфичности



Систематизация биомаркеров НЭО в соответствии с классификацией NIH

Тип 0
Маркеры отражают естественную историю заболевания (диагностика, прогноз)



Применение данной системы для разработки, внедрения и применения биомаркеров НЭО ограничивается гетерогенностью данной группы опухолей, которая характеризуется широким спектром биологических, патологических и клинических проявлений.

Ограничения и возможности клинического применения маркеров НЭО

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

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

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

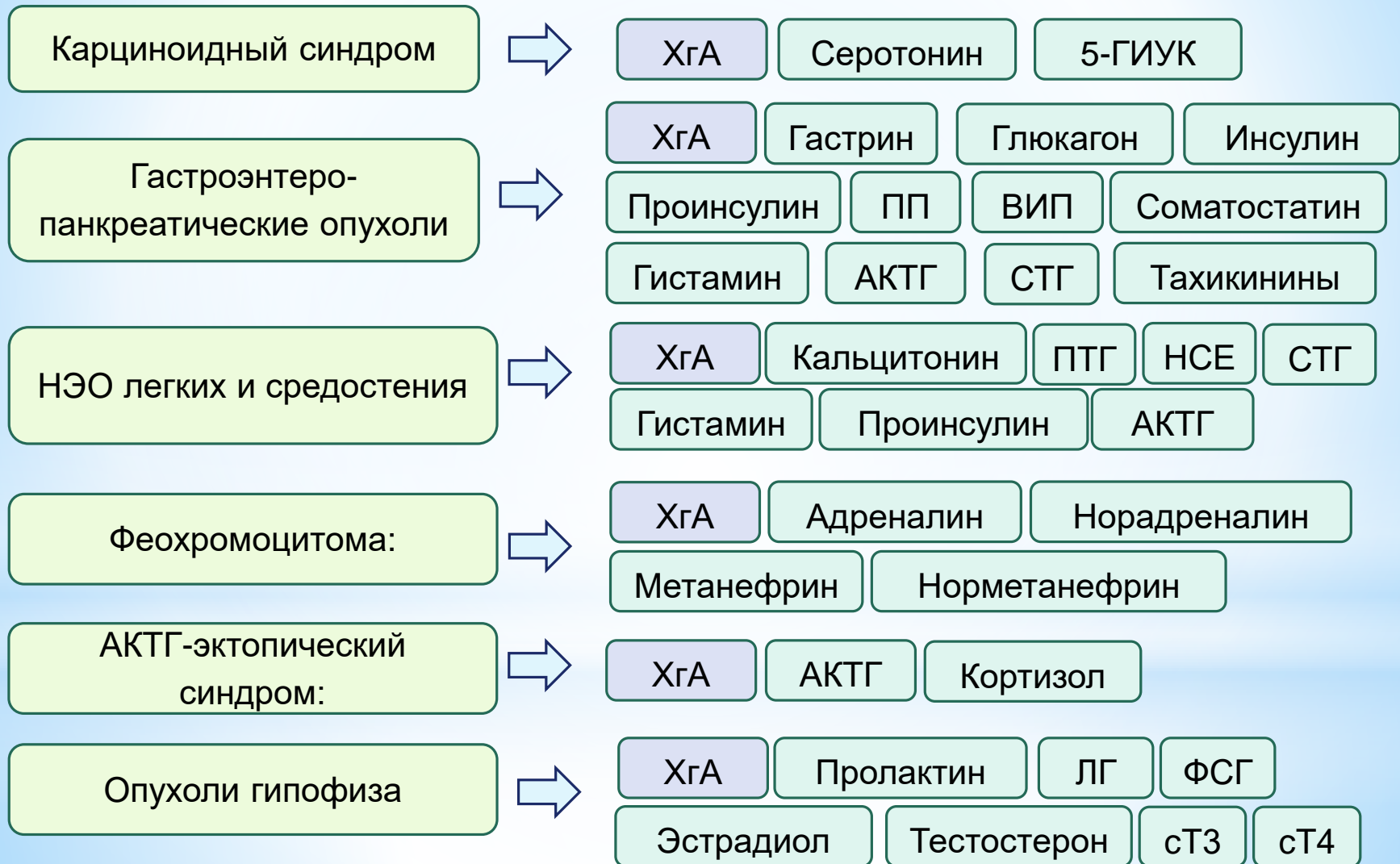
Алгоритмический анализ множественных транскриптов при НЭО может стать эффективным диагностическим инструментом, отражающим статус заболевания, прогрессирование опухоли и эффект терапии. Метод находится в стадии накопления данных и требует создание комплексной узко-специализированной лабораторной базы

MicroRNAs as potential biomarkers: Is the future here? – Verena Gounden, Zhen Zhao, 2013 (NIH&AACCC)

Consensus on biomarkers for neuroendocrine tumour disease. *Oberg K., Modlin I., de Herder W. (2015)*

Рекомендации по стандартизации биохимического обследования больных:

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



Диагностический алгоритм при НЭО ЖКТ



Гормонпродуцирующие опухоли желудочно-кишечного тракта и рекомендуемые биохимические маркеры

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

Общие требования к взятию биологического материала и выполнению исследований маркеров НЭО

Взятие крови на маркеры НЭО должно производиться в утренние часы (до 9 часов), натощак, при отсутствии каких-либо лечебных или диагностических мероприятий

Лабильность молекулярной структуры и особенности метаболизма маркеров НЭО требуют соблюдения специальных условий взятия, обработки, транспортировки и хранения биологического материала (в соответствии с инструкцией лаборатории)

При назначении исследования пептидов: соматостатина, ПП, ВИП, глюкагона взятие крови необходимо проводить в специальные вакуумные системы с антикоагулянтом и ингибитором протеолитической активности (в соответствии с инструкцией лаборатории)

Сбор суточной мочи проводится с консервантом и соблюдением требований предварительной подготовки (в соответствии с инструкцией лаборатории)

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

Факторы, влияющие на результаты определения серотонина и 5-ОИУК

Продукты питания



- Авокадо



- Шоколад



- Баклажан



- Ананас



- Чай



- Бананы



- Кофе



- Слива



- Финики



- Грецкий орех

Препараты, влияющие на результаты определения 5-ОИУК

Занижающие



- Аспирин



- Метилдопа



- Фенотиазины



- Кортикотропин



- Гепарин



- Октреотид



- Леводопа



- Ингибиторы MAO



- Трициклические антидепрессанты



- Хлорпромазин



- Имипрамин



- Этанол

Завышающие



- Парацетамол



- Фторурацил



- Фенацетин



- Мелфалан



- Фенобарбитал



- Цисплатин



- Кофеин



- Резерпин



- Гваяколовый эфир глицерина



- Никотин

Причины повышения хромогранина А

Онкологические заболевания

Нейроэндокринные опухоли

- Поджелудочной железы
- Gastroинтестинальные
- Легких (включая МРЛ)
- Медуллярный рак щитовидной железы
- Гипофиза
- Параганглиома
- Нейробластома
- Феохромоцитома

Другие типы опухолей

Рак молочной железы
Гепатоцеллюлярный рак
Рак поджелудочной железы
Рак предстательной железы
Рак яичников

Неопухолевые заболевания

Воспалительные заболевания

Системные воспалительные заболевания
Гигантоклеточный артрит
Хронический бронхит
Хронические обструктивные заболевания легких

Заболевания ЖКТ

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

Сердечно-сосудистые заболевания

Артериальная гипертензия
Сердечная недостаточность
Острый коронарный синдром

Эндокринные заболевания

Гиперпаратиреоз
Гипертиреоз

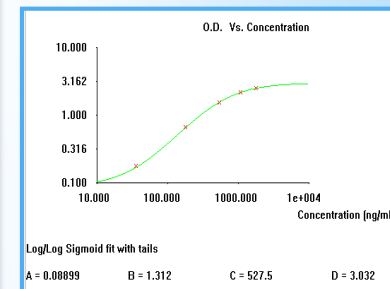
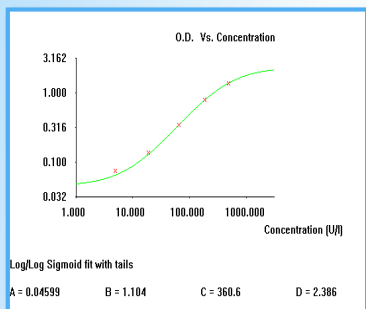
Патология почек

Почечная недостаточность

Действие лекарственных препаратов

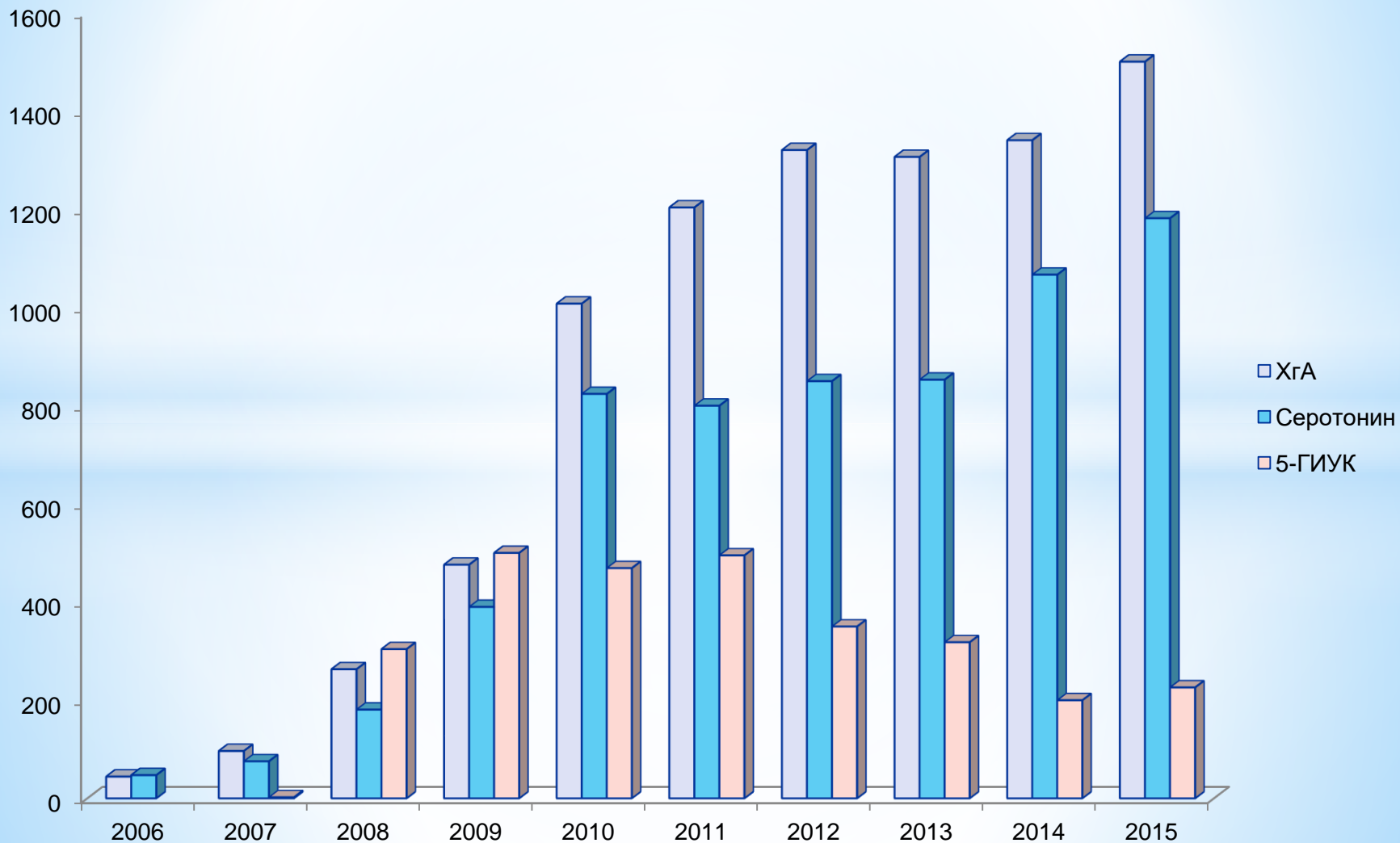
Ингибиторы протонной помпы
Антагонисты рецептора гистамина
Соматостатин

Характеристика тест-систем для определения ХгА

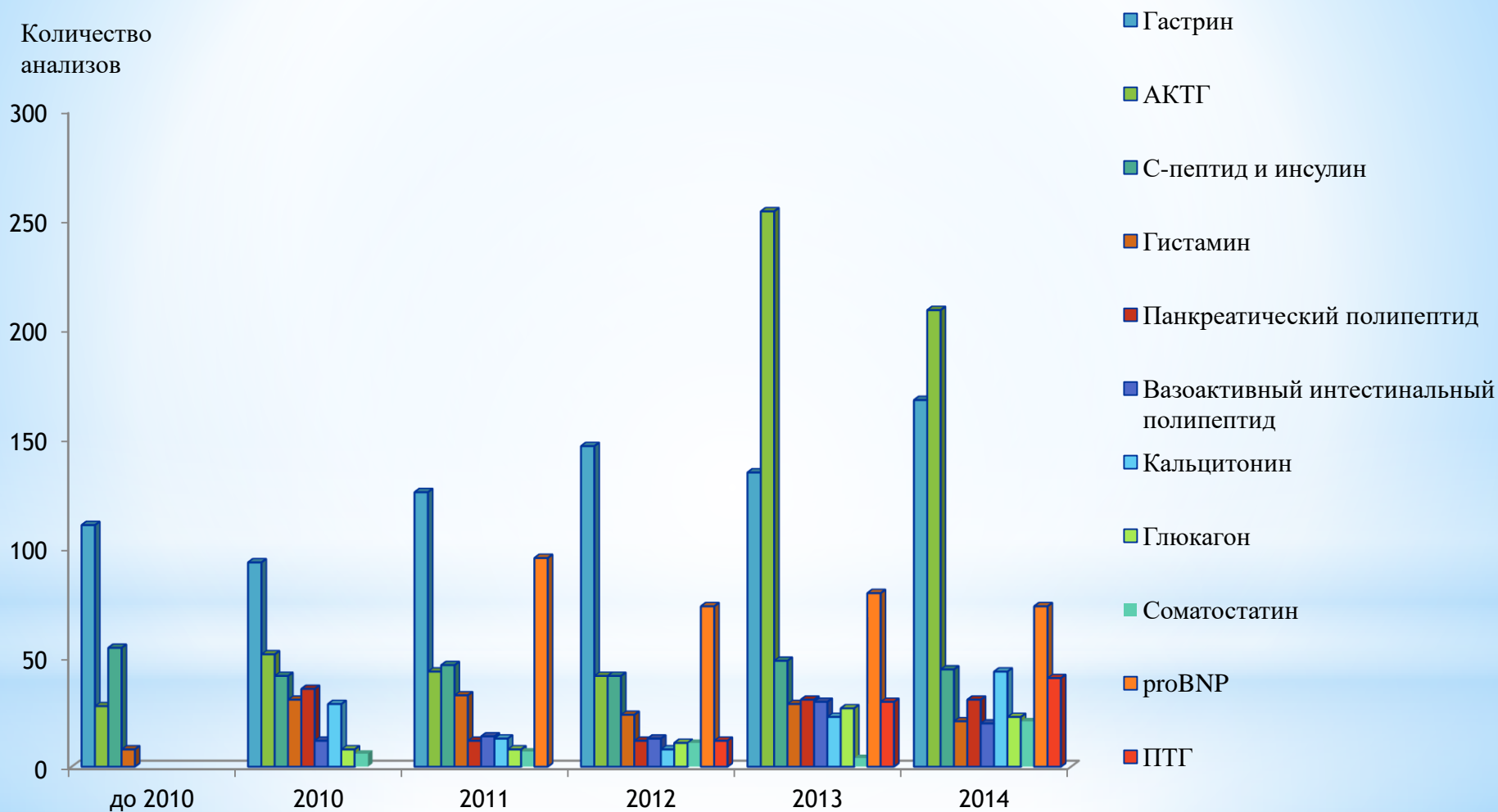


Характеристика	«Chromogranin A ELISA Kit» Dako	«NEOLISA Chromogranin A» ED
Антитела	Поликлональное антитело к С-концевому фрагменту ХгА (23 кДа)	2 моноклональных антитела
Материал	плазма крови	сыворотка крови
Аналитическая чувствительность	2,0 Ед/л	19 нг/мл
Коэффициент вариации	5,8-8,6%	CV (межсерийный): 5-10% CV (внутрисерийный): 3-8%
Стандарты	0, 5, 19, 65, 184, 485 Ед/л	0, 36, 180, 540, 1080, 1800 нг/мл
Референсный интервал:	2-18 Ед/л	< 108 нг/мл

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



Расширение спектра анализов маркеров НЭО, выполненных в лаборатории клинической биохимии РОНЦ с 2008 по 2014 г.г.



Биохимические маркеры НЭО, исследуемые в лаборатории клинической биохимии «РОНЦ им Н.Н. Блохина»

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

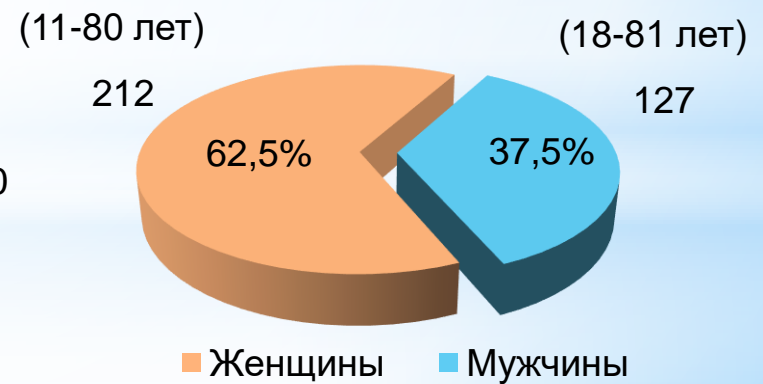
Характеристика больных НЭО



Распределение по локализациям



Распределение по полу



Уровни маркеров у больных НЭО различных локализаций

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

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

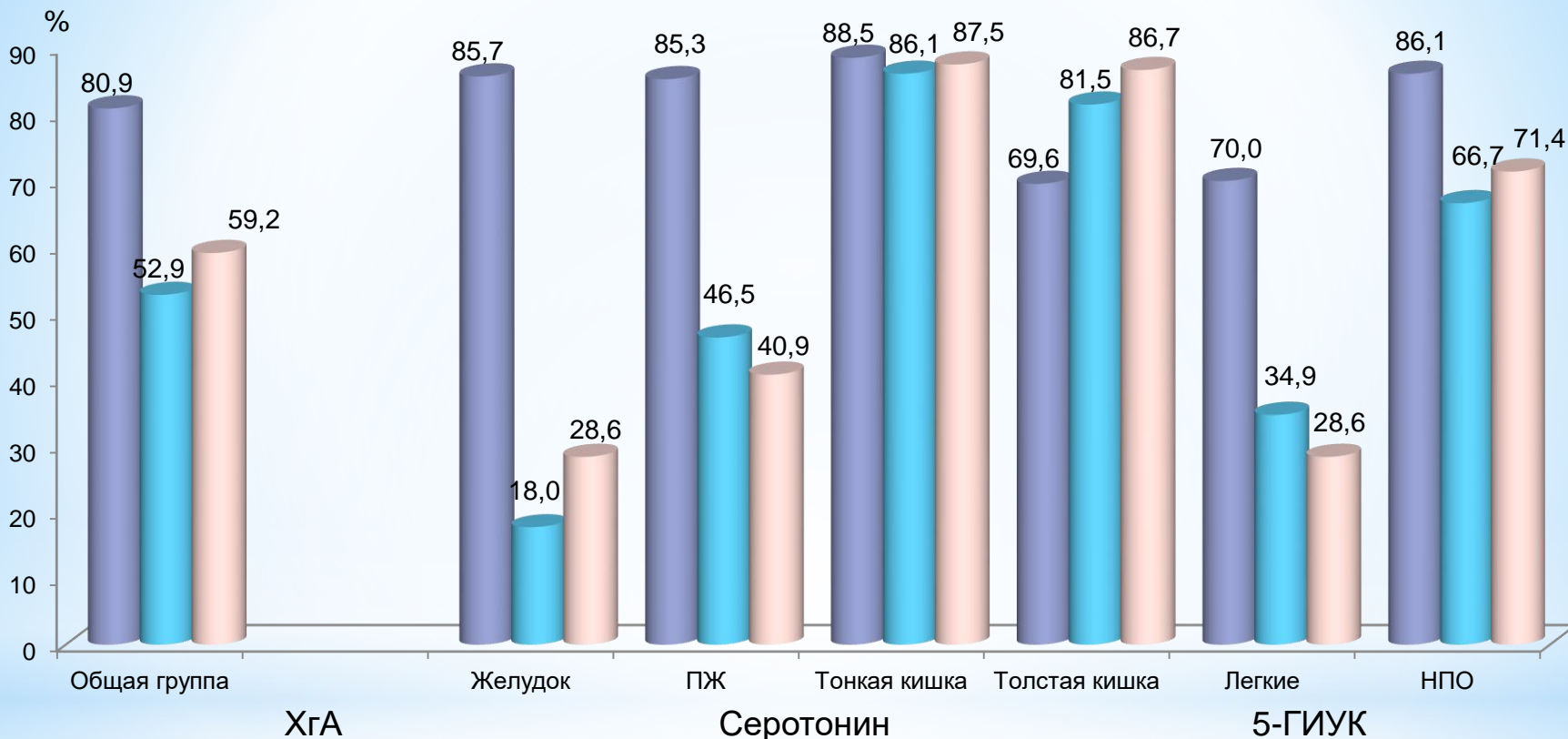
Зависимость уровней маркеров от клинических характеристик НЭО

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

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

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

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



Пороговый уровень: 33 Ед/л

Чувствительность: 69,6-88,5%

Специфичность: 98,5 %

Пороговый уровень: 320 нг/мл

Чувствительность: 18,0-86,1%

Специфичность: 94,5 %

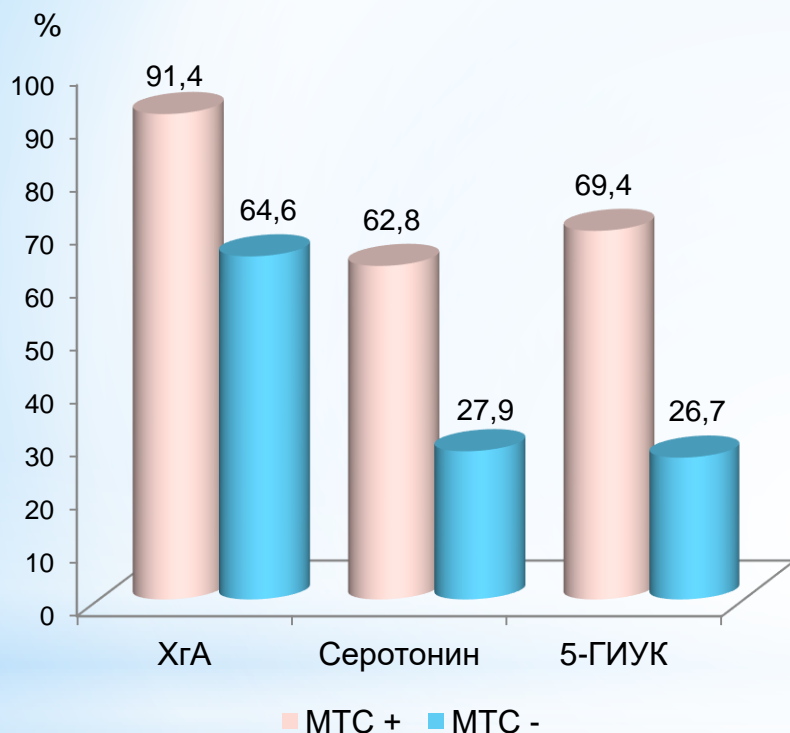
Пороговый уровень: 60 мкмоль/сут

Чувствительность: 28,6-87,5%

Специфичность: 94 %

Диагностическая чувствительность ХгА, серотонина и 5-ГИУК в зависимости от клинических характеристик НЭО

Метастазы в печени



Карциноидный синдром



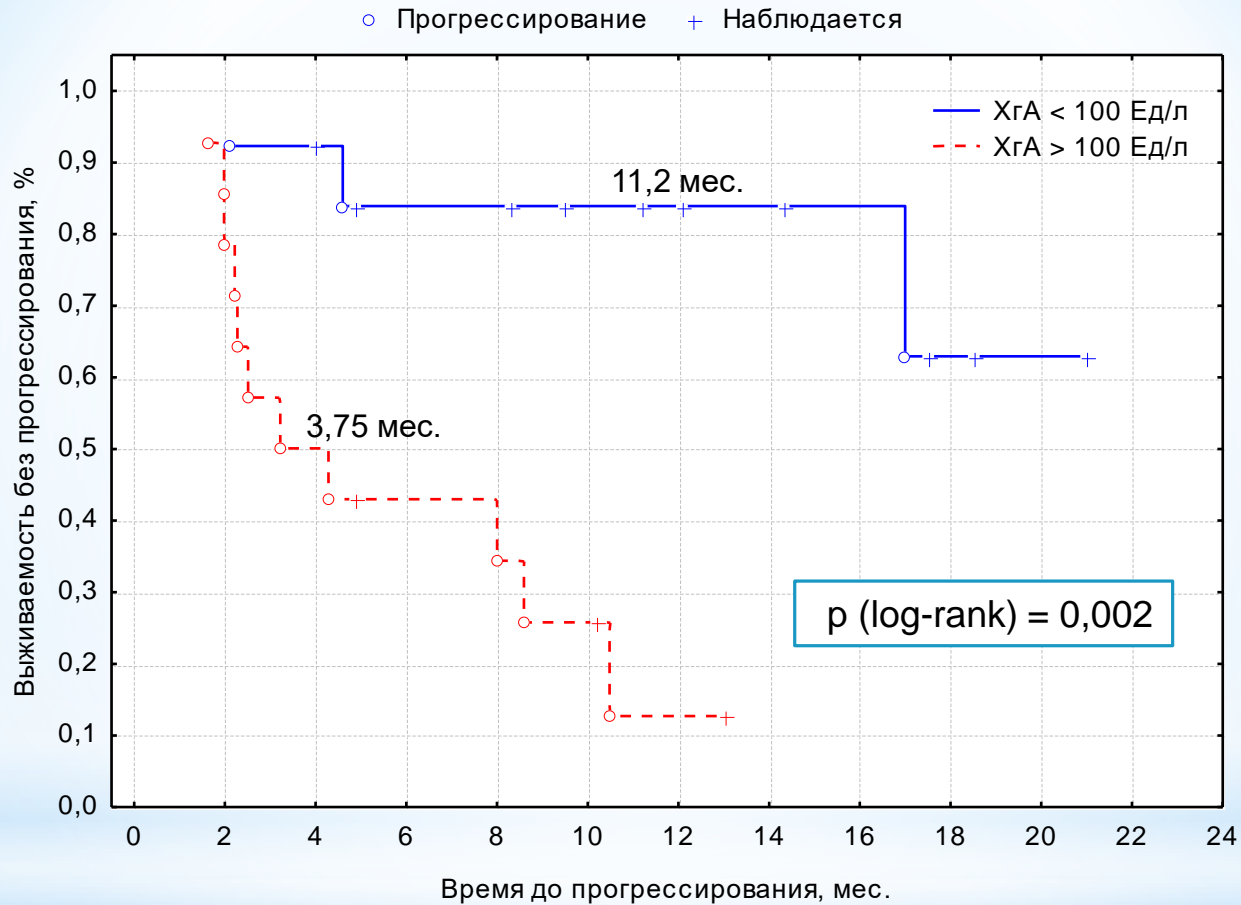
Серотонин и его метаболит 5-ГИУК - маркеры, ассоциированные с карциноидным синдромом, реализующимся, как правило, на фоне метастатического поражения печени.

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

Прогностическое значение ХгА

Исследуемые группы (n)	Прогностическое значение	Прогностически неблагоприятный пороговый уровень ХгА	Авторы
Пациенты со злокачественными карциноидами средней кишки (86)	Общая выживаемость	> 5000 мкг/л	Janson et al., 1997
Пациенты с метастатическими ГЭП-НЭО (344)	Общая выживаемость	≥ 200 Ед/л	Arnold R. et al., 2008
Пациенты с тяжелыми формами НЭО, получающие химиотерапию по схеме FCISt (82)	Выживаемость без прогрессирования	> 60 Ед/л	Turner N.C. et al., 2010
Пациенты с нерезецированными НЭО и прогрессированием заболевания в ходе цитотоксической терапии (эверолимус, октреотид) (160)	Выживаемость без прогрессирования	> 72,8 нг/мл	Oberg et al., 2011, RADIANT-1
Пациенты с НЭО поджелудочной железы низкой и средней степени злокачественности (410)	Выживаемость без прогрессирования	> 72,8 нг/мл	Oberg et al., 2011, RADIANT-3

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



Прогностическое значение ХгА с учетом порогового уровня

Значения ХгА

ХгА <100 Ед/л

ХгА > 100 Ед/л

1-летняя выживаемость

65,9%

13,7%

Клиническое наблюдение: Пациент В., 18 лет

Множественные МТС в печени из НПО (НЭО тонкой кишки G2). Карциноидный синдром. Карциноидное сердце.

Жалобы: на одышку при физической нагрузке, неустойчивый стул до 6 раз в сутки, приливы до 3 и более раз в день, общую слабость

Лечение у гастроэнтеролога без эффекта

Метаастазы в печени

Гиперемия (приливы)

Вегето-сосудистые нарушения

Абдоминальные симптомы

0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 лет

Октреотид
Октреотид лонг (20мг)
Без эффекта

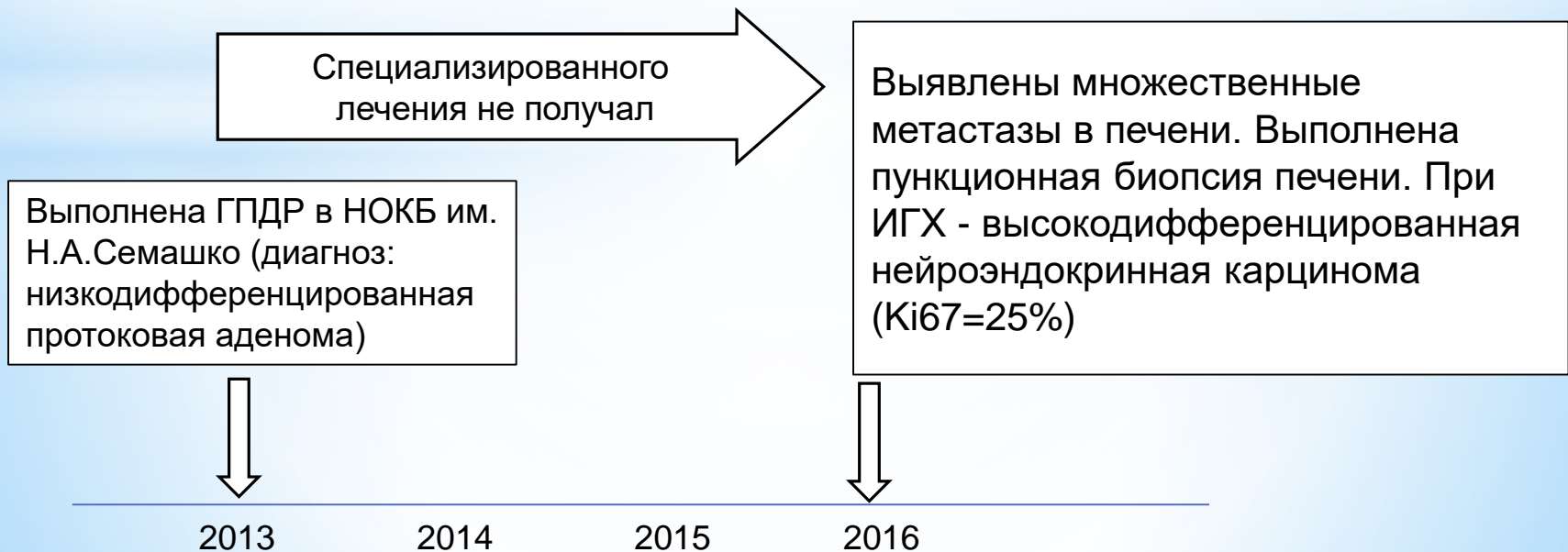
Маркеры	11.03.16	11.04.16
ХгА	38188	34763
Серотонин	2331	2104
5-ГИУК	3732	
pro-BNP	1270	
СТХ	0,8	

↑ ХгА > 350x
↑ Серотонина > 12x
↑ 5-ГИУК > 60x
↑ Pro-BNP > 7x

Клиническое наблюдение: Пациент Г. 48 лет.

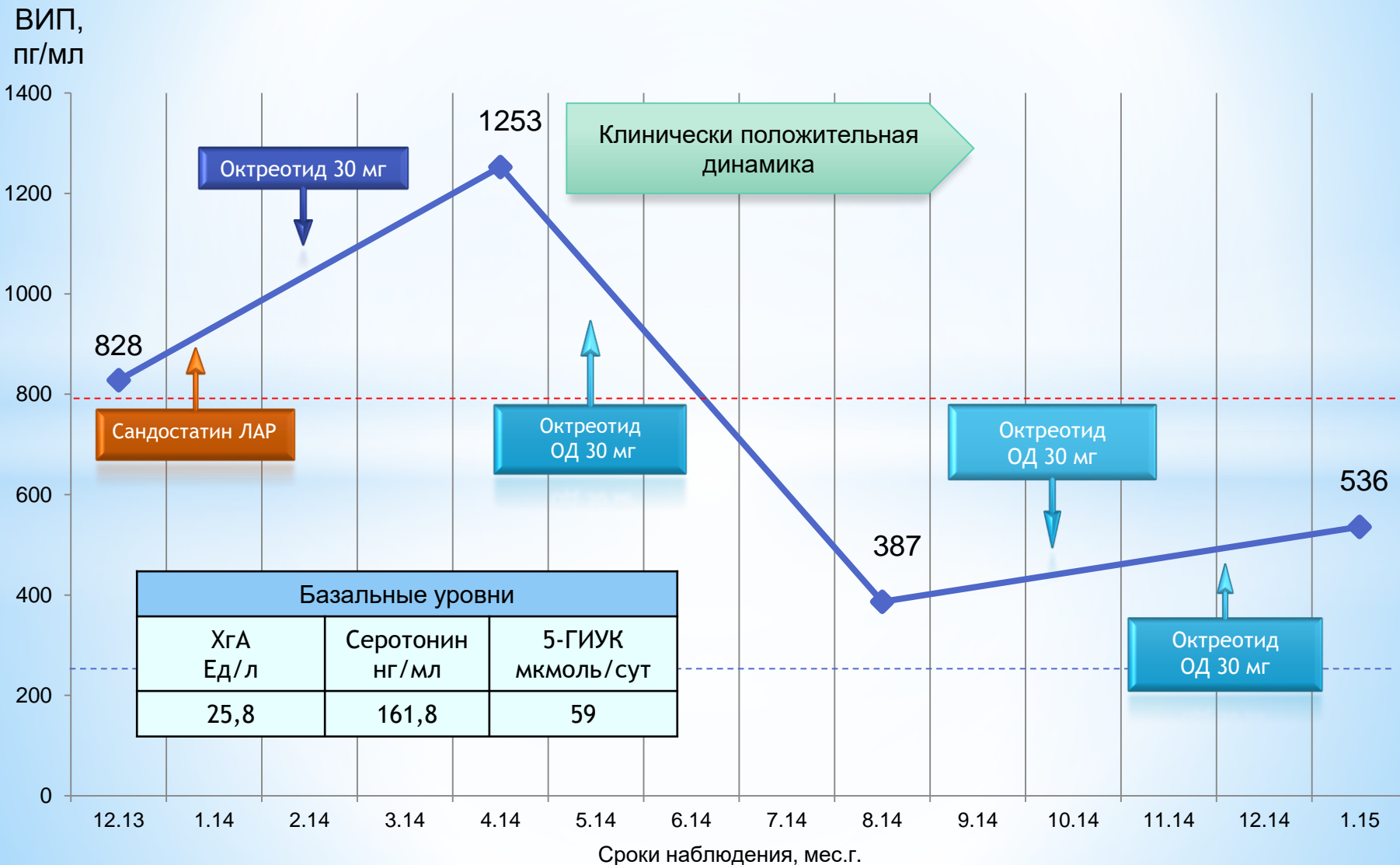
2016 г.: НЭО поджелудочной железы. Метастазы в печени. Панкреатогенный сахарный диабет. Диабетическая дистальная сенсорно-вегетативная полинейропатия.

ХгА	109458	↑ > 1000
Серотонин	1290	↑ > 4
Панкреатический полипептид	2286	↑ > 2,5

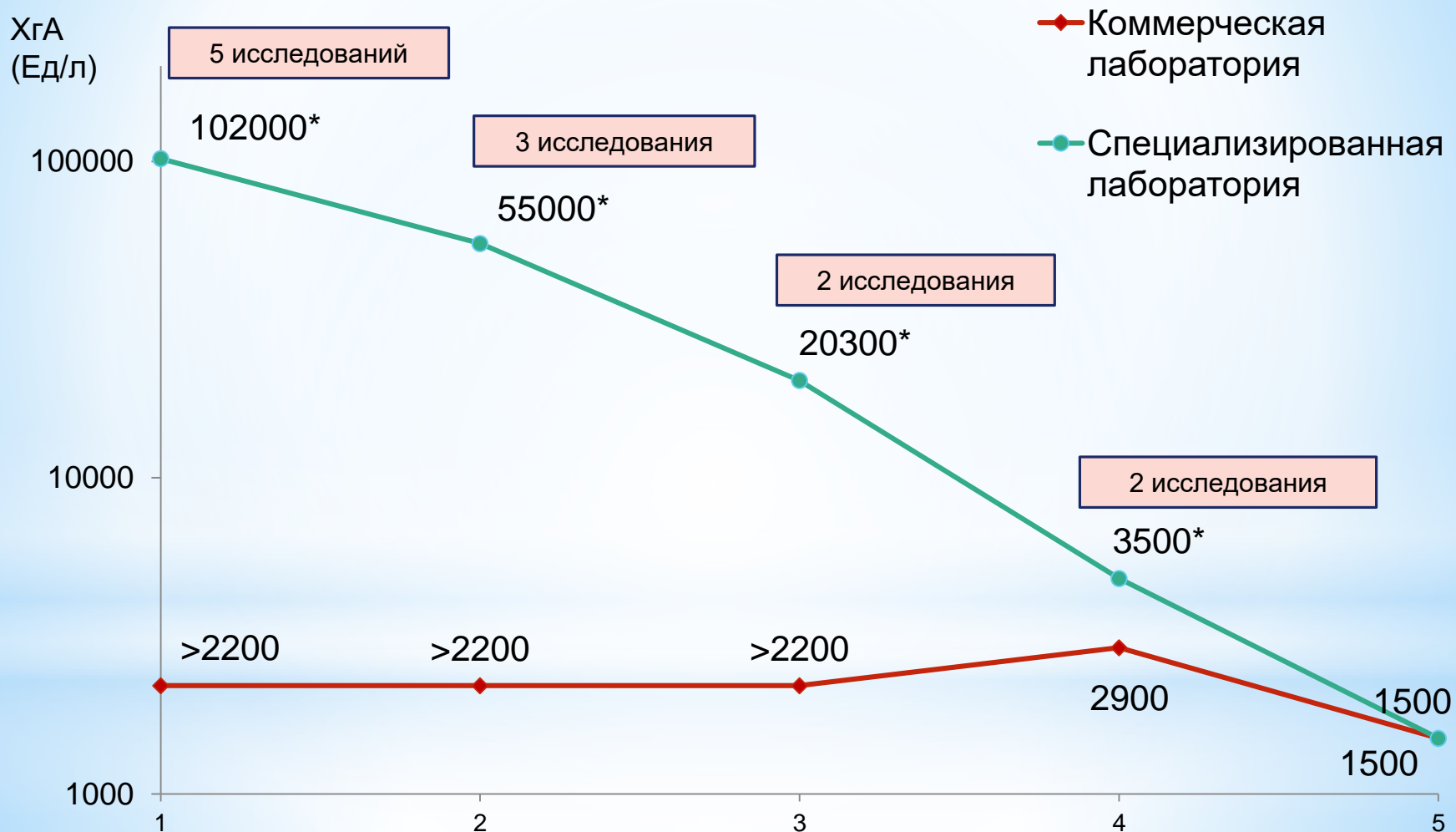


Клиническое наблюдение: Пациент В., 68 лет

НЭО G2 поджелудочной железы (випома), МТС в печени, карциноидный синдром



Влияние аналитических факторов на результаты определения ХгА при мониторинге НЭО



* Выполнялись дополнительные разведения образца сыворотки крови

ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: biochemical markers

General Remarks on CgA:

- CgA is the most practical and useful general serum tumor marker in patients with NET;
- Elevated CgA can occur in normal individuals and in patients with non-NET tumors although the levels are usually lower than in patients with NET;
 - Sensitivity of elevated CgA varies according to NET tumor type and volume.

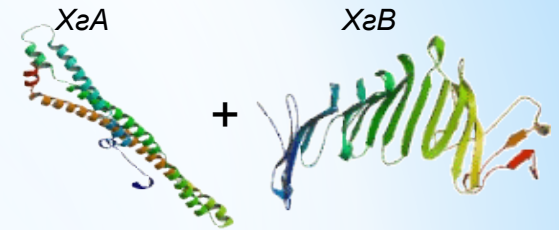
CgA Assays and Interpretation:

- Reference laboratories should be preferred for clinical samples assays;
- Reference intervals and individual patient results differ significantly between different chromogranin A assays and cannot be directly compared;
- Serial measurements should be performed using the same assay;
- If assays are changed, patients should undergo a new baseline measurement;
- False-positive results are possible in patients with hypergastrinaemia (especially on anti-secretory medications or chronic atrophic gastritis type A) and in the presence of heterophile antibodies (care in patients autoimmune disease or those sensitized to rodent proteins (mouse monoclonal antibodies));
- Where possible, proton pump inhibitors should be interrupted, leaving a clearance of at least 3 half-lives, prior to CgA plasma sampling.

Потенциальные маркеры НЭО

Расширение спектра маркеров НЭО: панкреастатин, ХгВ, ХгС

ХгВ – маркер НЭО комплементарный ХгА, не зависит от экзо- и эндогенных факторов, оказывающих влияние на ХгА¹
Диагностическое значение:
инсулинома, карциноид прямой кишки, НЭО легких



Панели антител при паранеопластических синдромах, ассоциированных с НЭО, могут быть включены в серологический скрининг типов НЭО (онконевральные антитела Anti-Ma2, ANNA-1, ANNA-2, Anti-amphiphysin) ²

Молекулярно-генетические методы:

Определение циркулирующих информационных РНК-транскриптов, продуцируемых НЭО, методом ПЦР в реальном времени позволяет выявлять прогрессирование на ранних стадиях. Мультигенный NETest (Fingerprints) дифференцирует НЭО и незлокачественную патологию с диагностической чувствительностью и специфичностью 92,8%. ³

Спасибо за внимание!



Лаборатория клинической биохимии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина»
Тел. 8-499-324-26-04

biochimia@yandex.ru