

Diagnostika neuroendokrinních nádorů - laboratorní vyšetření

Oldřich Louthan, IV. interní klinika, VFN, 1. LF UK Praha

Úvod

Negativní laboratorní výsledky neznamenaají nutně nepřítomnost nádoru, neboť se mohou uplatňovat některé faktory maskující jeho průkaz. Řada neuroendokrinních tumorů (NET) nevykazuje sekreční aktivitu anebo produkuje látky, které rutinně nestanovujeme. Navíc produkce některých hormonů může být epizodická a jejich hladina ve chvíli odběru může být nízká. Proto je věnována pozornost „transverzálním“ neuroendokrinním markerům (jako je chromogranin A), nezávislých na biologické aktivitě NET.

Markery se dělí dle jejich lokalizace v buněčných strukturách na **granulární** a **cytoplasmatické**. Lze je prokázat imunohistochemicky v tkáních či je lze detekovat v krvi jako cirkulující markery. Z hlediska diagnostiky NET se dělí na **specifické** a **nespecifické**.

Tab. Buněčné neuroendokrinní markery

Cytoplasmatické markery	cytokeratiny, vimentin, neurofilamenta neuron-specifická enoláza (NSE, gama-gama dimer) protein 7B2, protein gene product (PGP 9.5) protein S-100, synaptofyzin P38 synaptobrevin (VAMP-1), synapsin (1A, 1B, 2A, 2B)
Granulární markery	chromogranin A (protein secretory I) chromogranin B (sekretogranin I) chromogranin C (sekretogranin II) cytochrom b561, pankreastatin, vasostatin

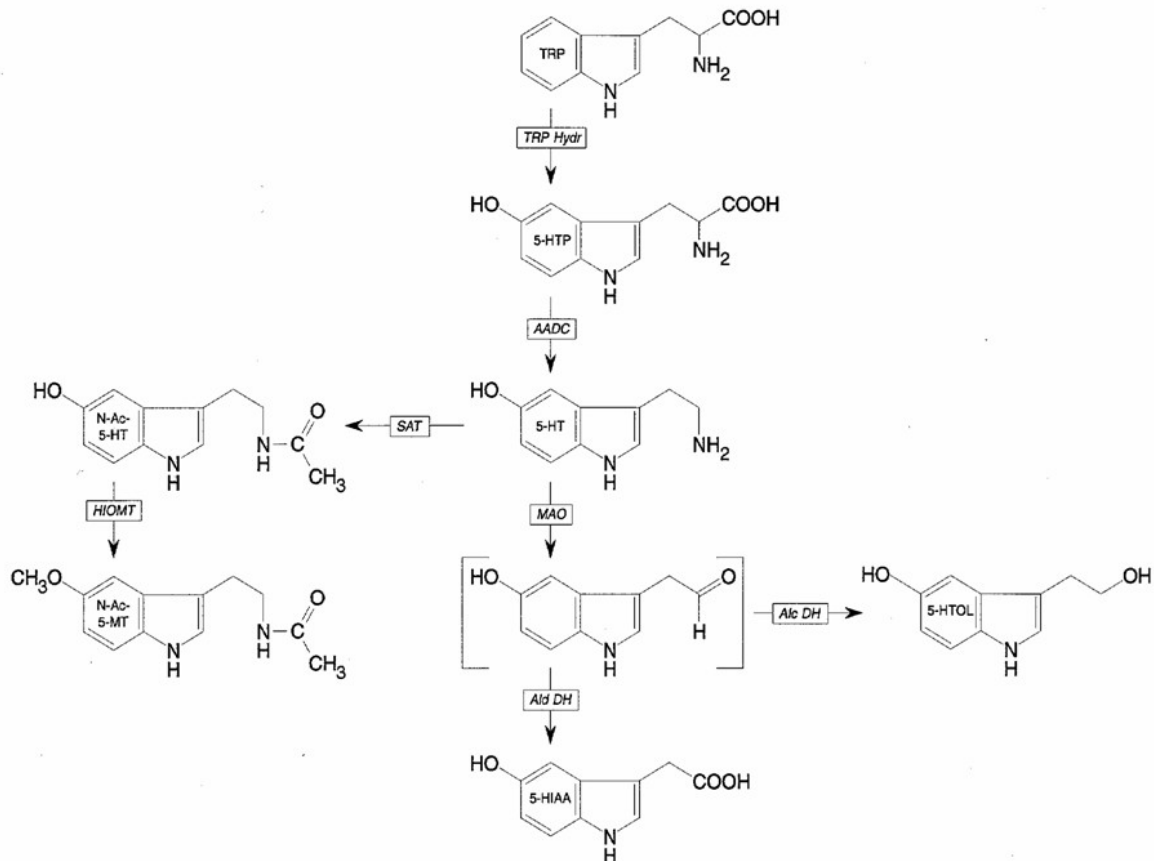
1. Specifické markery

Specifické markery se vztahují k detekci konkrétního, specifického NET. Přehled NET a vhodných markerů uvádí následující tabulka.

Neuroendokrinní tumor	Vhodný specifický marker	Nespecifický marker
Karcinoid	5-HIO v moči	Sérový chromogranin A
	Serotonin v séru, trombocytech	
Gastrinom	Sérový gastrin	
Insulinom	Insulin/proinzulin, C peptid	
Medulární karcinom thyreoidey	Kalcitonin	
Glukagonom	Plasmatický glukagon	
VIPom	Vasoaktivní intestinální peptid	
Feochromocytom	katecholaminy	

1.1 Stanovení serotoninu a jeho metabolitů

Metabolická dráha: Tryptofan (TRP) je metabolizován na 5-hydroxytryptofan (5-HTP) a dále na 5-hydroxytryptamin či serotonin (5-HT). V další fázi je serotonin metabolizován přes 5-hydroxyindolacetaldehyd na 5-hydroxyindolactovou kyselinu (5-HIAO). (AADC = dopadekarboxyláza, MAO = monoaminoxidáza, AldDH = aldehyddehydrogenáza)



Část serotoninu je vychytávána v sekrečních granulích v trombocytech, zbytek je transformován na 5-HIO. Tento metabolit je pak vylučován močí a může být detekován.

Pacienti s karcinoidy tvoří větší množství serotoninu. U midgut karcinoidů je tato produkce vysoká, následný odpad 5-HIO v moči nezřídka dosahuje hodnot nad 1000 mikromolů za den. U foregut karcinoidů jsou hodnoty nižší, někdy hraniční, v pásmu šedé zóny.

Nemocní s foregut karcinoidy vylučují hlavně 5-hydroxytryptofan, popřípadě serotonin produkovaný ledvinami, takže u těchto typů tumorů je zvýšení 5-HIO v moči jen mírné. Tyto nádory se vyznačují deficitem enzymu dopa-dekarboxylázy (EC 4.1.1.28).

1.2 Laboratorní vyšetření serotoninu:

Serotonin lze stanovit enzymoimunoanalytickým stanovením (EIA) v séru, plasmě, plné krvi, moči, mozkomíšním moku, v tkáních.

a) stanovení hladiny serotoninu v krvi: Nevýhoda vyšetření tkví v kolísání hladin serotoninu v plasmě, takže výsledek dosti závisí na čase odběru.

b) stanovení serotoninu v trombocytech: V trombocytech se ukládá serotonin, takže z části odpadá problém kolísání hladiny.

Normální hodnoty v séru u mužů jsou 300-700 nmol, ženy: 500-900 nmol, plasma bohatá na destičky vykazuje normální hodnoty 1000-2500 nmol, plasma chudá na destičky 4-25 nmol. Hodnoty mohou být mírně odlišné podle výrobce diagnostických setů.

1.3 Serotonin u atypických karcinoidových syndromů: Foregut karcinoidy (zejména plicní) vyvolávají atypické karcinoidové syndromy se zvýšenou hladinou 5-hydroxytryptofanu v séru, ale s normální hladinou serotoninu v séru v důsledku deficitu enzymu DOPAdekarboxylázy. V moči jsou hodnoty serotoninu vyšší, neboť část 5-hydroxytryptofanu je fyziologicky dekarboxylována v ledvinách a střevech a vylučována jakožto serotonin. V případě, že u klinicky suspektního karcinoidu je normální hladina 5-HIO, je vhodné dle možnosti laboratoře vyšetřit močové metabolity tryptofanu. Pacienti mají vyšší odpady serotoninu a 5-hydroxytryptofanu, ale normální či lehce zvýšené hodnoty 5-HIO.

	5-hydroxytryptofan (5-HTP)	5-hydroxytryptamin (5-HT) (serotonin)	5-HIO
sérum	↑	N	--
moč	↑	↑ (vznik z 5-HTP z ledvin, střev)	N až ↑

1.4 Vyšetření kyseliny 5-hydroxyindoloctové (5-HIO)

5-HIO se stanovuje spektrofotometricky v moči. Na našem pracovišti jsou normální hodnoty koncentrace do 25 umol/litr moče a odpady do 50 umol/denně. Normální rozpětí hodnot může být mírně odlišné podle konkrétní laboratoře. Důležitější v hodnocení je **hodnota odpadu**, nežli koncentrace 5-HIO. 5-HIO je vyšetřována po 3 denní dietě, která neobsahuje potraviny či léky, které by falešně zvyšovaly hladinu serotoninu, a v následujících 24 hodin pacient sbírá moč do nádoby s přidanou kyselinou chlorovodíkovou. Je třeba dodržet přesný 24-hodinový sběr moči. Obvykle počítáme aritmetický průměr ze dvou hodnot vyšetření 24 hodinových, po sobě jdoucích sběrů moči.

(a) Hodnoty odpadů od 50 do 80 umol/denně považujeme za málo průkazné, jde o tzv. šedou zónu. Hodnoty mezi 80-150 umol/den jsou nejednoznačně patologické, přičemž je evidentní, že čím je hodnota v tomto rozpětí vyšší, tím je přítomnost karcinoidu pravděpodobnější.

V případě karcinoidů některá pracoviště včetně našeho považují za jasně patologické hodnoty 5-HIO >130 umol/den (cut-off hodnoty) u zejména diferencovaných, hormonálně aktivních midgut tumorů (na našem pracovišti nejvyšší zaznamenaná hodnota 5-HIO byla 3400 umol/den u karcinoidu tenkého střeva.

(b) U foregut karcinoidů vidíme hodnoty i nižší, odpady jsou od 50-150 umol/den

(c) U hindgut tumorů (NET distální části tlustého střeva a rekta) bývají odpady vždy normální.

1.5 Vztah hladiny 5-HIO a velikosti nádorové masy: Existuje pozitivní korelace mezi sumární hmotností nádoru a hladinou 5-HIO v moči. Vyšetření slouží i k monitorování průběhu a efektivity léčby, případné pooperační recidivy anebo progresu po předchozí úspěšné responsi na konzervativní terapii. 24-hodinový sběr moči na vyšetření 5-HIO zůstává dosud nejběžnější biochemickým vyšetřením u karcinoidů.

1.6 Zvýšené odpadů HIO vlivem potravy: Zvýšení odpadů 5HIO v moči mohou vyvolat různé potraviny a poživatiny. Pro ilustraci tabulky viz dle Feldmana, Duke University USA).

Tab. Zvýšení odpadu 5-HIO v moči v mg za 24 hodin po požití potravin s vysokým obsahem serotoninu:

Potravina	Potrava s vysokým obsahem serotoninu (levý sloupec), odpady 5-HIO mg/24 hod	Konvenční dieta, odpady 5-HIO mg/24 hod
32 černých vlašských ořechů (amerických vlašských ořechů, <i>Juglans nigra</i>)	59,0 mg/den (308 umol/den)	7,0 mg/den (36,6 umol/den)
16 černých vlašských ořechů	26,0 mg/den (136 umol/den)	3,7 mg/den (19,4 umol/den)
½ ananasu běžné velikosti	12,0 mg/den (63 umol/den)	6,0 mg/den (31,81 umol/den)
4 banány	15,0 mg/den (78,5 umol/den)	5,0 mg/den (26,15 umol/den)

Tab. Obsah serotoninu v různých potravinách:

Potraviny s vysokým obsahem serotoninu > 3 µg/g	
butternut (plod ořešáku popelavého)	398 µg/g
černý vlašský ořech	304 µg/g
vlašský ořech	87 µg/g
ořechy hickory –shagbark nut (<i>Carya ovata</i>)	143 µg/g
ořechy pekan	29 µg/g
banány (pisang apod.)	30,0 µg/g
ananas	17,0 µg/g
ovoce kiwi	5,8 µg/g
švestky	4,7 µg/g
rajčata	3,2 µg/g

Tab. Obsah serotoninu v různých potravinách

Potraviny se středním obsahem serotoninu 0,1 – 3,0 µg/g	
avokádo	1,5 µg/g
datle	1,7 µg/g
grapefruit	0,9 µg/g
ananasový meloun	0,9 µg/g
olivy	0,2 µg/g
baklažán, lilek jedlý	0,2 µg/g

Tab. Obsah serotoninu v různých potravinách

Potraviny s nízkým obsahem serotoninu < 0,1 µg/g
Různé plody: pistáciové ořechy, muškátové oříšky, slunečnicová semínka, jahody, borůvky, ostružiny, brusinky, jablka, třešně, mango, hrušky, broskve, pomeranč, citron, mrkev, okurky, hlávkový salát, limetky
Další potraviny s velmi nízkým obsahem serotoninu < 0,1 µg/g: různé druhy masa, pečená šunka, pečené kuře, ryby, sýr parmezán, obilniny, rýže, brambory, káva, čaj, mléko

Je nutno uvážit množství požitých potravy, neboť i potraviny se středním či nižším obsahem serotoninu, požitá ve větším množství, mohou významně zvýšit hladinu serotoninu a tedy odpady 5-HIO v moči. Obsah serotoninu v potravinách může též kolísat.

1.6 Neonkologická onemocnění zvyšující hladiny 5-HIO: malabsorpční stavy (celiakie, syndrom slepé kličky), Whippleova choroba, ovískový typ malobuněčného karcinomu plic.

Snížené hodnoty 5-HIO: Deprese, resekce tenkého střeva, mastocytóza, fenylketonurie.

Léky zvyšující hodnoty 5-HIO v moči: Léky obsahující guaifenesin, acetaminofen, salicyláty (i mesalazin), naproxen, L-DOPA, atenolol, fluorouracil, melphalan, alkaloidy.

Léky snižující hodnoty 5-HIO: Kortikotropin, etanol, imipramin, izoniazid, levodopa, metyldopa, fenothiaziny, tricyklická anidepresiva, inhibitory monoaminoxidázy (MAO).

2. Nespecifické nádorové markery

Absence symptomů neposkytuje vodítko k výběru specifických nádorových markerů. K průkazu přítomnosti NET jsou proto výhodné nespecifické nádorové markery, které s velkou pravděpodobností signalizují přítomnost NET, ale samy o sobě nepodávají bližší informaci o vlastnostech vyšetřovaného NET. K nespecifickým markerům patří pankreatický polypeptid, neuron-specifická enoláza a α -podjednotka glykoproteinových hormonů. Pro praxi je nejcennější sérový chromogranin A (S-CgA).

2.1 Pankreatický polypeptid (PP) je vytvářen PP buňkami pankreatických ostrůvků a disperzně uloženými buňkami ve střevní sliznici. Zvýšené hladiny v plasmě bývají v 60 %

případů pankreatických endokrinních nádorů a ve 40 % případů bronchiálních karcinoidů. PP může být zvýšen např. u průmů různé etiologie a u diabetiků. Může být produkován i některými zánětlivými onemocněními a může být zvýšen u chronické renální insuficience.

2.2 Alfa a beta podjednotka lidského choriogonadotropinu (bHCG): hCG a jeho podjednotky jsou specifickými markery pro karcinomy pankreatických ostrůvků. Foregut a hindgut karcinoidy také někdy produkují podjednotky HCG-alfa. Obě podjednotky vidáme i u midgut karcinoidů, ale v nízkém procentu. Vyšetření se běžně u NET neprovádí.

Nádorové markery u jednotlivých typů karcinoidů (podle Jansonové)

Nádorové markery	Typy karcinoidu (n = 301)		
	Foregut (žaludek, aplice, pankreas)	Midgut (tenké střevo)	Hindgut (dist. tlusté střevo, rektum)
5-HIO v moči	31 %	76 %	0 %
P-chromogranin A	79 %	87 %	100 %
P-neuropeptid K	9 %	46 %	0 %
α-HCG	35 %	11 %	100 %
β-HCG	0 %	8 %	0 %

2.3 Neuron specifická enoláza NSE: Neuron specifická enoláza je jeden z 5 izoenzymů glykolytického enzymu enolázy (2-fosfo-D-glycerát hydroláza). Je složená z 3 podjednotek: a, b, g (či: alfa, beta, gama). Enzym existuje v několika dimerických izoenzymech (aa, ab, bb a gg). Enoláza ag a gg je známa jako **neuron-specifická enoláza**, neboť byla původně zjištěna v neuronech a neuroendokrinních buňkách. Jde o cytoplasmatický glykolytický enzym, gama-gama dimer glykolytického enzymu enolázy.

Používá se jako imunohistochemický a sérový marker. Je exprimován neuroendokrinními buňkami a nádory. (a) Při porovnání sérové hladiny neuronspecifické enolázy (NSE) a imunohistochemicky prokázané přítomnosti NSE v tkáni nebyl shledán významný vztah. (b) Nebyl prokázán vztah mezi rozsahem nádoru a zvýšením hladin NSE, na rozdíl od CgA. (c) Elevace NSE se objevuje při porušení integrity buněčné membrány, zvýšení NSE lze proto očekávat spíše u agresivnějších, rychleji rostoucích a méně diferencovaných forem NET, např. u malobuněčného karcinomu. Byla prokázána asociace mezi hladinami NSE a rozsahem nekróz tumoru. (d) Test může sloužit jako i prediktor odpovědi na léčbu.

Množství NSE nekoreluje s granulární denzitou dané tkáně. Je vhodným markerem pro diagnostiku chudě granulovaných neoplazií, jakými jsou málo diferencované neuroendokrinní karcinomy. Vysoké hodnoty nacházíme u malobuněčného plicního

karcinomu v pokročilém stadiu než u limitovaného onemocnění. Falešně vyšší hodnoty bývají u renální insuficience. Pro diagnostiku NET gastroenteropankreatického okruhu a nemalobuněčných plicních tumorů nevykazuje však enzym vysoký stupeň diagnostické přesnosti a někteří jej v diagnostice NET vůbec nepoužívají.

2.4 Chromograniny a další příbuzné peptidy

Patří do skupiny granulárních markerů. Nejvýznamnější z této skupiny je chromogranin A. Chromograniny jsou přítomny v neuroendokrinních a nervových tkáních. Jsou skladovány ve velkých denzních vezikulách obsahujících proteiny a proteinové hormony. Všechny chromograniny mají sekvence několika dibázických aminokyselin, které fungují jako štěpitelná místa pro proteolytické enzymy. Tvoří prekurzory pro různé biologicky aktivní peptidy, jako pankreastatin a vasostatiny.

Chromograniny představují skupinu kyselých, solubilních sekrečních proteinů. Zahrnují chromograniny A, B, C, sekretograniny III-VI:

Tyto proteiny mají společnou distribuci v sekrečních granulích normálních endokrinních a nervových buňkách a společné vlastnosti: mj. termostabilitu, schopnost vázat s mírnou afinitou kalcium a agregovat v jeho přítomnosti, schopnost glykosylace a fosforylace

Vzhledem k nadbytku chromograninů v neuroendokrinních tkáních, jsou tyto proteiny pravděpodobně zapojeny do četných intracelulárních a extracelulárních biologických procesů. Na intracelulární úrovni hrají mj. roli v uskladňování a sekreci hormonů a peptidů.

2.5 Chromogranin A

2.5.1. Charakteristika: CgA je kyselý, hydrofilní protein o molekulové váze 48 kDa, obsahuje 439 aminokyselin. CgA je produkován výlučně endokrinními a neuroendokrinními buňkami, které obsahují chromafinní sekreční granule s denzním jádrem..

Protože jsou graniny ukládány a secernovány společně s peptidovými hormony produkovány neuroendokrinními buňkami, mohou graniny sloužit jako cirkulující marker. CgA je ubikvitní v neuroendokrinních tkáních, jeho exprese je provázána koexpesí polypeptidového hormonu či buněčně specifického neurotransmiteru. Nacházíme jej v neuronech a centrálním nervovém systému a periferních sympatických neuronech. Jiné orgány bohaté na CgA jsou např. příštítná tělíska, exokrinních buňky pankreatu, buňky produkující inzulín a glukagon. CgA lze zjistit i v disperzním neuroendokrinním systému

v orgánech, které nemají klasickou endokrinní funkci, např. v plicích. Hlavní zdroj sekrece chromograninu A je dřev nadledvinek.

Hladiny CgA lze stanovit pomocí radioimunoesejí (RIA), za pomoci ELISA metody (enzyme-linked immunosorbent assay) a nověji pomocí imunoradiometrické eseje (IRMA).

Určité problémy při laboratorním stanovení vznikají vzhledem k proteolytickému štěpení molekuly CgA a následné heterogenitě cirkulujících fragmentů.

2.5.2 Diagnostická aplikace v imunohistochemii, chromogranin A jako tkáňový marker

Ve tkáňových vzorcích umožňuje průkaz CgA potvrdit neuroendokrinní povahu těchto nádorů. CgA je imunohistochemický marker pro NET. Pozitivita na CgA a synaptofyzin je minimálním předpokladem pro histochemické potvrzení neuroendokrinní povahy nádoru.

2.5.3 Využití chromograninu A jako neuroendokrinního sérového markeru:

1. Tam, kde není k dispozici jiný marker, u endokrinně nefunkčních neuroendokrinních nádorů.
2. Tam, kde je jiný marker z určitých důvodů nespolehlivý, nestabilní anebo se jeho hladiny rychle mění. Např. vyšetření serotoninu a hladiny 5-hydroxyindolové kyseliny ve 24 hodinovém sběru moči u pacientů s karcinoidy anebo vyšetření katecholaminů a jejich degradačních produktů v moči u feochromocytomu.
3. Poměrně vysoká senzitivita
4. CgA zvýšen u NET a jejich metastáz bez ohledu na jejich lokalizaci
5. Hladina CgA zhruba koreluje s nádorovou masou.
6. CgA je nezávislým prediktorem přežití.
7. Koncentrace CgA při léčbě je závislá na efektu terapie; lze tedy hodnotit responsi na léčbu.

CgA je vhodný v těch případech, kdy nádor neprodukuje hormony anebo tam, kde se hladiny markerů rychle mění, jako kupř. hladiny katecholaminů a hladiny serotoninu.

Použití CgA je ve třech různých situacích: (a) v diagnostice (b) v hodnocení vývoje onemocnění (c) v hodnocení response na léčbu.

U většiny CgA produkujících nádorů jsou hladiny cirkulujícího peptidu výrazně nad hranicí normy a výskyt falešně pozitivních a falešně negativních výsledků nebývá častý. Nejčastějším důvodem falešně pozitivních nálezů je renální insuficience. Jinak ani intenzivní sympatiko-adrenální stimulace nezvyšuje hladinu S-chromograninu více než 2x, kdežto hladiny naměřené u NET mnohonásobně překračují pásmo normy.

2.5.4. Normální hodnoty CgA: U zdravé populace je rozdíl v hladinách CgA mezi sérem a plasmou. Podle laboratoře VFN Praha je normální hladina v séru 19,4 – 98,1 ng/ml. Minimální detekovatelná koncentrace je 2,1 ng/ml. CgA se vyšetřuje v séru nebo v plasmě. Při vyšetření plasmy zjišťujeme vyšší hodnoty.

2.5.5 Výsledky CgA u NET zažívacího traktu:

CgA je vhodný pro vyšetření nádorů **endokrinně nefunkční**, u kterých nemáme k dispozici jiný marker, ale je vhodný i pro **NET endokrinně funkční**, neboť odpadají problémy spojené s jinými markery (přesný sběr moči; farmakologická interference, spolupráce pacienta, dieta). Podobně to platí i pro foregut či hindgut karcinoidy, u kterých hladina 5-HIO může být jen mírně zvýšena anebo to platí pro endokrinně němé tumory, u kterých není k dispozici žádný spolehlivý laboratorní test. Nejvyšší hladiny CgA byly u NET zažívacího traktu prokázány u střevních midgut karcinoidů a pankreatických islet-cell tumorů. Vyšetření CgA může sloužit jako spolehlivá metoda k monitorování vývoje choroby, neboť bylo zjištěno, že při progresi onemocnění došlo k nárůstu CgA v 83 % případů. Hladiny CgA reflektují odpověď tumorů na léčbu IFN alfa či somatostatinovými analogy.

CgA a gastrinomy: Názory na validitu CgA se zde liší, někteří autoři zjistili vztah mezi CgA a koncentrací cirkulujícího gastrinu, jiní naproti tomu asociaci mezi CgA a gastrinem neprokázali. Pokles hladin CgA po operačním odstranění gastrinomu vysvětlovali tím, že CgA byl produkován hlavně enterochromafinními buňkami žaludku, nikoli gastrinomem paralelně s gastrinem. Pooperační pokles byl podle těchto autorů způsoben resekci části žaludku a nikoli gastrinu.

Feochromocytom: CgA je uvolňován spolu s katecholaminy z chromafinních granul buněk feochromocytomu. Senzitivita je asi 83 % a specificita 96%. Kombinace vyšetření CgA a katecholaminů má pozitivní prediktivní hodnotu pro přítomnost tumoru až 91 %. Hladina CgA zhruba reflektuje velikost nádoru a celkovou produkci katecholaminů. Nenastává interference s léky, užívanými k diagnóze či léčbě. CgA je tedy vhodnou doplňkovou metodou ke specifickým laboratorním testům. Dle některých autorů má ale CgA nižší specificitu pro vyloučení feochromocytomu, neboť i malé renální poškození zkreslí výsledek. Nicméně vyšetření CgA má svůj význam v diferenciální diagnostice feochromocytomu jako příčiny sekundární hypertenze v odlišení esenciální hypertenze.

Neuroendokrinní nádory plic: Jde o karcinoidy (typické nebo atypické) a malobuněčné plicní karcinomy. Hladina CgA je v korelaci se stupněm onemocnění a celkovou hmotností nádoru. U extenzivní choroby byla hladina CgA zvýšena v 72 %, u limitovaného onemocnění v 52 %. Validnějším markerem pro diagnostiku NET plic je však neuron-specifická enoláza; význam vyšetření CgA však tkví v odhadu response na léčbu a na sledování nemocných. U většiny nemocných, u kterých nebyla response na chemoterapii, docházelo během léčby ke zvyšování hodnot CgA a u 1/2 případů byl tento nárůst zjištěn s předstihem ještě před nástupem klinických známek recidivy onemocnění.

Změny hladin CgA u dalších nádorů: CgA může být mírně zvýšen i u neendokrinních tumorů. Neuroendokrinní buňky mohou být roztroušeny v některých nádorech anebo v jejich tkáních vytvářet malé shluky. **Prostatické adenokarcinomy** exprimují společně CgA a prostatický specifický antigen. Neuroendokrinní diference v karcinomu signalizuje resistenci na léčbu a horší prognózu.

Podobně mají horší prognózu **kolorektální karcinomy** obsahující četné neuroendokrinní buňky. Naproti tomu pacienti s adenokarcinomy pankreatu či nemalobuněčnými karcinomy plic s NE buňkami mají údajně lepší prognózu.

2.5.6 Validita vyšetření CgA:

Senzitivita CgA je v souhrnu 70-95% a specificita 70-80% CgA u NET. Hladina CgA je zvýšená v 70-100 % u funkčních i nefunkčních tumorů. Nejvyšší přesnost vyšetření je u nádorů s intenzivní sekretorickou aktivitou, zejména u metastazujících midgut karcinoidů, i když přesnost je vysoká i u nefunkčních neoplazií (viz tabulku). V témže souboru byla zvýšena 5-HIO v 76 % midgut karcinoidů, v 31% foregut karcinoidů a v 0% u hindgut karcinoidů (Jansonová, 1996).

CgA je dosti senzitivní marker, ale jeho specificita, pokud jde o jednotlivé typy NET, není vysoká (nemůže odlišit např. karcinoidy od gastrinomů apod.). Proto v rámci diferenciální diagnózy je zapotřebí doplnit vyšetření dalších markerů.

Tab. Validita chromograninu A jako markeru neuroendokrinních nádorů (podle Ferrariho 1998)

NET	Validita
Midgut karcinoidy	87 %
Foregut karcinoidy	79 %

Tumory buněk pankreatických ostrůvků	72 – 100 %
Nefunkční tumory buněk pankreatických ostrůvků	62 %
Gastrinomy	100 %
Hindgut karcinoidy	Téměř 100%
Feochromocytom	80 – 90 %
Medulární karcinom štítné žlázy	50 – 100 %

2.5.7 Korelace CgA s hmotností nádoru, jeho histotypem a biologickou aktivitou:

Existuje korelace mezi celkovou hmotností nádoru a plasmatickou hladinou CgA a dále korelace mezi denzitou sekrečních granul v nádorové tkáni a sérovou expresí CgA. V případě metastazujících midgut karcinoidů jsou hladiny S-CgA vyšší u nemocných s mnohočetnými jaterními metastázami v porovnání s pacienty s ojedinělými metastatickými ložisky či s metastázami pouze v lymfatických uzlinách.

Dále existuje vztah k histotypu, kdy nejvyšší hodnoty exprimuje karcinoid, kdy byly popsány i hodnoty v tisícinásobcích normálních hodnot. U malých tumorů (př. inzulinomu) není CgA příliš senzitivní test. U malých gastrinomů zmíněná korelace neplatí, neboť se předpokládá, že CgA elevaci vyvolává nejen tumor, ale i ECL buňky žaludku, které jsou hyperplastické vlivem chronické hypergastrinémie. Naproti tomu byly málokdy popsány zvýšené hladiny u malých neuroendokrinních nádorů typu inzulinomu, paragangliomů.

2.5.8 CgA jako prognostický faktor: V mnohorozměrné analýze (Janssonová et al.) byla vysoká hladina CgA a pokročilý věk nezávislým prediktorem celkového přežití. Vyšší hladiny CgA signalizují pokročilejší chorobu a větší celkovou nádorovou masu. U midgut a hindgut NET je výška hladiny CgA v korelaci s nádorovou masou a invazivitou nádoru.

Hladina CgA u nemocných s midgut karcinoidy je nezávislým prognostickým faktorem špatné prognózy u pokročilých stavů. Öberg pozoroval korelaci mezi CgA a proliferačním markerem Ki-67, volnější korelaci mezi CgA a tumorem uvolňovanými substancemi. CgA je proto zřejmě spjat spíše s proliferační aktivitou než se sekretorickou schopností nádoru.

Tyto závěry neplatí pro gastrinomy. Autoři proto doporučují používat CgA k **hodnocení radikality operačního výkonu** u NET s výjimkou gastrinomu.

2.5.9 Změny hladin CgA u neonkologických stavů: Lehké zvýšení bylo zjištěno v postmenopauzálním období, zřejmě v rámci zvýšení gonadotropinů. Vyšší hladiny CgA bývají **zdravých těhotných žen**. Zde je CgA produkován placentou.

Rychlý vzestup hladin CgA je důsledek zahájení léčby **nízkými dávkami omeprazolu**. Při běžné klinické situaci proto není důvod pro následné intenzivní vyšetřování, dokud není zvýšení CgA znovu zhodnoceno anebo pokud není vysazen PPI.

Falešné pozitivní či falešně zvýšené hodnoty CgA jsou též u nemocných se **střevními záněty** či s **atrofickou gastritidou**. U těžší **jabatní insuficience** jsou lehce zvýšeny hodnoty CgA.

Renální insuficience: Byly pozorovány vyšší hladiny CgA, bez ohledu na fakt, zda je u renální léze přítomna sekundární hypertenze či nikoli. Toto navýšení je způsobeno klesající clearance tohoto peptidu. Je proto zapotřebí při hodnocení hladin CgA znát i stav renálních funkcí, a to nejen sérového kreatininu, ale i clearance kreatininu.

2.5.10 Sympatikoadrenální aktivita u CgA: Během intenzivní aktivity sympatikochromafinního systému fyzickým cvičením, u hypoglykemií či u některých hypertoniků dochází k uvolnění CgA spolu s adrenalinem a noradrenalinem z chromafinních buněk dřene nadledvin či ze sympatických postgangliových neuronů. To může působit rušivě v interpretaci nálezu, ale navýšení nebývá vyšší nežli dvojnásobek horního pásma normální hodnoty. Zvýšení hladiny CgA více než 2 x nad normální pásmo signalizuje, že tato elevace je způsobována nadprodukcí proteinu, nikoli jeho vyplavením.

2.5.11 Souhrn: CgA je spolehlivý marker u NET, jehož přesnost závisí více na rozsahu nádorového postižení, než na jeho sekreční aktivitě. Sérové a plasmatické hladiny odráží velikost celkové nádorové hmoty a u midgut karcinoidů bývají nezávislým prognostickým ukazatelem. U střevních karcinoidů má výše hladiny CgA prediktivní význam. Klinický užitek CgA je prokazován i u nefunkčních neoplazií, u nichž jiné markery nejsou k dispozici. Nádory s nízkým stupněm granularity bez ohledu na jejich velikost a extenzi po organismu mají nízké hladiny CgA, naopak u dobře granulovaných tumorů, které mají konstantní denzitu granulí na jednotku tkáně, je hladina CgA funkcí celkové nádorové masy.

2.5.12 Peptidy odvozené od chromograninu A:

CgA je prohormon, prekurzor biologicky aktivních peptidů, vytvářených proteolytickými mechanismy. CgA se štěpí na různé peptidy: beta-granin (CgA 1-113), vasostatin (CgA 1-76), pankreastatin (CgA 249-301), parastatin (CgA 347-439), chromostatin (CgA 124-143), WE-14 (CgA 316-329), LL-33 (CgA 332-366), GE-25 (CgA 366-403). Tyto molekuly pravděpodobně fungují jako modulátory endokrinní a exokrinní sekrece.

Slibným se jeví i vyšetřování některých **peptidů odvozených z CgA**, protože se ukazuje, že proces štěpení CgA je vystupňován u tumorů ve srovnání se zdravou neuroendokrinní tkání. Např. peptid GE-25 je lokalizovaný hlavně v endokrinní části pankreatu a v hypofýze. Peptid WE-14 je exprimován ve zdravé a nádorové tkáni GITu.

3. Další substance:

Synaptofyzin (protein P38) je glykoprotein nacházející se v buňkách difúzního neuroendokrinního systému, včetně buněk pankreatických ostrůvků a ve dřeni nadledvinek. Bývá v malých vezikulích normálních a nádorových NE buněk. Je vhodný v diagnostice málo diferencovaných buněk NET. Je významný v rámci histochemického vyšetření u NET.

Vyšetření plasmatické hladiny **substance P** má senzitivitu 32 % a specifitu 85 %. Hladiny substance P bývají zvýšeny u midgut karcinoidů, ale nebývá zde korelace s karcinoidovým syndromem.

Neuropeptid K patří k tachykininům. Zvýšená hladina tohoto peptidu se vyskytuje u midgut karcinoidů a bývá spojována s výskytem karcinoidového syndromu. U zmíněných tumorů lze někdy vyprovokovat flush pentagastrinem, přičemž dojde ke zvýšení hladiny neuropeptidu K v plasmě. Tento test může sloužit k časně detekci karcinoidového syndromu v případě, že bazální hladiny neuropeptidu K jsou v pásmu normy. Vyšetření se běžně neprovádí.

Histamin bývá zvýšen u žaludečních a plicních karcinoidů. V moči lze prokázat hlavní metabolit histaminu, metylimidazoloctovou kyselinu.

Bradykinin a skupina kallikreinů: Bývají zvýšené zejména u karcinoidové krize, častěji u plicních karcinoidů nebo karcinoidů tenkého střeva.

4. Provokační testy

Provokační testy mají za úkol vyvolat po aplikaci známé provokační látky očekávanou reakci v podobě klinické symptomatologie anebo v podobě očekávaných biochemických změn. Provokační testy přicházejí v úvahu v těch případech, kdy hodnoty příslušných biochemických vyšetření jsou hraniční anebo ležící v pásmu tzv. šedé zóny, tedy v pásmu

hodnot, které jsou nad horní hranicí považované za normu, ale ještě pod pásmem hodnot, které jsou podle zkušeností jednoznačně patologické. V praxi se však používají málo např. pro nedostupnost provokační látky.

Tab. Provokační testy v přehledu

Tumory	Test	Efekt navozený testem
Gastrinom	Provokace sekretinem Provokace s infuzí kalcia Test s potravou	Rychlý vzestup plasmatické hladiny gastrinu přes 100%
Inzulinom	Test hladovění	Hypoglykémie, při persistující elevaci hladin inzulinu
Karcinoid	Provokační test s kalcie, s pentagastrinem	Flush s dobou nástupu cca 3 minuty a dobou trvání 30 min.

Infuze kalcia jako **kalciový provokační test** lze užít v diagnostice i dalších NET (gastrinom, inzulinom). Uvolňování gastrinu citlivě reaguje na hladinu kalcia v séru. V detekci inzulinomů a karcinoidu ale není příliš citlivý. I.v. kalcium s následnou aplikací pentagastrinu stimuluje uvolňování somatostatinu u somatostatinomu.

V případě, že je naléhavé podezření na karcinoid a odpady 5-HIO jsou v normě, doporučuje se provést **provokační pentagastrinový test**. Test navozuje flushing, GIT symptomy a zvýšení hladin serotoninu či další neuroaktivních substancí, např. neurokininu A, neuropeptidu K a substance P. Pentagastrinový test není většinou s ohledem na nedostupnost látky běžně proveditelný. Při podezření na gastrinom přichází v úvahu **sekretinový test**. **Test hladovění** přichází v úvahu při suspekci na inzulinom. Použití provokačních testů lze vymezit pro situace, kdy výsledky biochemických vyšetření jsou opakovaně nejednoznačné anebo kdy klinické symptomy se vyskytují v epizodické formě, takže lékař je nemusí zpozorovat.

5. Selektivní žilní odběr (selective venous sampling, SVS) je selektivní odběr krve z žíly odvádějící krev ze suspektní oblasti. Metoda je běžně ale nepoužívá.

Transhepatální punkce pankreatických žil, transhepatální portální žilní odběr s odběrem příslušných hormonů.

6. Diagnostická taktika laboratorních vyšetření u NET

V případě flushu či průjmu je třeba provést CgA i 5-HIO a patologické hodnoty těchto dvou markerů postačují k biochemické diagnóze **midgut karcinoidu**.

U nemocných s **foregut a hindgut karcinoidem** je třeba provést další doplňující vyšetření. V úvahu přicházejí další nespecifické markery jako pankreatický polypeptid PP, α -, β -podjednotky HCG (lidského choriongonadotropinu).

U **pankreatických NET** klinické příznaky závisí na spektru produkovaných aktivních substancí. Pokud je hodnota vyšetření nejednoznačná, doporučuje se provést příslušný provokační test. V případě, že provokační test je pozitivní anebo pokud původní biochemické vyšetření bylo primárně negativní, doporučuje se provést somatostatinové receptorové vyšetření (SRS). Je-li klinika netypická, biochemické vyšetření nejednoznačné, provokační test negativní a zobrazovací vyšetření rovněž negativní, pacienta nadále pouze sledujeme.

Pokud vyšetření podporují suspekci na NET, je zapotřebí provést **lokalizační vyšetření**. V třetí fázi následuje **bioptické vyšetření s histologickým vyšetřením** materiálu anebo odběr materiálu při chirurgickém výkonu, nebylo-li možno provést biopsii v předoperačním období.

6.1 Přehled biochemických vyšetření při suspekci na jednotlivé NET:

Při výběru vyšetření nutno respektovat fakt, že ne všechna laboratorní vyšetření jsou k dispozici pro rutinní vyšetření.

Primární pankreatické NET: chromogranin-A, pankreatický polypeptid, Substance P a specifické markery podle klinických projevů: 5-HIO, serotonin, gastrin, glukagon, inzulin, C peptid, VIP, somatostatin.

Primární plicní NET: chromogranin-A, neuron specifická enoláza (NSE), 5-HIO, serotonin, substance P, ACTH

Primární střevní NET: chromogranin-A, substance P, 5-HIO, serotonin, methyl-histamin v moči (u primárních žaludečních NET), neuropeptid K (neprovádí se rutinně).

Primární rektální NET: alfa a beta podjednotky HCG, chromogranin A.

Neznámá primární lokalizace NET: 5-HIO, chromogranin-A, serotonin, neuron specifická enoláza (NSE), substance P, neurokinin A, alfa a beta podjednotky HCG.

U suspektního feochromocytomu: kyselina vanilmandlová v moči, katecholaminy a jejich metabolity (metanefrin a normetanefrin), chromogranin A.

U suspektního medulárního karcinomu thyreoidey: Kalcitonin, kalcium v séru, chromogranin A, CEA.

6.2 Výběr vyšetřovacích metod v rámci kontrolních vyšetření u NET

Kontroly u radikálně operovaných NET: Pacienta dispenzarizujeme a kontrolujeme 1 x do roka. Odebereme anamnézu, provádíme fyzikální vyšetření, RTG plic, sono břicha, základní

laboratorní vyšetření, krevní obraz a biochemické markery podle typu NET. Při podezření na recidivu onemocnění endoskopii, případně enteroklýzu (či CT enteroklýzu) a octreoscan.

Kontroly u karcinoidu appendixu: U malých karcinoidů na konci appendixu někteří doporučují nedispensarizovat. Na našem pracovišti nemocné kontrolujeme 1 x ročně. 5-HIO provádíme v rámci vstupního vyšetření a dále 1 x ročně u tumorů větších než 2 cm. Zvýšenou pozornost věnujeme zejména rizikovějším formám karcinoidu appendixu.

Kontroly u atypických forem karcinoidu: Po radikální operaci se provádí kontroly á 3 měsíce po dobu dvou let, pak podle závažnosti á 3-6 měsíců.

Kontrolní vyšetření u inoperabilních NET: Podle závažnosti průběhu volíme intervaly kontrol od 3 měsíců do 6 měsíců, NET rostou většinou pomalu, a proto častější kontroly nemají význam. Výběr markerů volíme podle povahy nádoru a podle toho, které markery byly zvýšeny na začátku onemocnění. Sonografické vyšetření je nejvhodnější metodou k monitorování průběhu onemocnění, CT s kontrastem či MRI s kontrastem, pokud je sonografický nález nejednoznačný. Octreoscan v úvodu léčby a dále jen tehdy, bude-li to mít vliv na další léčbu. Echokardiogram v úvodu léčby a pak 1 x ročně z důvodů včasného zachycení karcinoidové srdeční nemoci (V případě, že je prokázána významná hyperserotoninémie či vysoké odpady 5-HIO v moči).