

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA JANČAR

**DIPLOMSKA NALOGA**

**UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE**

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA JANČAR

**Klinični pomen določanja kromogranina A pri  
nevroendokrinih tumorjih**

**Clinical significance of determinig chromogranin A in  
neuroendocrine tumors**

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala na Univerzitetnem Kliničnem centru v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag.farm., med. biokem. Analize so bile opravljene v UKC Ljubljana.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju za vsa koristna navodila in strokovne nasvete pri izdelavi diplomske naloge. Najlepše se zahvaljujem svojim domačim in prijateljem za spodbudne besede, podporo in pomoč v času študija.

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo somostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm.,spec. med. biokem.

Janja Jančar

## KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	NEVROENDOKRINE CELICE .....	1
1.2	NEVROENDOKRINI TUMORJI .....	1
1.2.1	Gastroenteropankreatični nevroendokrini tumorji.....	2
1.3	KLASIFIKACIJA NET .....	4
1.4	EPIDEMIOLOGIJA NET.....	9
1.5	ETIOLOGIJA NET.....	9
1.6	KLINIČNA SLIKA IN DIAGNOSTIKA NET .....	10
1.6.1	Biokemični označevalci.....	12
1.6.2	Slikovne preiskavne metode za diagnostiko NET.....	13
1.7	ZDRAVLJENJE NET.....	13
1.7.1	Kirurško zdravljenje NET .....	14
1.7.2	Transarterijska kemoembolizacija in radiofrekvenčna ablacija .....	14
1.7.3	Somatostatin in analogi .....	14
1.7.4	Sistemska kemoterapija NET .....	15
1.7.5	Radionuklidna terapija NET .....	16
1.7.6	Nove tarče za zdravljenje GEP-NET.....	16
1.8	TUMORSKI OZNAČEVALCI.....	16
1.9	KROMOGRANINI - SEKRETOGRANINI .....	19
1.9.1	Struktura in lastnosti kromogranina A .....	19
1.9.2	Biosinteza .....	20
1.9.3	Delovanje.....	21
1.9.4	KgA in NET .....	23
1.10	VPLIVI RAZLIČNIH DEJAVNIKOV IN BOLEZNI POLEG NET NA KONCENTRACIJO KgA V KRVI.....	23

2	NAMEN DELA .....	26
3	MATERIALI IN METODE .....	27
3.1	ZBIRANJE PREISKOVANCEV .....	27
3.2	ZBIRANJE VZORCEV .....	27
3.3	RADIOIMUNOLOŠKA METODA.....	27
3.3.1	Priprava reagentov .....	28
3.3.2	Priprava vzorca .....	29
3.3.3	Postopek .....	29
3.4	STATISTIČNE METODE .....	30
4	REZULTATI .....	32
4.1	PODATKI O PREISKOVANCIH.....	32
4.2	OBDELAVA PODATKOV .....	35
4.3	DIAGNOSTIČNA OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST KgA GLEDE NA ZDRAVE PREISKOVANCE .....	35
4.3.1	Določitev mejne vrednosti KgA na podlagi kontrolne skupine .....	35
4.3.2	Primerjava skupin preiskovancev in izračun diagnostične specifičnosti in občutljivosti pri mejni vrednosti.....	36
4.4	PRIMERJAVA VREDNOSTI KgA MED BOLNIKI Z IN BREZ METASTAZ	
	41	
4.4.1	Primerjava srednjih vrednosti in standardnih odklonov .....	41
4.4.2	Test normalnosti porazdelitve .....	42
4.4.3	Ugotavljanje statistično signifikantnih razlik med skupinama bolnikov.....	42
4.4.4	ROC krivulja .....	43
5	RAZPRAVA.....	44
6	SKLEP .....	46
7	LITERATURA .....	47

## POVZETEK

Nevroendokrini tumorji (NET) so neoplazme, ki izvirajo iz nevroendokrinih celic. Te celice izločajo številne sekretorne produkte na različnih anatomskih lokacijah. Eden izmed njih je tudi kromogranin A (KgA), ki ga najdemo v sekretornih granulah teh celic. Namen naše raziskave je bil oceniti uporabnost KgA pri diagnosticiranju NET in odkrivanju prisotnosti metastaz pri bolnikih z NET.

V raziskavo smo vključili 51 preiskovancev. Od tega je bilo 29 bolnikov z NET in 22 zdravih preiskovancev. Koncentracija KgA je bila izmerjena v serumu z radioimunološko metodo. Na osnovi pridobljenih podatkov iz kontrolne skupine smo določili mejno vrednost KgA v serumu (87,7 ng/mL), na podlagi katere bi razlikovali bolnike z NET od zdravih preiskovancev. Pri tej vrednosti smo izračunali tudi specifičnost (95,5 %) in občutljivost (53,5 %). S pomočjo krivulje občutljivosti in specifičnosti (ROC krivulja) pa smo ocenili specifičnost in občutljivost pri različnih mejnih vrednostih. Koncentracija KgA, ki je predstavljala najboljši kompromis med občutljivostjo in specifičnostjo je 72,9 ng/mL. Občutljivost v tem primeru je 64,3 % in specifičnost 90,9 %. Površina pod ROC krivuljo pa je znašala 0,8312, kar nakazuje dobro zmogljivost tega testa, da loči bolnike z NET od zdravih preiskovancev.

Bolnike smo v nadaljevanju razdelili na dve skupini glede na prisotnost metastaz. Ugotovili smo, da so koncentracije KgA statistično značilno višje v skupini z metastazami. S pomočjo ROC krivulje smo izračunali mejno vrednost, ki predstavlja najboljši kompromis med občutljivostjo in specifičnostjo za razlikovanje med obema skupinama. Pri mejni vrednosti 160,6 ng/mL je specifičnost znašala 93,3% in občutljivost 61,5 %. Površina pod ROC krivuljo pa je znašala 0,697. Na osnovi te vrednosti lahko sklepamo na nekoliko slabšo zmogljivost testa, da loči med bolniki z metastazami in tistimi brez njih.

Na osnovi vseh pridobljenih podatkov smo sklenili, da je KgA uporaben tumorski označevalec pri obravnavi bolnikov z NET. Potrebne pa bi bile nadaljne raziskave, ki bi lahko pripomogle k optimalni uporabi tega tumorskega markerja v klinični praksi.

## ABSTRACT

Neuroendocrine tumors (NETs) are neoplasms derived from neuroendocrine cells. These cells secrete a number of secretory products in different anatomical locations. One of them is chromogranin A (CgA), found in secretory granules in the cytoplasm of these cells. The aim of our study was to assess the usefulness of CgA in diagnostics of NETs and in detection of metastasis in patients with NETs. The study included 51 subjects (29 patients with NETs and 22 healthy controls). Serum CgA concentrations were measured using radioimmunoassay. Based on the obtained data from the control subjects, we calculated the cutoff value of 87.7 ng/mL CgA that could distinguish patients from the healthy subjects. Using this value, we calculated the specificity (95.5 %) and sensitivity (53.5 %). ROC analysis was used to evaluate the sensitivity and specificity for different cutoff values. CgA concentration, which represented the best compromise between sensitivity and specificity was 72.9 ng/mL. The sensitivity in this case was 64.3 % and specificity 90.9 %. The area under the ROC curve was 0.8312 indicating a good performance of the test. We also divided the patients into two groups according to the presence of metastases. We found that the concentrations of CgA were significantly higher in the metastases group. Using the ROC curve, we identified the cutoff value that could distinguish between the two groups. The cutoff value of 160.6 ng/mL represented the best compromise between sensitivity (61.5 %) and specificity (93.3 %). The area under the ROC curve was 0.697 indicating a modest performance of the test. Based on the data, we concluded that CgA is a useful marker in clinical management of NETs. Further research could contribute to the optimal use of this tumor marker in clinical practice.

## SEZNAM OKRAJŠAV

ACTH	Adenokortikotropni hormon
ADH	Antidiuretični hormon
CST	Katestatin
CT	Računalniška tomografija
ENETS	Evropsko združenje za nevroendokrine tumorje
FDG	Fluorodeoksiglukoza
GEP-NET	Gastroenteropankreatični nevroendokrini tumorji
GRP	Gastrin sproščujoči peptid
HCG	Humani horiontski gonadotropin
IP <sub>3</sub>	Inozitol trifosfat
KgA	Kromogranin A
MEN	Multipla neoplazija
MR	Magnetna resonanca
NEC	Nevroendokrini karcinom
NEN	Nevroendokrine neoplazme
NET	Nevroendokrini tumorji
NSE	Nevronspecifična enolaza
P-NET	Pankreatični nevroendokrini tumorji
PP	Pankreatični polipeptid
PST	Pankreastatin
PTH	Paratiroidni hormon
PTHrP	Paratiroidnemu hormonu sorodna beljakovina
RFA	Radiofrekvenčna ablacija
ROC	Krivulja občutljivosti in specifičnosti ( <i>angl. receiver operating characteristic</i> )
SP	Substanca P
SRS	Scintigrafija somatostatinskega receptorja
TACE	Transarterijska kemoembolizacija
TNM	Tumor, bezgavke, metastaze ( <i>angl. tumor, nodes, metastasis</i> )



TO	Tumorski označevalci
TSC	Tuberozna skleroza
UZ	Ultrazvok
VHL	Von Hippel-Lindau
VIP	Vazoaktivni intestinalni peptid
VS	Vazostatin
5-HIAA	5-hidroksiindolocetna kislina
5-HT	5-hidroksitriptamin
5-HTP	5-hidroksitriptofan

# 1 UVOD

## 1.1 NEVROENDOKRINE CELICE

Splošni kriteriji, ki jih uporabljamo pri opredelitvi nevroendokrinih celic so:

- produkcija neurotransmiterjev, nevromodulatorjev ali neuropeptidnih hormonov
- prisotnost sekretornih granul z gostimi jedri, iz katerih se z eksocitozo sproščajo hormoni kot odgovor na eksterne stimuluse
- odsotnost aksonov in sinaps

Te celice del difuznega nevroendokrinega sistema in so prisotne v endokrinih organih ter razporejene povsod po telesu (ščitnica, obščitnice, nadledvičnice, paragangliji, koža, prebavna cev, Langerhansovi otočki trebušne slinavke, hipofiza, pluća, priželjc, jetra, žolčni sistem, jajčniki, placenta...). Sprva so verjeli, da imajo te celice skupni embriološki izvor iz nevrálnega grebena (predpona *nevro*), a so kasneje ugotovili, da večina izvira iz endoderma. Predpona *nevro* se je ohranila zaradi dejstva, da imajo te celice tako nevrálne kot endokrine lastnosti. Nevroendokrine celice sproščajo identične sekretorne produkte na različnih anatomskih lokacijah, njihova fiziološka vloga pa je odvisna anatomskega konteksta, v katerem so sproščeni. Glede na točno lokacijo, na kateri so sproščeni in na vrsto celic, ki jih sproščajo lahko delujejo endokrino, parakrino, avtokrino, nevrokrino ali kot neurotransmiterji oz. nevromodulatorji (1, 2).

## 1.2 NEVROENDOKRINI TUMORJI

Nevroendokrini tumorji (NET) so neoplazme, ki izvirajo iz celic nevroendokrinega sistema. So zelo heterogena skupina tumorjev in vključujejo gastroenteropankreatične tumorje (GEP-NET), tumorje, ki sproščajo kateholamine (feokromocitom, paragliom, ganglioneurom, ganglionevroblastom, simpatoblastom, nevroblastom), medularne karcinome ščitnice, kromofobne tumorje hipofize, drobnocelični pljučni rak in tumorje Merklvih celic (1).

Večina NET (razen insulinoma, ki je ponavadi benignen) je malignih. Njihove zasevke najpogosteje najdemo v jetrih in bezgavkah, redkeje pa v kosteh, pljučih, možganih ter drugih organih. Kljub široko razširjenim metastazam pa je njihova rast ponavadi počasna, mitotska aktivnost pa nizka (3).

## 1.2.1 Gastroenteropankreatični neuroendokrini tumorji

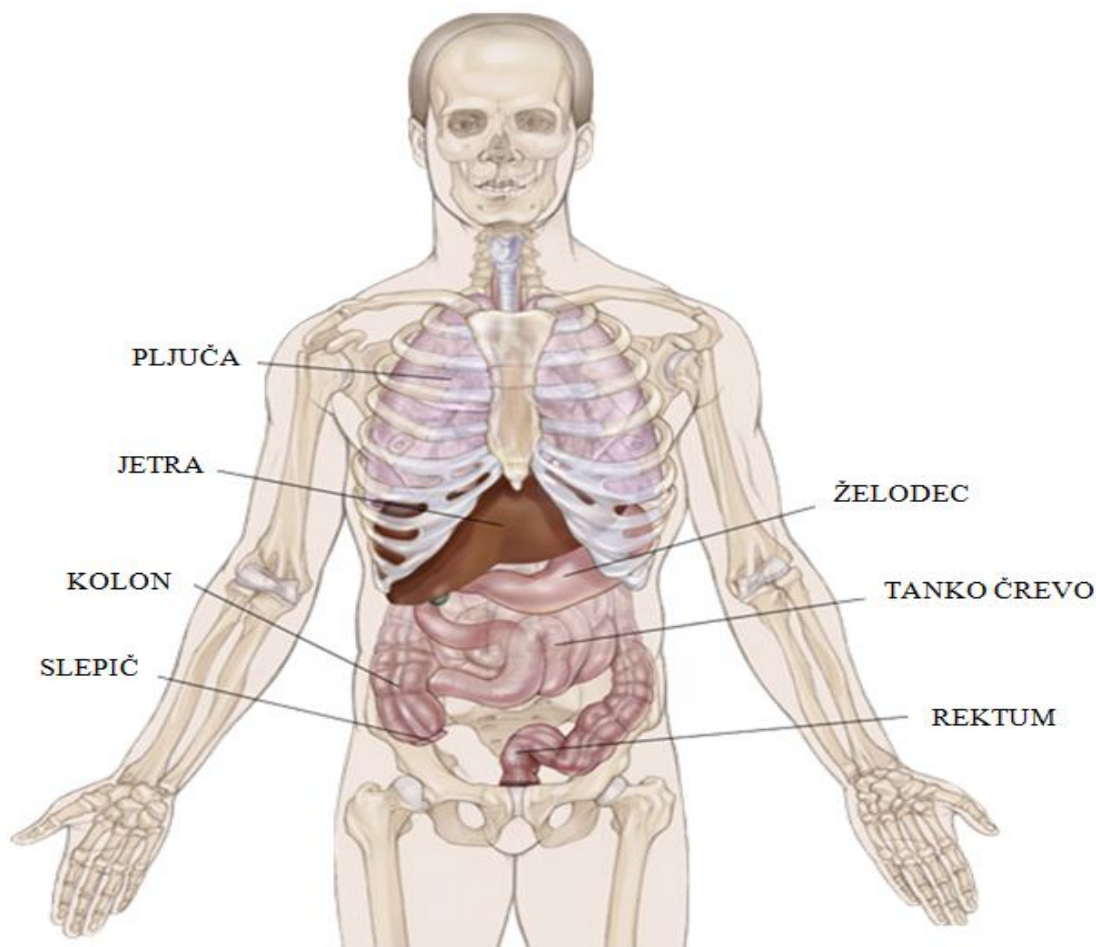
Gastroenteropankreatični tumorji so največja skupina NET in vključujejo karcinoide in nekarcinoidne GEP-NET .

### 1.2.1.1 Karcinoidi oz. gastrointestinalni NET

Karcinoidi izhajajo iz enterokromafinih celic. Glede na embrionalni izvor jih delimo na tumorje sprednjega (respiratorni trakt, priželjč, želodec, dvanajstnik, jajčniki in pankreas), srednjega (tanko črevo, slepič, proksimalno debelo črevo) in zadnjega dela pračrevesa (distalno debelo črevo, rektum). Ta razdelitev nam pomaga tudi pri razlikovanju številnih pomembnih biokemičnih in kliničnih lastnosti karcinoidov, saj se le-ti razlikujejo glede na klinične znake, histokemijo in sekretorne produkte (preglednica 1). Šestdeset odstotkov karcinoidov izhaja iz srednjega dela pračrevesa, najpogostejši lokaciji pa sta v tanko črevo (28 %) in slepič (22 %) (4).

**Preglednica 1:** Histokemične in biokemične lastnosti karcinoidnih NET (4)

Lokacija tumorja	Argirofilnost	Sekretorni produkti
sprednji del pračrevesa	-	5-HTP, histamin, polipeptidni hormoni
srednji del pračrevesa	+	serotonin, substanca P, kinini, prostaglandini
zadnji del pračrevesa	-	nefunkcionalni



**Slika 1:** Najpogostejše lokacije karcinoidnih NET (5)

### 1.2.1.2 Nekarcinoidni GEP-NET

Nekarcinoidni GEP-NET, ki se klinično izražajo s tipičnimi simptomi hipersekrecije hormonov, vključujejo insulinom, gastrinom, VIPom (vazointestinalni peptid), glukagonom in somatostatinom. Večinoma se nahaja v trebušni slinavki (pankreatični NET- PNET ), najdemo pa jih tudi v želodcu, dvanajstniku in tankem črevesju (preglednica 2). Približno polovica teh tumorjev pa je nefunkcionalnih oz. izločajo peptide z nizko biološko aktivnostjo. V času diagnoze metastazira okoli 50 % nekarcinoidnih GEP-NET. Insulinom in gastrinom sta najpogostejša. 90 % insulinomov je benignih in manjših

od dveh centimetrov. Gastrinomi pa spadajo med visoko maligne tumorje, saj se v času postavitve diagnoze pri 70-80 % bolnikov že pojavijo metastaze v jetrih. VIPomi so redki, veliki (72 % je večjih od 5 cm) in maligni. Med najredkejše nekarcinoidne GEP-NET spadajo glukagonomi, somatostatini in PPomi (pankreatični polipeptid). (6, 7, 8).

**Preglednica 2:** Nekarcinoidni GEP-NET (6)

<b>Tumor</b>	<b>Lokacija</b>	<b>Malignost</b>
Insulinom	Pankreas 99 %	<10
Gastrinom	Dvanajstnik 70 % Pankreas 25 %	>50
VIPom	Pankreas 90 %	>50
Glukagonom	Pankreas 100 %	>70
PPom	Pankreas 100 %	>60
Somatostatinom	Pankreas 55 % Dvanajstnik, Jejunum 44 %	>50
Nefunkcionalni	Pankreas	>80

### **1.3 KLASIFIKACIJA NET**

Klasifikacija NET je zaradi njihove kompleksnosti doživela številne spremembe in bila tema mnogih razprav. Problemi se pojavljajo že v samem izrazoslovju, ki se v literaturi uporabljajo za poimenovanje teh tumorjev. Te tumorje so najprej poimenovali karcinoidi, ta izraz je zamenjal termin NET, ki je danes široko uporabljen. V najnovejši literaturi pa se za poimenovanje uporablja izraz nevroendokrine neoplazme (NEN, WHO klasifikacija 2010), izraza NET in karcinoidi pa se še vedno uporabljata in označujeta podskupini teh tumorjev. V diplomski nalogi bom uporabljala izraz NET.

Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) je konec leta 2010 izdala novo klasifikacijo za NET oz. NEN (preglednica 3). Osnovna kriterija WHO klasifikacije iz leta 2000 kot sta

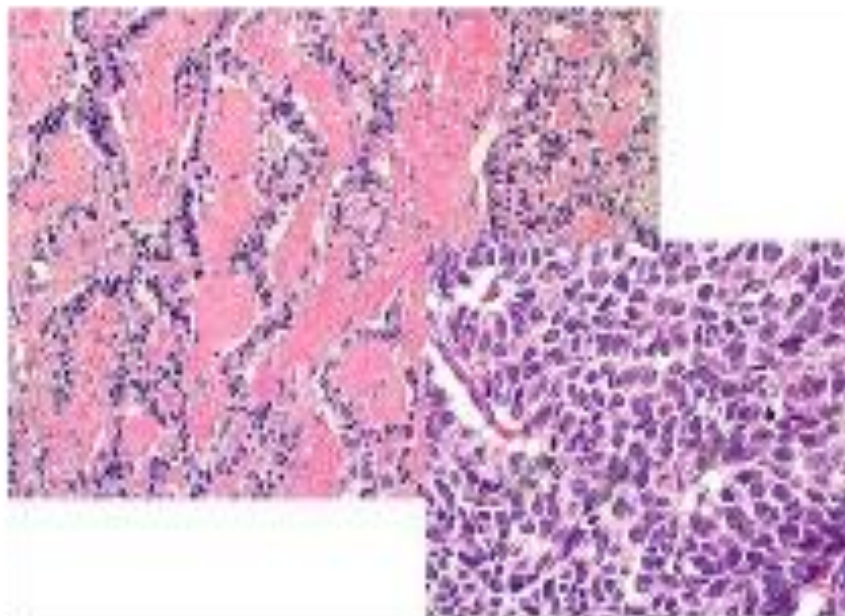
diferenciacija in proliferacija sta se ohranila, toda lokacija, velikost tumorja in razširjenost tumorja pa so se preusmerile v TNM (tumor, bezgavke, metastaze; *angl. tumor, nodes, metastasis*) klasifikacijo. Klasifikacija iz leta 2010 temelji na dejstvu, da so vse NEN potencialno maligne, a se razlikujejo glede na verjetnost za pojav metastaz. Dobro diferencirani NEN so v skupnem razredu kot NET gradusa 1 (G1) ali 2 (G2). Izraz nevroendokrini karcinom (NEC) pa je rezerviran za vse slabo diferencirane nevroendokrine neoplazme in je razdeljen v dve podskupini drobnocelični in velikocelični NEC. Vsi NEC so glede na njihovo proliferacijsko aktivnost tumorji tretjega gradusa (G3) (9).

**Preglednica 3:** Primerjava WHO klasifikacije NET iz leta 2000 in 2010 (9)

WHO klasifikacija 2000	WHO klasifikacija 2010
Dobro diferencirani nevroendokrini tumorji	Nevroendokrini tumor G1(karcinoid), G2
Dobro diferencirani nevroendokrini karcinom	
Slabo diferencirani (drobnocelični) nevroendokrini karcinom	Nevroendokrini karcinom G3, drobnocelični karcinom Nevroendokrini karcinom G3, velikocelični karcinom

S pomočjo gradusa določamo stopnjo malignosti, diferenciranost pa se nanaša na stopnjo strukturne podobnosti neoplastičnih celic s celicami tkiva iz katerega izhajajo. Celice dobro diferenciranega NET so organoidno urejene, relativno enotne in producirajo veliko število nevrosekretornih granul, kar se izraža v močni in difuzni imunoekspresiji nevroendokrinih markerjev, kot sta kromogranin A (KgA) in sinaptofizin. Celice slabo diferenciranih tumorjev so manj podobne ne-neoplastičnim celicam nevroendokrinega sistema. Njihova arhitektura je bolj razpršena, jedra so nepravilna, granuliranost citoplazme je manjša, imunoekspresija nevroendokrinih markerjev, predvsem KgA, pa je bolj omejena. Gradus oz. stopnja malignosti pa se nanaša na biološko agresivnost tumorja. NET z nizkim gradusom so relativno indolentni, medtem ko so tumorji z visokim gradusom zelo agresivni. Gradus tumorja določamo s pomočjo stopnje proliferacije oz. mitotske aktivnosti in v nekaterih primerih s prisotnostjo in obsegom tumorske nekroze (preglednica 4). Stopnjo proliferacije ocenjujemo na osnovi določanja števila mitoz na

površinsko enoto tumorja (število mitoz na 10 polj velike povečave - 10 hpf oz. na 2 mm<sup>2</sup> ) ali odstotka neoplastičnih celic, ki izražajo proliferacijski marker Ki67 (10, 11).



**Slika 2:** Dobro diferencirani neuroendokrini tumor (levo) in slabo diferencirani neuroendokrini karcinom pankreasa (desno) (12)

**Preglednica 4:** Določanje gradusa NET (10)

<b>GRADUS</b>	<b>GEP-NET</b>
Nizek	< 2 mitoz / 10 hpf IN < 3 % Ki67 indeks
Srednji	2-20 mitoz / 10 hpf ALI 3-20 % Ki67 indeks
Visok	> 20 mitoz /10 hpf ALI > 20 % Ki67 indeks

Evropsko združenje za neuroendokrine tumorje (ENETS) je razvilo TNM klasifikacijo za ocenitev stadija NET. TNM klasifikacija NET je razdeljena na specifična področja želodec, dvanajstnik/proksimalni jejunum, distalni jejunum/ileum in pankreas. Uporabljeni so klasični kriteriji: velikost tumorja (T), prizadetost bezgavk (N), prisotnost oddaljenih metastaz (M) (preglednica 5) (13).

**Preglednica 5: TNM klasifikacija (želodec, dvanajstnik, ampula, jejunum, ileum, pancreas)**

(13)

<b>TNM</b>	<b>Želodec</b>	<b>Dvanajstnik/ampula/proksimalni jejunum</b>	<b>Pankreas</b>	<b>Distalni jejunum/ileum</b>
<b>Tx</b>	Primarni tumor ni opredeljiv	Primarni tumor ni opredeljiv	Primarni tumor ni opredeljiv	Primarni tumor ni opredeljiv
<b>T0</b>	Ni znakov primarnega tumorja	Ni znakov primarnega tumorja	Ni znakov primarnega tumorja	Ni znakov primarnega tumorja
<b>Tis</b>	Tumor in situ/displazija (>0.5mm)	-	-	-
<b>T1</b>	Tumor vrašča v lamino proprio ali submukozo in ≤ 1cm	Tumor vrašča v lamino proprio ali submukozo in ≤ 1 cm	Tumor omejen na pankreas in < 2 cm	Tumor vrašča v mukozo ali submukozo in ≤1 cm
<b>T2</b>	Tumor vrašča v muskularis proprio ali subserozo ali > 1cm	Tumor vrašča v muskularis proprio ali >1 cm	Tumor omejen na pankreas in velikosti 2-4 cm	Tumor vrašča v muskularis proprio ali > 1cm
<b>T3</b>	Tumor penetrira serozo	Tumor vrašča v pankreas potrebušnico	Tumor omejen na pankreas in > 4cm ali vrašča v dvanajstnik ali žolčnik	Tumor vrašča v subserozo
<b>T4</b>	Tumor vrašča v sosednje strukture (za kateri koli T dodaj M pri multiplih tumorjih)	Tumor vrašča v potrebušnico ali druge strukture (za kateri koli T dodaj M pri multiplih tumorjih)	Tumor vrašča v sosednje organe (želodec, vranica, kolon, nadledvična žleza) ali v stene večjih žil	Tumor vrašča v potrebušnico/ druge organe (za kateri koli T dodaj M pri multiplih tumorjih)



<b>Nx</b>	Ocena zaseženosti lokalnih bezgavk ni možna	Ocena zaseženosti lokalnih bezgavk ni možna	Ocena zaseženosti lokalnih bezgavk ni možna	Ocena zaseženosti lokalnih bezgavk ni možna
<b>N0</b>	Ni zasevkov v lokalnih bezgavkah	Ni zasevkov v lokalnih bezgavkah	Ni zasevkov v lokalnih bezgavkah	Ni zasevkov v lokalnih bezgavkah
<b>N1</b>	Zasevki v lokalnih bezgavkah	Zasevki v lokalnih bezgavkah	Zasevki v lokalnih bezgavkah	Zasevki v lokalnih bezgavkah
<b>Mx</b>	Oddaljenih zasevkov ni mogoče opredeliti	Oddaljenih zasevkov ni mogoče opredeliti	Oddaljenih zasevkov ni mogoče opredeliti	Oddaljenih zasevkov ni mogoče opredeliti
<b>Mo</b>	Ni oddaljenih zasevkov	Ni oddaljenih zasevkov	Ni oddaljenih zasevkov	Ni oddaljenih zasevkov
<b>M1</b>	Prisotni zasevki	Prisotni zasevki	Prisotni zasevki	Prisotni zasevki

**Preglednica 6:** TNM klasifikacija (slepič, debelo črevo, rektum) (12)

<b>TNM</b>	<b>Slepič</b>	<b>Debelo črevo/rektum</b>
<b>Tx</b>	Primarni tumor ni opredeljiv	Primarni tumor ni opredeljiv
<b>T0</b>	Ni znakov primarnega tumorja	Ni znakov primarnega tumorja
<b>T1</b>	Tumor vrašča v lamino proprijo in $\leq 1$ cm	Tumor vrašča v mukoza ali submukoza T1a<1cm T1b 1-2 cm
<b>T2</b>	Tumor vrašča v submukoza, muskularis proprijo in/ali minimalno(do 3 mm) vrašča v serozo/mezoapendiks in $\leq 2$ cm	Tumor vrašča v muskularis proprijo ali > 2cm
<b>T3</b>	Tumor > 2 cm in/ali vrašča (več kot 3 mm) v serozo/mezoapendiks	Tumor vrašča v subserozo/prikolno/perirektalno maščevje
<b>T4</b>	Tumor vrašča v trebušno/ostale organe	Tumor vrašča v druge organe in/ali predira visceralno trebušno
<b>Nx</b>	Ocena zaseženosti lokalnih bezgavk ni možna	Ocena zaseženosti lokalnih bezgavk ni možna
<b>N0</b>	Ni zasevkov v lokalnih bezgavkah	Ni zasevkov v lokalnih bezgavkah

<b>N1</b>	Zasevki v lokalnih bezgavkah	Zasevki v lokalnih bezgavkah
<b>Mx</b>	Oddaljenih zasevkov ni mogoče opredeliti	Oddaljenih zasevkov ni mogoče opredeliti
<b>Mo</b>	Ni oddaljenih zasevkov	Ni oddaljenih zasevkov
<b>M1</b>	Prisotni oddaljeni zasevki	Prisotni oddaljeni zasevki

## 1.4 EPIDEMIOLOGIJA NET

NET predstavljajo 0,5 % vseh rakavih obolenj. Incidenca je približno 2 na 100000 ljudi, nekoliko več je obolelih žensk (14). V Združenih državah Amerike so opazili večjo incidenco med Afroameričani v primerjavi z drugimi etničnimi skupinami (15, 16). V zadnjih desetletjih incidenca narašča, kar bi lahko pripisali večji ozaveščenosti in izboljšani diagnostiki. Večina NET izhaja iz gastrointestinalnega trakta (GIT) (62-67 %) in pljuč (22-27 %). Prognoza bolnikov je odvisna stadija. Če je tumor lokaliziran, je petletno preživetje 93-%, pri regionalnih tumorjih 74-%, pri oddaljenih zasevkih pa 19-% (14).

## 1.5 ETIOLOGIJA NET

Večina NET se pojavi sporadično, vendar obstajajo določeni genetični sindromi, ki signifikantno povečajo tveganje za njihov razvoj. Multipla neoplazija tipa 1 in 2 (MEN1; MEN2), neurofibromatoza tipa 1 (NF1), von Hippel-Lindau-ova (VHL) bolezen in tuberozna skleroza (TSC) povzročajo alteracijo v celičnih regulatornih proteinih in signalnih poteh. Enake genske alteracije kot pri teh sindromih najdemo tudi pri sporadičnih lezijah (15).

**MEN1** je dedna motnja, ki jo povzroča mutacija MEN1 gena, ki kodira tumor supresorski protein menin. To je jedrni protein, ki z vezavo na določene transkripcijske faktorje inhibira celično proliferacijo. Klinično se MEN1 manifestira v obliki enteropankreatičnih tumorjev, paratiroidne hiperplazije in adenomov hipofize. Pri 90 % pacientov se pojavi hiperparatiroidizem (15, 17).

**MEN2** je avtosomno dominanten genetski sindrom, pri katerem pride do mutacije RET protoonkogenega, ki kodira receptor za tirozin-kinazo. MEN2 je povezana z medularnimi karcinomi ščitnice, feokromocitomi in paratiroidno hiperplazijo (15, 17).

Pri **NF1** pride do okvare NF1 gena na kromosomu 17. Genski produkt je nevrofibromin, ki deluje kot supresor onkogenega Ras. NF1 je povezana z nefunkcionalnimi NET in somatostatini (15).

**VHL** bolezen poveča tveganje za razvoj ledvičnega raka, hemangioblastoma centralnega živčnega sistema, renalnega angioma, približno 65 % bolnikov pa razvije NET, najpogosteje feokromocitom in NET pankreasa. VHL gen je lociran na kromosomu 3p25-26 in je tumor supresorski gen, ki regulira s hipoksijo inducirano celično proliferacijo in angiogenezo (15, 17).

Pri **TSC** pride do mutacij v genih TSC1 in TSC2, ki kodirata proteina hamatrin in tuberin. Ponavadi se TSC kaže v obliki multiplih fibromov, hamartomov in drugih benignih lezijah vezivnega tkiva, v nekaterih primerih pa so jo povezani z malignimi tumorji celic Langerhansovih otočkov (15).

## **1.6 KLINIČNA SLIKA IN DIAGNOSTIKA NET**

Nevroendokrine tumorje lahko razdelimo na funkcionalne in nefunkcionalne tumorje. Funkcionalni tumorji se klinično izražajo s simptomi, ki so posledica prekomerne produkcije hormonov in aminov npr. karcinoidni sindrom pri karcinoidih. Ti simptomi so podobni simptomom, ki jih najdemo pri številnih drugih boleznih, zato je diagnostika pogosto težavna.

Glavna značilnost enterokromafinih celic je sinteza, shranjevanje in izločanje serotonina (5- hidroksitriptamin-5-HT). Serotonin se sintetizira iz triptofana preko prekursorja 5- hidroksitriptofana (5-HTP) . Metabolizira se v 5-hidroksindolocetno kislino (5-HIAA) in se izloči z urinom. Pri zdravih ljudeh se približno 99 % triptofana uporabi za sintezo nikotinske kisline, manj kot 1 % pa se porabi za sintezo 5-HT. Pri bolnikih s karcinoidom pa se metabolizem premakne v smeri nastajanja serotonina in posledično 5-HIAA. Kadar se 5-HT in ostali produkti izločajo v portalno cirkulacijo, jih jetra v zadovoljivi meri

metabolizirajo, zato ponavadi ne povzročajo znakov karcinoidnega sindroma. Le-ti se pojavijo ob prisotnosti jeternih zasevkov in v primeru, da se primarni karcinoid nahaja v bronhu in/ali jajčniku. Tipični karcinoidni sindrom se pojavi pri manj kot 10 % bolnikov in se najpogosteje pojavi pri karcinoidnih tumorji srednjega dela pračrevesa. Glavne značilnosti tega sindroma so naval rdečice na koži obraza, vratu in zgornjega dela trupa ter eksplozivna driska. Pordečitev kože, ki traja nekaj minut, lahko sproži uživanje alkohola, hrana bogata s tiraminom ali telesna aktivnost. Redkeje se pojavijo valvularna hiba desnega srca, bronhialna konstrikcija in palegra, ki nastane zaradi pomankanja nikotinske kisline. Karcinoidi zgornjega dela pračrevesa lahko izločajo 5-HTP, histamin in polipeptidne hormone podobne ACTH (adenokortikotropni hormon) in se lahko klinično izražajo v obliki netipičnega karcinoidnega sindroma. Zanj je značilna pordečitev obraza, ki je temno rdeča in ne rožnata kot pri tipičnem karcinoidnem in traja dlje časa. Ostali znaki so še hipotenzija, oteklina, glavobol in solzenje (18, 19, 20, 21).

Pri gastrinomu lahko nastane Zollinger-Elilisonov sindrom zaradi povečane produkcije gastrina pri tumorjih trebušne slinavke ali dvanajstnika. Gastrin stimulira izločanje želodčne kisline, kar povzroča gastritis in želodčne razjede.

Insulinom se izraža s simptomi nevroglukopenije (amnezija, koma, zmedenost, konvulzije, izguba zavesti, težave z vidom), zaradi znižane koncentracije glukoze v krvi ter s simptomi, ki nastanejo zaradi prekomernega delovanja simpatika (slabost, potenje, tremor, palpitacije, povečan apetit).

Glukagonom povzroča glukozno intoleranco, izgubo telesne teže ter migrirajoči nekrolitični eritem, ki se kaže kot rdeč mehurjast izpuščaj in se širi preko spodnjega dela trebuha, ritnic, presredka in mednožja.

VIPomi izločajo vazoaktivni intestinalni polipeptid, ki povzroča vodene diareje, hiperkalcemijo, hipokalemijo, aklorhidrijo, hiperglikemijo, dehidracijo in zardevanje.

Simptomi, ki kažejo na prisotnost somatostatinoma pa vključujejo diabetes, diarejo oz. steatorejo, boleznj žolčnika, hipoklorhidrijo in izgubo telesne teže.

Nefunkcionalni tumorji izločajo peptide, ki ne povzročajo posebnih kliničnih simptomov. Kadar se pojavijo v črevesju, se kažejo s simptomi, kot so krvavitve v gastrointestinalnem

traktu in intestinalno obstrukcijo. Nefunkcionalni tumorji pankreasa pa lahko povzročajo abdominalno neugodje, bolečino, povečana jetra in v nekaterih primerih tudi zlatenico (22, 23).

### 1.6.1 Biokemični označevalci

NET glede na mesto izvora sproščajo različne hormone in peptide, ki nam kot biokemijski markerji (preglednica 7) služijo za postavitvev oz. potrditev diagnoze, spremljanje bolezni, imajo pa lahko tudi prognostično vrednost (24).

**Preglednica 7:** Specifični biokemijski označevalci za vsako vrsto tumorja (24)

Mesto	Vrsta tumorja	Označevalec
Vsi		KgA in KgB PP, NSE, neurokinin, neurotensin HCG- $\alpha$ in HCG- $\beta$
Timus	Karcinoid sprednjega dela pračrevesa	ACTH
Bronhus	Karcinoid sprednjega dela pračrevesa, drobnocelični pljučni rak	ACTH, ADH, serotonin, 5-HIAA Histamin, GRP, GRPRH, VIP, PTHrp
Želodec	Karcinoid sprednjega dela pračrevesa, gastrinom	Histamin, gastrin
Pankreas	Gastrinom, insulinom, glukagonom Somatostatinom, PPom, VIPom	Gastrin, insulin, proinzulin, glukagon, somatostatin C-peptid, neurotensin, VIP, PTHrp, kalcitonin
Dvanajstnik	Gastrinom, somatostatinom	Somatostatin, gastrin
Ileum	Karcinoid srednjega dela pračrevesa	Serotonin, 5-HIAA NKA, neuropeptid K, SP
Kolon in rektum	Karcinoid zadnjega dela pračrevesa	Peptid YY, somatostatin

NSE (nevronspeficična enolaza), HCG (človeški horionski gonadotropin), ADH (antidiuretični hormon), GRP (gastrin sproščujoči peptid), PTHrp (paratiroidnemu hormonu sorodna beljakovina) SP (substancia P)

## **1.6.2 Slikovne preiskavne metode za diagnostiko NET**

### **1.6.2.1 Scintigrafija**

Scintigrafija je neinvazivna preiskavna metoda, pri kateri dobimo dvodimenzionalno sliko telesa na podlagi sevanja, ki ga oddaja v telo vnešeni radiofarmak. Le-ta se veže na različne receptorje, ki jih na svoji površini izražajo celice tumorjev. Za diagnostiko NET je še posebej primeren somatostatinski receptor, ki ga najdemo pri večini nevroendokrinih celic (55-95 %). Na te receptorje (predvsem podtipa 2 in 5) se veže indijem označeni pentetreotid, ki je konjugat oktreetida (oktapeptidni somatostatinski analog). Radiofarmak pride v celico s pomočjo endocitoze pentetreotid-receptor kompleksa. Temu sledi disociacija od receptorja, pri čemer ostane radiofarmak v lizosomu, receptor pa se reciklira na celični membrani (22, 25).

### **1.6.2.2 Pozitronska emisijska tomografija (PET)**

Pri NET, ki jih ne moremo diagnosticirati z scintigrafijo uporabljamo PET. Pri tej metodi bolniku v kri vbrizgamo radiofarmak, ki ima pozitronski sevalec. Tako dobimo trodimenzionalno sliko funkcijskih procesov v telesu. Pri diagnostiki NET uporabljamo predvsem 18- FDG (F-18-fluorodeoksiglukoza) in C11-5HTP (C-11-5-hidroksitriptofan) (22, 26).

### **1.6.2.3 Računalniška tomografija (CT), magnetna resonanca (MR) in ultrazvočna preiskava (UZ)**

Poleg scintigrafije in PET se za točno lokalizacijo in vizualizacijo tumorja uporabljajo CT, MR in UZ. Endoskopski ultrazvok je še posebej uporaben za lokalizacijo inzulinomov in gastrinomov, njegova občutljivost je 45-60 % za detekcijo NET dvanajstnika in 90-100 % za lokalizacijo NET pankreasa. Uporabne so tudi bronhoskopija, kolonoskopija in gastrokopija (22, 26).

## **1.7 ZDRAVLJENJE NET**

Zdravljenje NET zahteva multimodalni pristop in mora biti individualizirano glede na tip tumorja in prisotnost simptomov.

### **1.7.1 Kirurško zdravljenje NET**

S kirurško odstranitvijo tumorja lahko dosežemo popolno ozdravitev. V primeru, da so prisotni oddaljeni zasevki ali kadar je tumor inoperabilen, napravimo zmanjševalno operacijo z namenom lajšanja simptomov (22).

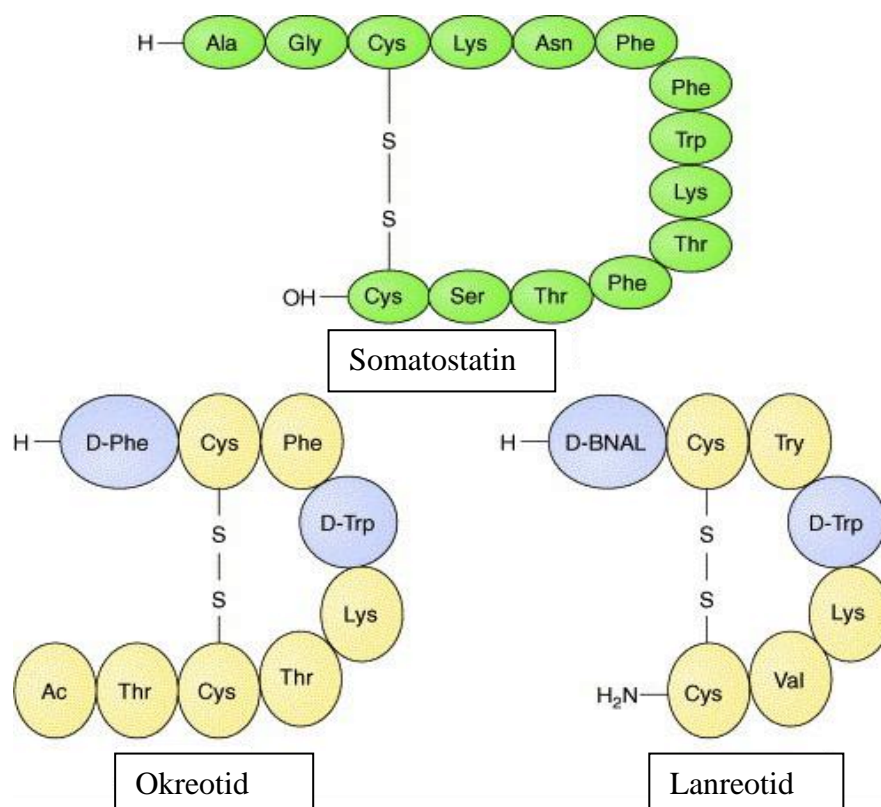
### **1.7.2 Transarterijska kemoembolizacija in radiofrekvenčna ablacija**

Transarterijska kemoembolizacija (TACE) je paliativna oblika zdravljenja in se uporablja pri bolnikih z zasevki v jetrih. S pomočjo katetra preko jeternega žilja dosežemo tumor v jetrih, v katerega vbrizgamo citostatik in embolizacijsko sredstvo. Citostatiki, ki se uporabljajo pri tej terapiji so doksorubicin, cisplatin, streptozocin in drugi. Namen TACE je zamašiti prehranjevalno žilja tumorja in zavreti njegovo rast (7, 9).

Radiofrekvenčna ablacija (RFA) je prav tako paliativna metoda zdravljenja GEP-NET. Pri RFA s pomočjo radiofrekvenčnih sond dovajamo toploto v željeno področje. Le-ta uniči oz. razgrajuje tumorsko tkivo. Popolno oz. signifikantno zmanjšanje simptomov so opazili pri 69-86 % bolnikih zdravljenih z RFA (7).

### **1.7.3 Somatostatin in analogi**

Somatostatin je peptid, ki inhibira izločanje številnih hormonov in se uporablja za simptomatsko zdravljenje NET že od leta 1980 in še vedno ostaja glavno sredstvo za kontrolo simptomov GEP-NET. V zgodnejših raziskavah so uporabljali subkutane injekcije s 150 mg somatostatina trikrat na dan in opazili izboljšanje simptomov pri 88% pacientov. Zaradi njegovega kratkega razpolovnega časa so sam somatostatin nadomestili njegovi dolgodelujoči analogi, kot so oktreotid (10 mg, 20 mg ali 30 mg) ali lanreotid avtogel (60 mg, 90 mg ali 120 mg). Podaljšano delovanje so dosegli z zamenjavo L-triptofana z D-triptofanom, kar zmanjša encimsko degradacijo in stabilizira molekulo (slika 3) (27). Zdravljenje se ponavadi začne z intramuskularno aplikacijo 20 mg dolgodelujočega oktreotida po predhodnem testiranju senzitivnosti s subkutano formulacijo. Sledi prilagajanje odmerka glede na intenzivnost simptomov (7).



**Slika 3:** Zaporedje aminokislin pri somatostatinu in njegovih analogih okreotidu in lanreotidu (27)

Analogi somatostatina (oktreotid, lanreotid, vapreotid) naj bi poleg kontrole simptomov izkazovali tudi direktne in indirektne učinke na tumor. Direktni učinki, kot so zaustavitev rasti tumorja in stimulacija apoptoze ter indirektni učinki, kot so antiangiogeneza in imunomodulatorni učinki, naj bi bili odvisni od podtipa receptorja, ki ga tumor izraža. Za stimulacijo imunomodulatornega efekta se analogi somatostatina uporabljajo tudi v kombinaciji z interferonom-alfa (7).

#### 1.7.4 Sistemska kemoterapija NET

Citotoksična terapija ostaja prva izbira za zdravljenje pacientov z neoperabilnimi GEP-NET, ki so že metastazirali. Kljub zgodnji uporabi citotoksičnih učinkovin, pa odziv opazimo pri precej nizkem odstotku pacientov (0-33 %). Uporabljajo se različni citostatiki predvsem 5-fluorouracil, streptozocin, doksorubicin in njihove kombinacije (7).



### **1.7.5 Radionuklidna terapija NET**

Tarča te varne in učinkovite terapije je receptor za somatostatin tipa 2, ki ga celice nekaterih GEP-NET prekomerno izražajo. Te tumorje identificiramo s pomočjo SRS (scintigrafija somatostatinskega receptorja). Uporabljajo se somatostatinski analogi označeni z beta emiterji itrij-90 ( $^{90}\text{Y}$ ) in lutecij-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ) v kombinaciji z DOTA kelatorji z visoko afiniteto(7).

### **1.7.6 Nove tarče za zdravljenje GEP-NET**

GEP-NET so dobro ožiljeni tumorji in izražajo proangiogene molekule, kot je vaskularni endotelijski rastni faktor. Poleg tega se na površini celic teh tumorjev nahajajo številni receptorji za rastne faktorje in njihove “downstream” efektorje. Med njimi najdemo tirozin kinazne receptorje, kot je receptor za epidermalni rastni faktor, receptor za faktor matičnih celic c-KIT, receptor za insulinu podoben rastni faktor 1, fosfoinozimid-3-kinaza, RAC- $\alpha$  serin/treonin protein kinaza, tarča rapamicina pri sesalcih in receptor za rastni faktor trombocitov. Le-ti predstavljajo nove terapevtske tarče, katerih učinkovitost pri zdravljenju GEP-NET je trenutno predmet raziskav (7).

## **1.8 TUMORSKI OZNAČEVALCI**

Tumorski označevalci (TO) so snovi, ki so produkt malignih celic, ali snovi, ki so nastale v drugih celicah pod vplivom malignih celic in jih lahko določimo v telesnih tekočinah. To so lahko nosintetizirane snovi, ki jih v zdravem organizmu ne najdemo, ali snovi, ki so v normalnem organizmu prisotne v veliko nižjih koncentracijah. Tako nam kot tumorski označevalci lahko služijo membranski antigeni, hormoni, encimi, poliamini, nukleozidi, produkti onkogenov, produkti tumorskih supresorskih genov ali podatki o DNA plodiji celic in deležu celic v S- fazi celičnega ciklusa (28).

Določanje TO nam lahko pomaga pri diagnozi bolezni in napovedovanju njenega poteka, pri določanju stadija bolezni in izbiri načina zdravljenja ter pri zgodnjem odkrivanju ponovitve in razširitve bolezni (28).

Lastnosti idealnega tumorskega označevalca:

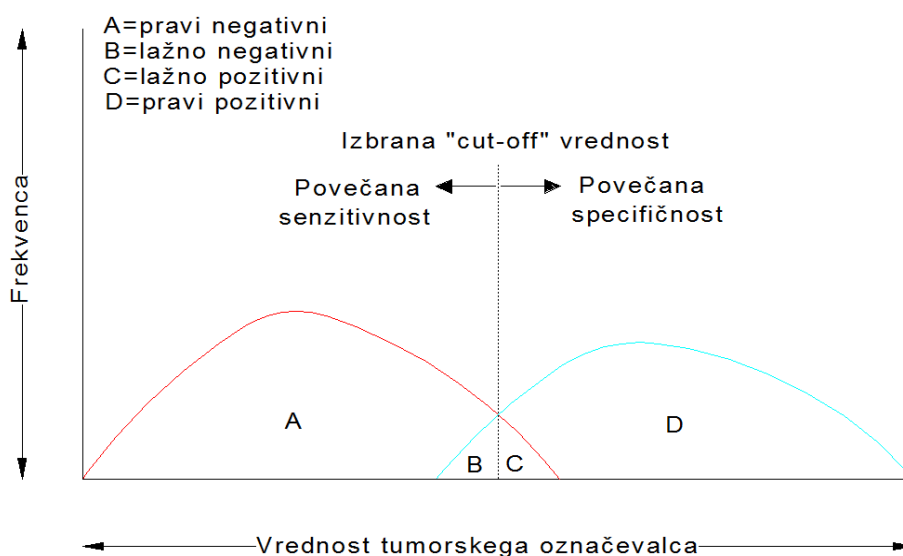
- označevalec naj bi bil prisoten samo v tumorskih celicah
- značilen naj bi bil za določen organ in vrsto tumorja
- označevalec naj bi bil določljiv v serumu vseh bolnikov z istim tipom tumorja
- označevalec naj bi bil določljiv v serumu na začetku razvoja tumorja
- njegove koncentracije naj bi odražale dinamiko rasti tumorske mase
- serumske koncentracije pa naj bi bile uporabne kot napovedni dejavnik poteka bolezni

Protitelesa proti posameznim tumorskim označevalcem lahko navzkrižno reagirajo z drugimi antigenskimi strukturami, zaradi tega ne moremo govoriti o povsem specifičnem označevalcu ali metodi za spremljenje prisotnosti malignih tumorskih celic. Pri vrednotenju rezultatov moramo vedno imeti v mislih, da maligna bolezen ni edini vzrok za povišane vrednosti tumorskih označevalcev, ampak da obstaja več faktorjev, ki vplivajo na njihovo koncentracijo.

Uporabno vrednost in vlogo posameznega tumorskega označevalca opredelimo s pojmom **občutljivost** in **specifičnost** (preglednica 8). Specifičnost predstavlja delež preiskovancev, ki nimajo določene bolezni in imajo normalen nivo označevalca. Označevalec je tem bolj specifičen, čim manjkrat je prisoten pri ljudeh brez določene vrste tumorja oz. čim manj je lažno pozitivnih določitev. Občutljivost označevalca pa pove, pri kolikšnem deležu bolnikov z določenim tumorjem je nivo označevalca povišan. Idealen tumorski označevalec naj bi bil 100 % občutljiv, njegova mejna vrednost pa naj bi bila 0. Mejna vrednost (cut-off vrednost) je arbitrarno določena koncentracija označevalca, nad katero je njegova vrednost povišana. Postavimo jo tako, da dosežemo nek kompromis med specifičnostjo in občutljivostjo označevalca, saj večanje specifičnosti pomeni istočasno zmanjšanje njegove občutljivosti in obratno (slika 4) (20).

**Preglednica 8:** Izračunavanje občutljivosti in specifičnosti (28)

	označevalec povišan	označevalec normalen
število bolnikov z določeno vrsto maligne bolezni	A	B
število ljudi brez določene vrste maligne bolezni	C	D
<b>Občutljivost=A/(A+B); specifičnost=D/(C+D)</b>		

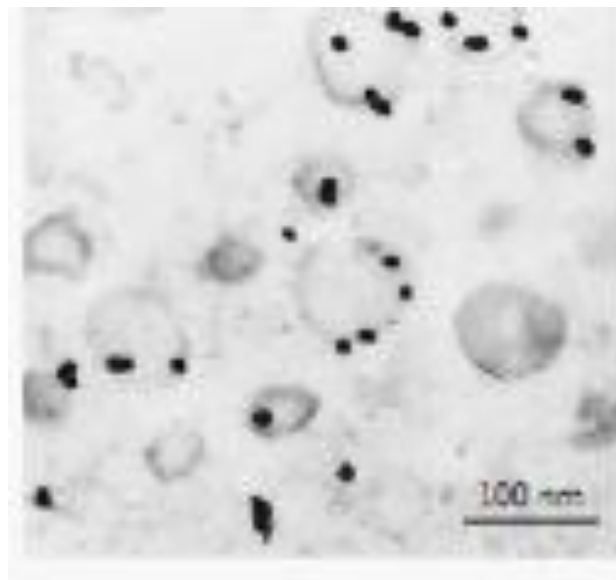


**Slika 4:** Občutljivost in specifičnost tumorskega označevalca

Koncentracije posameznih označevalcev so pri posameznikih različne, zato je priporočljivo večkratno določanje označevalcev in spremljanje gibanja koncentracij. Nivo označevalcev naj bi izmerili pred začetkom zdravljenja, nekajkrat med zdravljenjem in daljši čas po končanem zdravljenju z namenom pravočasnega odkrivanja morebitne ponovitve bolezni (28).

## 1.9 KROMOGRANINI - SEKRETOGRANINI

Kromogranini so proteini, ki jih najdemo v gosto-jedernih sekretornih granulah (slika 5) endokrinih, nevroendokrinih in živčnih celic. Pod vplivom stimulusa se iz njih izločajo z eksocitozo skupaj z neuropeptidi, hormoni in nevrotansmitterji. Prvi med njimi je bil odkrit KgA v kromafinih celicah goveje nadledvične žleze. V družino kromograninov spadajo še kromogranin B, ki je bil najprej identificiran v celicah feokromocitoma podgane, sekretogranin II (ali kromogranin C), prvič opisan v celicah hipofize, ter še sekretogranini III, IV, V, VI (29).



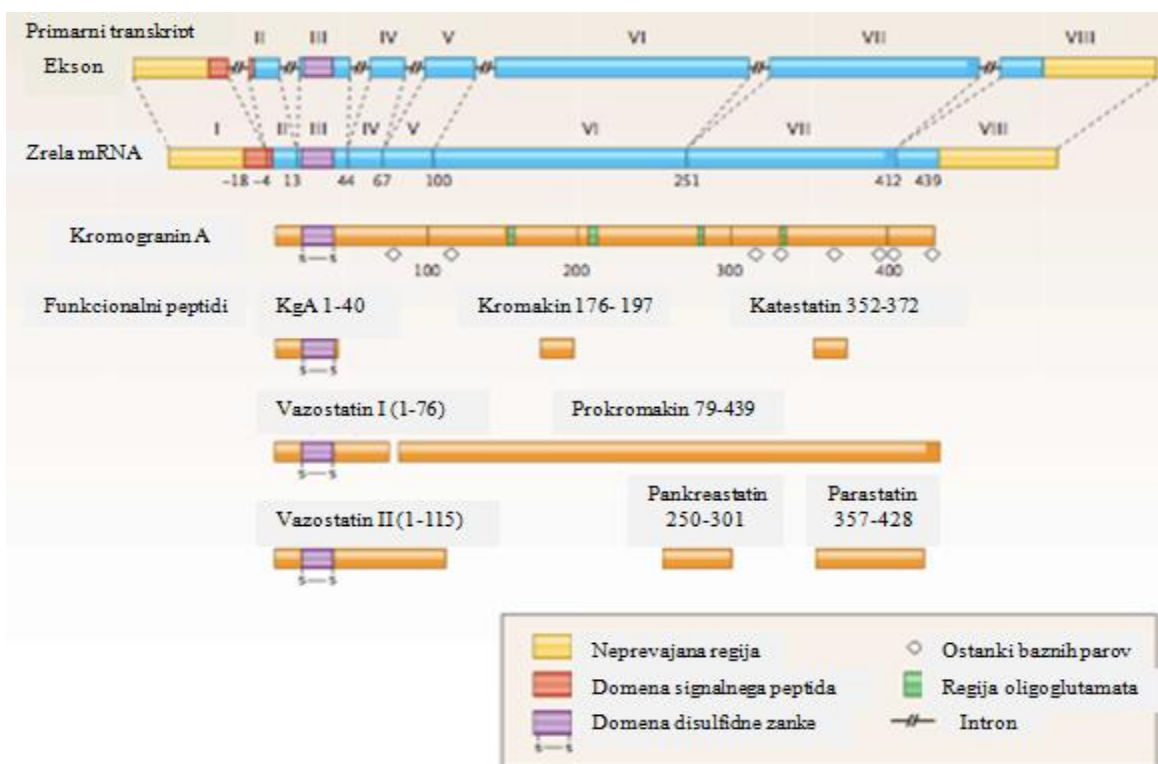
**Slika 5:** Goveja kromafina celica; okrogle strukture so sekretorne granule (29)

### 1.9.1 Struktura in lastnosti kromogranina A

KgA je kisel glikoprotein, topen v vodi, z molekulsko maso 49 kD. Je močno hidrofilen z izoelektrično točko 4,5-5,0. Sposoben je glikoziliranja, fosfatiranja in sulfatiranja. Zrel protein sestavlja 439 aminokislinskih ostankov. Ima od 8-14 parov bazičnih aminokislin, ki so pripravno mesto za njegovo proteolitično cepitev. KgA veže kalcij z nizko afiniteto a visoko kapaciteto. Pri nizkem pH ob prisotnosti kalcija tvori agregate. Ti agregati pod elektronskim mikroskopom izgledajo kot gosta jedra (29, 30).

## 1.9.2 Biosinteza

Gen za KgA je lociran na kromosomu 14 in ga sestavlja 12,15 kb. Organiziran je v osem eksonov in ima tako 5' kot 3' nekodirajoče regije (slika 6). Prepis približno 2 kb se prevede v protein KgA z 457 aminokislinami (31). KgA se sinteizira v zrnatem endoplazmatskem retikulumu in se transportira v Golgijev aparat. Tam se loči od proteinov, ki se izločajo po konstitutivni poti in se v trans Golgijevem omrežju zapakira v nezrele sekretorne granule. V sekretornih granulah pa se del KgA cepi s pomočjo proteaz v druge biološko aktivne peptide z različnimi funkcijami (32).



Slika 6: Primarni transkript KgA in njegove funkcionalne domene (29)

### 1.9.3 Delovanje

Delovanje KgA je še vedno predmet številnih raziskav. Najbolj proučevana področja njegovega delovanja so vloga KgA kot prohormona in njegove intracelularne funkcije v samih sekretornih granulah.

#### 1.9.3.1 Intracelularne funkcije

Raziskave glede vloge KgA v sekretornih granulah so pokazale različne rezultate. Ena od lastnosti KgA je vezava kalcija in agregacija pri nizkem pH ob prisotnosti kalcija, zaradi česar je bilo predlagano, da ima KgA vlogo pri biogenezi sekretornih granul. To hipotezo naj bi potrdile tudi številne raziskave, saj naj bi se v primeru odsotnosti KgA zmanjšalo tako število kot tudi velikost sekretornih granul. Natančen mehanizem delovanja KgA še vedno ni popolnoma razjasnjen. KgA naj bi reguliral biogenezo sekretornih granul preko peptida serpenina, ki nastane iz KgA. Serpenin deluje kot ekstracelularna signalna molekula, ki poveča ekspresijo proteaznega inhibitorja proteaze neksin-1 (PN-1). Le-ta prepreči degradacijo proteinov granul v Golgijevem aparatu, kar spodbuja formacijo sekretornih granul (32, 33). N-terminalna domena KgA (KgA<sub>48-111</sub>) pa močno interagira s sekretograninom III. To je protein, ki se poveže s holesterolom v membrani GA v in deluje kot receptor za razvrščanje agregatov KgA v regulirano sekretorno pot. Ta njuna interakcija pa sproži odcepljanje nezrelih sekretornih granul iz trans Golgijevega omrežja (33). Druge raziskave na knock-out miškah niso pokazale, da bi odsotnost KgA vplivala na biogenezo sekretornih granul, saj se njegovo pomankanje kompenzira z povečano ekspresijo drugih graninov. Ti rezultati naj bi pričali o tem, da so granini kot celota pomembni za formacijo sekretornih granul in da lahko pomanjkanje enega od graninov v določeni meri nadomesti povečana ekspresija drugih proteinov iz te družine (34).

Pri proučevanju eksocitoze v knock out miškah so ugotovili, da se v kromofinih celicah brez KgA spremeni količina sproščenih kateholaminov, pride pa tudi do sprememb v kinetiki njihovega sproščanja. KgA ima vlogo pri kopičenju monoaminov v sekretornih granulah in deluje kot regulator eksocitoze (35, 36).

Ena izmed intracelularnih funkcij KgA je sodelovanje pri intracelularni mobilizaciji kalcija. KgA se veže na receptor za 1,4,5-trifosfat (IP<sub>3</sub>), ki se nahaja na membrani sekretornih granul in olajša sproščanje kalcija kot odgovor na IP<sub>3</sub> (31).

### 1.9.3.2 Ekstracelularne funkcije

Prisotnost številnih parov bazičnih aminokislin nakazuje, da je KgA prohormon, iz katerega nastanejo po post-translacijski proteolitični cepitvi številni biološko aktivni peptidi.

Prvi med njimi je bil odkrit **pankreastatin** (PST, KgA<sub>240-288</sub>), ki so ga prvič izolirali in identificirali v trebušni slinavki prašiča. PST in vitro dviguje glukozo v krvi tako, da inhibira z glukozo stimulirano sproščanje insulina iz beta celic trebušne slinavke. Inhibira tudi privzem glukoze v adipocitih in hepatocitih in inducira glikogenolizo. Pri ljudeh PST vpliva na metabolizem ogljikovih hidratov in lipidov. Pri nekaterih boleznih (diabetes tipa II) njegove koncentracije variirajo. Ena izmed treh različic PST izkazuje večjo sposobnost inhibicije privzema glukoze v celice, kar nakazuje, da ima PST vlogo pri interindividualnih razlikah pri razpolaganju z glukozo (37, 38). Poleg tega PST inhibira izločanje amilaze iz eksokrinega pankreasa, izločanje želodčne kisline iz parietalnih celic in izločanje PTH iz paratireoidnih celic (29).

**Vazostatin** (VS) I (KgA<sub>1-76</sub>) in II (KgA<sub>1-13</sub>) sta peptida, ki izhajata iz N-terminalnega dela KgA. Njuno poimenovanje pa izhaja iz dejstva, da inhibirata vazokonstrikcijo. Poleg tega modulirata celično adhezijo, sproščanje PTH iz paratireoidnih celic, interakcijo fibroblastov in gladkih mišičnih celic z ekstracelularnim matriksom in vplivata na tumorsko rast (31).

**Katestatin** (CST) izhaja iz C-terminalnega dela KgA (KgA<sub>352-372</sub>). Nedavne študije na izoliranih celicah in organizmih so pokazale, da deluje kot modulator sekrecije kateholaminov iz kromafinih celic in adrenergičnih nevronov. Je endogeni nekompetitivni antagonist nikotinskih receptorjev in tako zavira nikotinsko holinergično sproščanje kateholaminov. Poleg tega stimulira sproščanje histamina iz mastocitov in modulira simpatično in parasimpatično aktivnost z delovanjem na baroreceptorski center v nucleus tractus solitarius. Njegova koncentracija je nizka tako pri bolnikih z hipertenzijo kot pri ljudeh z normalnim krvnim tlakom z družinsko zgodovino hipertenzije. Nizka koncentracija CST napoveduje povečan adrenergični odgovor na okoljske stresorje, kar nakazuje, da bi lahko bila nizka koncentracija CST faktor tveganja za razvoj hipertenzije. Poleg tega so identificirali tri različice tega proteina, ki se razlikujejo glede na sposobnost inhibicije izločanja kateholaminov. Ena izmed različic povečuje občutljivost

baroreceptorjev in srčno parasimpatično aktivnost ter zmanjšuje srčno simpatično aktivnost, kar bi lahko pomenilo, da imajo ljudje s tem polimorfizmom manjšo možnost za razvoj hipertenzije (39).

Nekateri peptidi, ki izhajajo iz KgA pa izkazujejo antibakterijske in antifungalne lastnosti z različnimi mehanizmi delovanja. Mednje spadajo **prokromakin**, **kromakin I** in **kromakin II** (29).

#### **1.9.4 KgA in NET**

Kg A se izloča iz veziklov neuroendokrinih celic skupaj z ostalimi peptidi, amini in hormoni. Ena izmed njegovih pomembnih lastnosti je tudi ta, da se ne izloča le iz celic funkcionalnih NET, ampak tudi iz tistih slabše diferenciranih tumorjev, ki ne izločajo znanih hormonov. Povišane vrednosti KgA najdemo pri 50 – 100 % vseh NET, odvisno od vrste tumorja ( gastrinomi – 100 %; feokromocitomi – 89 %; karcinoidni tumorji – 80 %; nefunkcionalni NET tumorji pankreasa – 69 %). Njegove vrednosti so odvisne tudi od mase tumorja, progresije in maligne narave tumorja (24).

### **1.10 VPLIVI RAZLIČNIH DEJAVNIKOV IN BOLEZNI POLEG NET NA KONCENTRACIJO KgA V KRVI**

Poleg NET lahko na koncentracijo KgA v krvi vplivajo številni drugi dejavniki, kot so različne bolezni, jemanje različnih zdravil idr. Upoštevanje teh dejavnikov je ključno za pravilno interpretacijo pridobljenih rezultatov, postavljanje diagnoze ali ocenitev poteka zdravljenja.

Najpogostejša vzroka za povišanje KgA v krvi sta atrofični gastritis in gastritis zaradi okužbe s *Helicobacter pylori*. Kronično povišanje gastrina v serumu pri bolnikih z gastritisom, še posebno pri tistih, ki se zdravijo z inhibitorji protonske črpalke, lahko privede do hiperplazije ECL celic želodca (celice podobne enterokromafinim celicam). Merjenje KgA bi lahko uporabljali za spremljanje hiperplazije teh celic, ki lahko vodi do neoplazije neuroendokrinih celic. Bolniki, pozitivni na *Helicobacter pylori*, imajo povišane serumske vrednosti gastrina in KgA. Povišane vrednosti KgA lahko najdemo tudi v primeru ledvične ali jetrne odpovedi. Tudi karcinom prostate in benigna hiperplazija



prostate lahko vodita do povišanih vrednosti KgA. Rahlo povišanje pa so opazili tudi pri ulcerativnem kolitisu, Chronovi bolezni, Parkinsonovi bolezni, revmatoidnem artritisu, hiperparatiroidizmu ter pri nekaterih ženskah po menopavzi in pri nosečnicah. Poleg bolezenskih stanj na koncentracijo KgA v krvi vplivajo tudi zdravila, predvsem inhibitorji protonske črpalke, antagonisti histaminskih receptorjev H2 v nekaterih primerih pa tudi kortikosteroidi. Spodnja preglednica prikazuje vpliv različnih patoloških stanj in zdravil na koncentracijo KgA v krvi (40).

**Preglednica 9:** Vpliv različnih patoloških stanj in zdravil na koncentracijo KgA v krvi (40)

<b>Visoko do zmerno povišanje KgA v krvi</b>	<b>Blago do zmerno povišanje KgA v krvi</b>
inhibitorji protonske črpalke antagonisti histaminskih receptorjev H2 kronični atrofični gastritis prizadeta ledvična funkcija revmatoidni faktor IgM nekateri nefrotoksični kemoterapevtiki rak prostate in benigna hiperplazija prostate	vnetne bolezni črevesja (ulcerativni kolitis, Chronova bolezen) nezdravljena esencialna hipertenzija akutni koronarni sindrom srčno popuščanje temporalni arteritis poslabšana jetrna funkcija (ciroza, kronični hepatitis) adenokarcinom trebušne slinavke sindrom razdražljivega črevesja hepatocelularni karcinom hipertiroidizem hiperparatiroidizem obstrukcija dihalnih poti pri kadilcih sistemski revmatoidni artritis Parkinsonova bolezen nosečnost nenevroendokrini tumorji (rak dojk, pljučni rak, gastrointestinalni karcinom, rak materničnega vratu, genitourinarni rak, maligne bolezni krvi in krvotvornih organov, rak genitourinarnega trakta)

KgA je relativno stabilen protein. Biološki material (serum, plazma) lahko daljši čas shranjujemo pri -20 °C. Nekaj ciklov zamrzovanja in odtaljevanja ne poškoduje molekule. Cirkulirajoči KgA je prisoten v krvi zdravih osebkih, njegove vrednosti pa niso odvisne od starosti in spola. Koncentracija KgA v krvi lahko tekom dneva niha za 20-25 %, najvišje

vrednosti pa so izmerili pozno popoldan in zvečer. Porast KgA po telesni aktivnosti je majhen, ponavadi je opazen pri ljudeh z esencialno hipertenzij (40).

KgA lahko tvori agregate v prisotnosti kalcija, zato se njegova vrednost razlikuje glede na to, ali je izmerjena v serumu ali plazmi. V slednji so izmerili od 20-76 % višje vrednosti (40).

Na koncentracijo KgA lahko vpliva tudi uživanje hrane, saj le-ta stimulira G in ECL celice želodca in tako povzroča sproščanje gastrina in KgA. Ta učinek so opazili predvsem pri bolnikih, ki so se dolgoročno zdravili z inhibitorji protonske črpalke ali antagonisti histaminskih receptorjev H<sub>2</sub> (40).

## **2 NAMEN DELA**

Kromogranin A je tumorski označevalec, ki se izloča iz sekretornih granul nevroendokrinih celic. Njegovo koncentracijo v serumu merimo pri diagnostični obravnavi bolnikov z NET. Pri tej diplomski nalogi bomo izračunali specifičnost in občutljivost tega tumorskega označevalca glede na zdrave preiskovance. Nato bomo primerjali dve skupini bolnikov, in sicer bolnike z metastazami in tiste brez njih. Izračunali bomo tudi občutljivost in specifičnost za ugotavljanje prisotnosti metastaz. Na tak način bomo ovrednotili njegovo klinično uporabnost pri postavljanju diagnoze in njegovo vrednost pri napovedovanju poteka bolezni.

## **3 MATERIALI IN METODE**

### **3.1 ZBIRANJE PREISKOVANCEV**

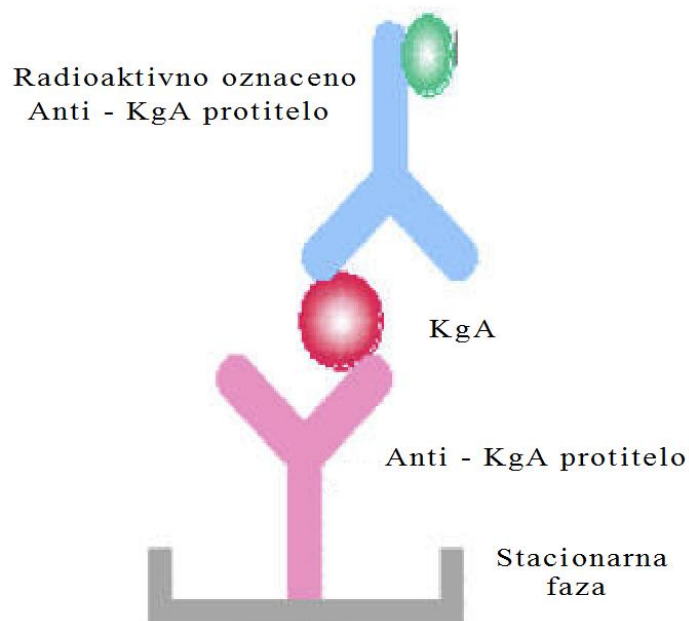
V diplomski nalogi smo obravnavali 29 bolnikov z diagnozo NET, ki so jim med januarjem 2010 in oktobrom 2011 izmerili vrednost KgA v krvi v Laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo v Ljubljani. Kontrolna skupina pa je obsegala 22 zdravih preiskovancev.

### **3.2 ZBIRANJE VZORCEV**

Vzorci krvi so bili odvzeti v epruveto brez antikoagulanta, torej so bile meritve izvedene v serumu. V primeru, da meritev opravimo v 24 urah od odvzema vzorca, le-tega shranimo v hladilniku pri temperaturi 2-8° C. V nasprotnem primeru vzorec razdelimo v alikvote in globoko zamrznemo (-20° C).

### **3.3 RADIOIMUNOLOŠKA METODA**

Koncentracijo KgA smo določili z radioimunometrično metodo, ki se lahko uporablja za določanje KgA tako v serumu kot v plazmi. Metoda temelji na vezavi dveh protiteles na sterično oddaljena mesta na molekuli KgA. S prvim protitelesom je prevlečena trdna stacionarna faza, drugo pa je označeno z jodom 125 in služi kot označevalec (slika 7). KgA, ki je prisoten v standardu ali vzorcu, se veže s protitelesom na stacionarni fazi. Na drugi del molekule KgA pa se veže označeno protitelo. Nevezan označevalec se odstrani z izpiranjem. Merimo radioaktivnost označenih protiteles, ki so vezana na KgA v vzorcu. Radiaktivnost je sorazmerna s koncentracijo KgA v vzorcu.



**Slika 7:** Princip metode RIA

### 3.3.1 Priprava reagentov

#### Reagenti v paketu CgA-RIACT:

- Prevljučene epruvete:  
Epruvete so na dnu prevlčene z anti-KgA monoklonskim protitelesom. Shranjujemo jih pri temperaturi 2-8 °C. Neuporabljene epruvete, ki jih odstranimo iz paketa shranjujemo v priloženi plastični vrečki.
- Anti KgA <sup>125</sup>I:  
Viale vsebujejo <sup>125</sup>I anti-KgA monoklonska protitelesa, pufer, goveji serum, natrijev azid, rdečo barvilo, neimunizirane mišje immunogloboline, EDTA. Shranjujemo jih pri temperaturi 2-8 °C.
- Standardi: liofiliziran reagent  
Viale vsebujejo različne koncentracije (50-125-300-600-1200 ng/l) rekombinantnega človeškega KgA, človeški serum, EDTA, konservans. Pred uporabo vialo rekonstituiramo z 0.5 mL destilirane vode. Shranjujemo jih pri temperaturi 2-8 °C. Na sobni temperaturi moramo že rekonstituirano raztopino

uporabiti v eni uri. Raztopino shranjujemo zamrznjeno v alikvotih pri temperaturi - 20 °C do 6 tednov.

- **Kontrole:** liofiliziran reagent

Viala vsebuje rekombinanten človeški KgA (180 ng/mL), človeški serum ter konzervans. Vialo rekonstituiramo z 0.5 mL destilirane vode. Shranjujemo jih pri temperaturi 2-8 °C. Na sobni temperaturi moramo že rekonstituirano raztopino uporabiti v eni uri. Raztopino shranjujemo zamrznjeno v alikvotih pri temperaturi - 20 °C do 6 tednov.

- **Pufer:**

Uporabljamo ga kot pufer za raztapljanje, topilo in slepi vzorec. Viale vsebujejo pufer, goveji serum, natrijev azid in EDTA.

- **Reagent za izpiranje:** fiziološka raztopina

### **3.3.2 Priprava vzorca**

Metodo izvedemo direktno na serumu. Kadar pričakujemo zelo visoke vrednosti KgA v vzorcu, vzorec razredčimo s pufrom. Vzorci, ki izkazujejo turbidnost, hemolizo, hiperlipidemijo ali vsebujejo fibrin lahko dajo napačne rezultate.

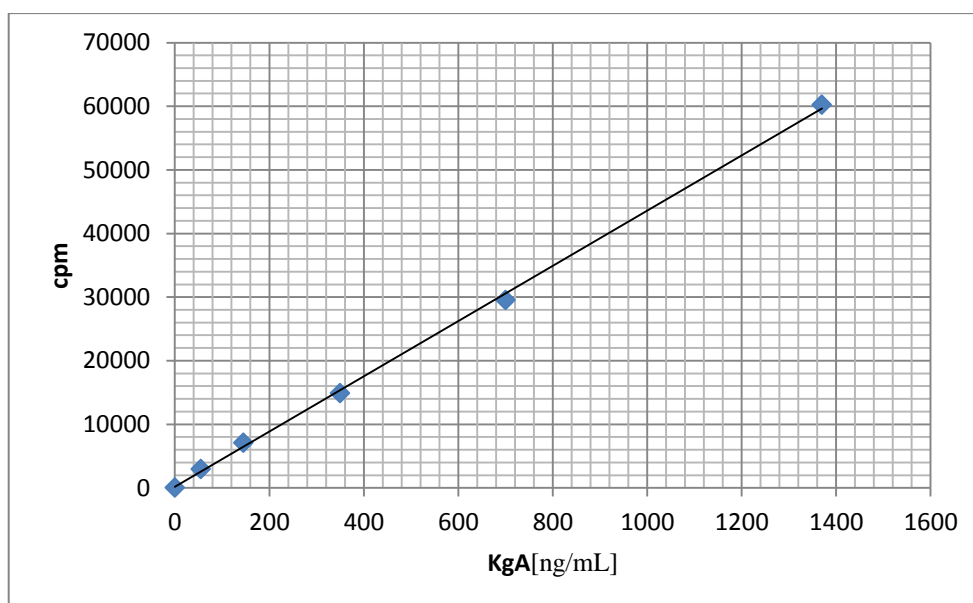
### **3.3.3 Postopek**

Vsaj trideset minut pred uporabo prenesemo vse reagente na sobno temperaturo (18-25 °C). Pripravimo štiri skupine epruвет. S slepim vzorcem določimo nespecifično vezavo. S pomočjo standardov določimo umeritveno krivuljo. Kontrolna skupina nam služi za kontrolo kakovosti in vzorčna skupina za testiranje vzorcev. Pri standardih izvedemo metodo trikrat, pri vzorcih pa dvakrat.

V vsako epruветo odpipetiramo 500 µL puфра. Dodamo 50 µL standarda, vzorca ali kontrole. Vsebinsko epruвет rahlo premešamo z Vortex mešalnikom. Inkubiramo 18-20 ur pri sobni temperaturi.

Sledi izpiranje obloženih epruвет. Previdno odpipetiramo tekočino iz epruвет. V vsako epruветo dodamo 1ml tekočine za izpiranje. Ponovno odpipetiramo tekočino iz epruвет. Pri tem pazimo, da odpipetiramo vso tekočino, saj tako zagotovimo pravilne rezultate in ustrezno ponovljivost.

V vsako epruветo dodamo 500  $\mu\text{L}$  antiKgA monoklonskega protitelesa. Inkubiramo 2 uri pri sobni temperaturi. Ponovno izperemo vsebino epruвет, kot je opisano zgoraj in izmerimo radioaktivnost (cmp, *angl. counts per minut*). Koncentracijo kromogranina A določimo s pomočjo umeritvene krivulje, kjer je na x osi koncentracija KgA v standardih in na y osi srednja cpm vrednost (slika 8).



**Slika 8:** Primer umeritvene krivulje

### 3.4 STATISTIČNE METODE

Za analizo pridobljenih podatkov smo uporabili GraphPad Prism5 program. Najprej smo preverili normalnost porazdelitve KgA po posameznih skupinah s pomočjo D'Agostino-Pearsonovega testa. V primeru, da so bile p vrednosti večje od 0,05 smo potrdili normalno porazdelitev spremenljivke, v nasprotnem primeru pa smo predpostavili, da se spremenljivka ne porazdeljuje statistično značilno normalno.

Za primerjavo skupin smo uporabili Studentov t-test. Še prej smo izvedli test homogenosti varianc oz. F-test. Z F-testom preverimo, če oba vzorca prihajata iz populacije z enako standardno variacijo oz. varianco. V primeru enakih varianc izberemo t-test na osnovi enakih varianc, v nasprotnem primeru pa t-test na osnovi neenakih varianc. V primeru, da je bila dobljena p vrednost pri t-testu manjša od 0,05 smo zavrnili ničelno hipotezo in sprejeli alternativno, torej da med skupinama obstaja statistično značilna razlika.

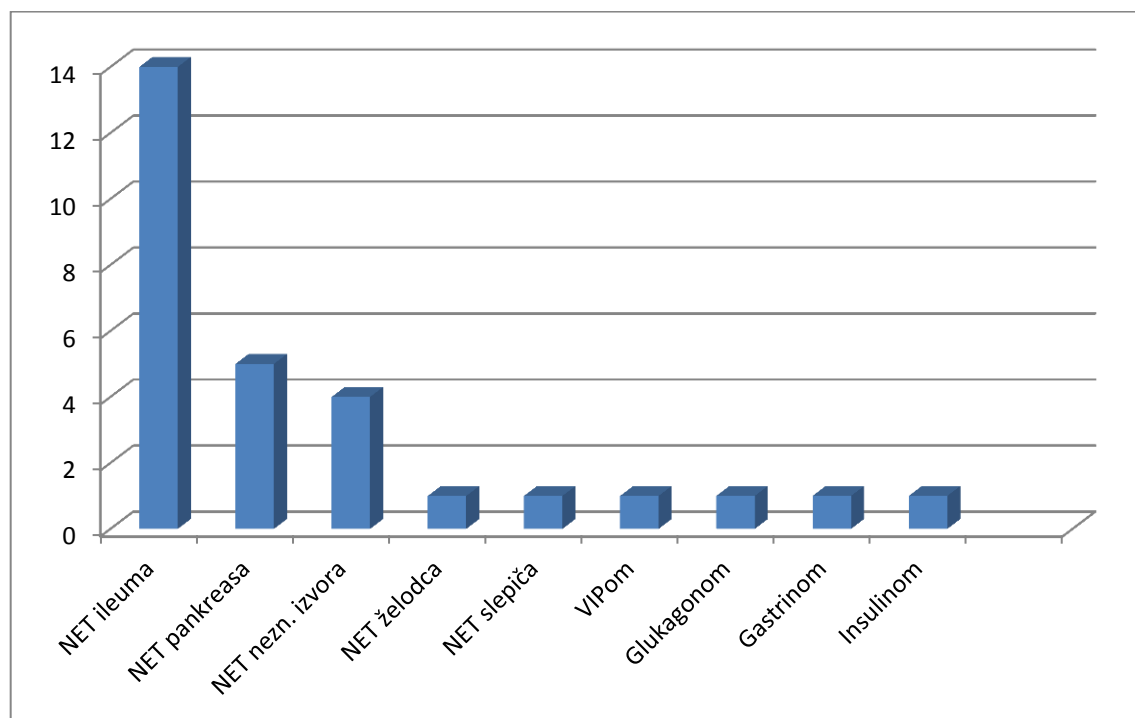
Občutljivost in specifičnost KgA smo predstavili z krivuljo občutljivosti in specifičnosti oz. takoimenovano ROC krivuljo (*angl. Receiver Operating Characteristic curve*). Na x-osi je prikazana specifičnost, na y-osi pa občutljivost. Diagnostična občutljivost je verjetnost, da ima oseba bolezen, če je test pozitiven. Diagnostična specifičnost pa je verjetnost, da bolezen ni prisotna pri ljudeh z negativnim rezultatom testa. Določili smo tudi površino pod ROC krivuljo (AUC, *angl. Area Under the ROC Curve*), ki nam podaja verjetnost, da bomo z našim testom ločili med skupinama preiskovancev.



## 4 REZULTATI

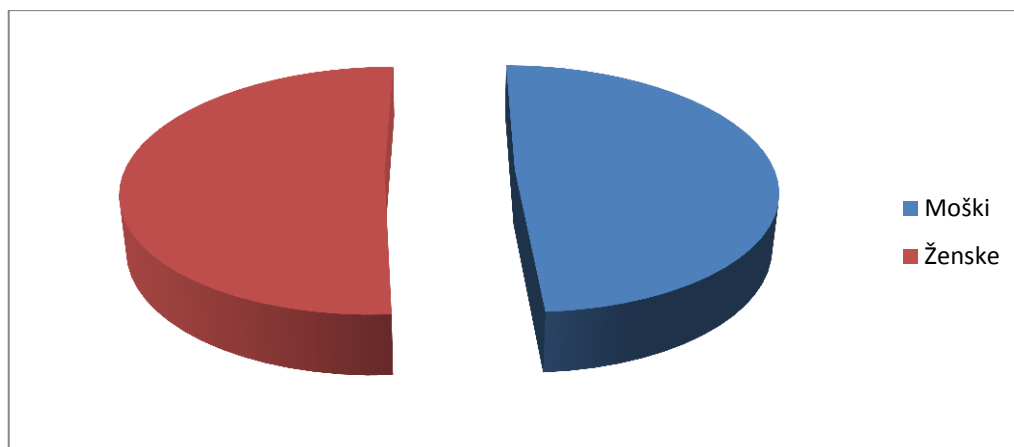
### 4.1 PODATKI O PREISKOVANCIH

V raziskavo smo vključili 51 preiskovancev. Med njimi je imelo 29 preiskovancev potrjeno diagnozo NET, v kontrolni skupini pa je bilo 22 zdravih preiskovancev. Bolni preiskovanci so imeli različne vrste NET. Tako jih je 14 med njimi imelo NET ileuma, 5 NET pankreasa, 4 NET neznanega izvora in po 1 NET želodca, slepiča ter VIPom, glukagonom in insulinom pankreasa in gastrinom. Zastopanost preiskovancev glede na vrsto oz. lokacijo primarnega NET je prikazana v spodnjem grafu (slika 9).



**Slika 9:** Zastopanost preiskovancev glede na vrsto oz. lokacijo NET

Med preiskovanci je bilo 26 žensk in 25 moških. Preiskovanci z NET so bili stari od 38 do 75 let, njihova povprečna starost pa je bila  $59,9 \pm 10,9$  let. Zdravi preiskovanci so bili stari od 21 do 63 let, njihova povprečna starost pa je bila  $42,0 \pm 13,2$  let. Zastopanost preiskovancev glede na spol je predstavljena na sliki 10.



**Slika 10:** Zastopanost preiskovancev glede na spol

V spodnjih preglednicah so predstavljene vrednosti KgA, ki so bile izmerjene pri posameznih preiskovancih, njihova starost in spol in v primeru bolnikov tudi prisotnost metastaz.

**Preglednica 10:** Vrednosti KgA pri bolnikih

Številka pacienta	Spol	Starost [leta]	KgA [ng/ml]	Prisotnost metastaz
1	Ž	75	203,3	Da
2	M	45	160,6	Ne
3	M	50	34,1	Da
4	M	70	680,2	Da
5	M	54	102,7	Ne
6	M	60	52,5	Ne
7	Ž	73	214,7	Da
8	Ž	51	138,1	Ne
9	M	60	85,5	Ne
10	Ž	61	48,2	Ne
11	Ž	44	12,5	Ne
12	M	68	134,8	Ne
13	Ž	68	31,5	Da
14	M	74	79,5	Da
15	Ž	58	44,1	Ne

16	M	74	174,8	Da
17	Ž	71	249,5	Ne
18	Ž	73	70,2	Ne
19	M	38	397,2	Da
20	Ž	73	1172,1	Da
21	M	50	94,6	Da
22	Ž	66	655,1	Da
23	Ž	47	265,6	Da
24	Ž	50	203,9	Da
25	M	60	74,5	Ne
26	M	56	44,4	Ne
27	Ž	48	41,2	Ne
28	M	54	39,7	Da
29	Ž	66	124,7	Ne

**Preglednica 11:** Vrednosti KgA pri zdravih preiskovancih

Zaporedna številka preiskovanca	Spol	Starost [leta]	Vrednost KgA [ng/ml]
1	Ž	63	52,1
2	Ž	32	40,8
3	Ž	47	42,5
4	Ž	36	23,4
5	Ž	27	27,1
6	Ž	31	61,1
7	Ž	52	82,5
8	Ž	22	67,3
9	Ž	55	21,1
10	Ž	35	33,1
11	Ž	61	20,8
12	M	57	40,8
13	M	40	95,8
14	M	21	32,1
15	M	34	25,7

16	M	53	22,9
17	M	35	35,1
18	M	50	23,0
19	M	26	48.8
10	M	37	72.9
21	M	54	39.4
22	M	57	40,0

## 4.2 OBDELAVA PODATKOV

V prvem delu smo izračunali specifičnost in občutljivost tega tumorskega markerja glede na zdrave preiskovance. V drugem delu pa smo bolnike razdelili na skupino z metastazami na tisto brez njih in naredili statistično primerjavo vrednosti KgA. Najprej smo izvedli test normalnosti, na osnovi katerega smo izbrali primeren test za ugotavljanje statistično signifikantnih razlik med skupinami.

## 4.3 DIAGNOSTIČNA OBČUTLJIVOST IN SPECIFIČNOST KgA GLEDE NA ZDRAVE PREISKOVANCE

Najprej smo v obeh skupinah preverili prisotnost osamelcev oz. izstopajočih vrednosti, ki bi lahko motili nadaljno statistično obdelavo. Osamelce vrednosti smo odkrili v skupini bolnikov in je v statistični obdelavi nismo upoštevali.

### 4.3.1 Določitev mejne vrednosti KgA na podlagi kontrolne skupine

Z uporabo podatkov iz kontrolne skupine preiskovancev smo določili mejno vrednosti KgA, ki smo jo uporabili pri izračunu občutljivosti in specifičnosti. Najprej smo naredili D'Agostino-Pearsonov test za preverjanje normalnosti porazdelitve podatkov v kontrolni skupini. Rezultat testa ( $p > 0.05$ ) je pokazal, da je porazdelitev podatkov v kontrolni skupini statistično značilno normalna.

### Izračun mejne vrednosti:

$$\text{Mejna vrednost (ng/mL KgA)} = m + t(0.975, n-1) \times \sqrt{\frac{n+1}{n}} \times \text{SD} = 87.8$$

m .....srednja vrednost

t.....kritična t vrednost pri enostranskem tveganju s prostostno stopnjo n-1

SD.....standardna deviacija

**Preglednica 12:** Podatki za izračun mejne vrednosti

<b>m</b>	<b>t (0.975,9)</b>	<b>n</b>	<b>SD</b>
43,10	2,08	22	21,04

Izračunana mejna vrednost je 87,8 ng/mL KgA. To je vrednost, na podlagi katere se odločimo, ali je test negativen ali pozitiven.

### **4.3.2 Primerjava skupin preiskovancev in izračun diagnostične specifičnosti in občutljivosti pri mejni vrednosti**

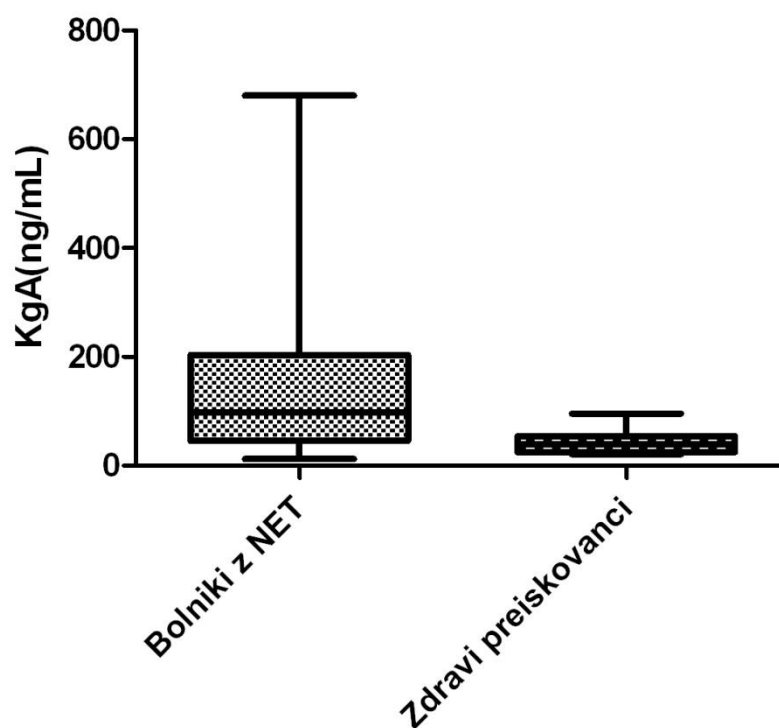
Najprej smo primerjali različne statistične parametre med obema skupinama (preglednica 13).

**Preglednica 13:** Vrednosti statističnih parametrov skupine rakavih bolnikov in kontrolne skupine

	<b>Bolniki</b>	<b>Zdravi</b>
<b>Aritmetična sredina</b>	98,65	43,10
<b>Mediana</b>	159,20	39,70
<b>Standardna deviacija</b>	168,80	21,04
<b>Maksimum</b>	680,20	95,80
<b>Minimum</b>	12,50	20,80

Število vzorcev	28	22
-----------------	----	----

Zanimalo nas je, ali je razlika med skupinama tudi statistično značilna. Izvedli D'Agostino-Pearsonov test, da bi ugotovili, ali se vrednosti v skupini bolnikov porazdeljujejo statistično značilno normalno. Ugotovili smo, da je porazdelitev normalna po logaritemski transformaciji ( $p=0,9738$ ). Porazdelitev podatkov v obeh skupinah prikazuje spodnji diagram. Nato smo uporabili F-test za ugotavljanje homogenosti varianc, katerega rezultat ( $p=0,0011$ ) je pokazal, da sta varianci signifikantno različni. Na podlagi tega testa smo izbrali t-test z upoštevanjem neenakih varianc za ugotavljanje statistično signifikantnih razlik med skupinama. Le-ta je pokazal ( $p<0.001$ ), da med kontrolno skupino in skupino z NET obstaja statistično signifikantna razlika.



**Slika 11:** Porazdelitev podatkov v obeh skupinah

S pomočjo spodnjih enačb smo izračunali diagnostično specifičnost in občutljivost KgA glede na mejno vrednost izračunano na podlagi kontrolne skupine. Rezultate smo razdelili na resnično pozitivne, lažno pozitivne, resnično negativne in lažno negativne upoštevajoč mejno vrednost (preglednica 14).

**Preglednica 14:** Število preiskovancev z pravim pozitivnim (PP), lažno pozitivnim (LP), pravim negativnim (PN) in lažno negativnim (LN) rezultatom testa

	Rezultat testa	
	Pozitivni	Negativni
<b>Bolniki z NET</b>	PP=15	LN=13
<b>Zdravi</b>	LP=1	PN=21

**Izračun diagnostične specifičnosti in občutljivosti:**

$$\text{Diagnostična občutljivost [\%]} = \frac{PP \times 100}{PP + LN} = 53,5\%$$

$$\text{Diagnostična specifičnost [\%]} = \frac{PN \times 100}{PN + LP} = 95,5\%$$

Pri mejni vrednosti 87,8 ng/mL KgA znaša diagnostična občutljivost 53,5 %, diagnostična specifičnost pa 95,5 %. Občutljivost bi lahko povečali tako, da bi znižali mejno vrednost, a bi s tem povečali število lažno pozitivnih rezultatov in s tem zmanjšali specifičnost. S pomočjo ROC krivulje (slika 12) smo izračunali specifičnost in občutljivost pri različnih mejnih vrednostih (preglednica 15).

**Preglednica 15:** Občutljivost in specifičnost pri različnih mejnih vrednostih

Mejna vrednost	Občutljivost	Specifičnost
16,65	96,43	0,00
22,00	96,43	9,091
23,20	96,43	18,18
26,40	96,43	27,27
31,80	92,86	31,82
33,60	92,86	40,91
37,25	89,29	45,45
39,85	85,71	50,00

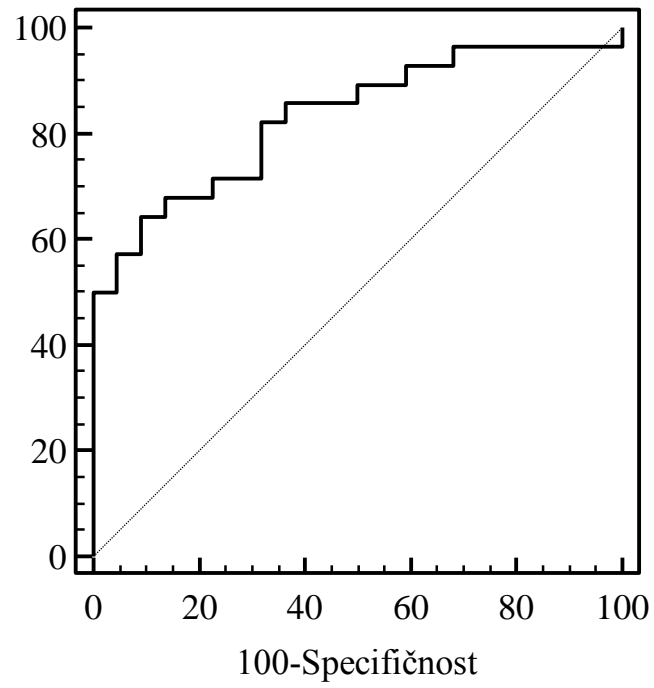
41,00	85,71	63,64
43,30	82,14	68,18
46,30	75,00	68,18
50,45	71,43	72,73
56,80	67,86	77,27
68,75	67,86	86,36
73,70	64,29	90,91
81,00	57,14	90,91
90,05	53,57	95,45
99,25	50,00	100,00
129,80	42,86	100,00
149,40	39,29	100,00
189,10	35,71	100,00
209,30	28,57	100,00
257,60	21,43	100,00
526,20	7,143	100,00
667,70	3,571	100,00

Izračunali smo tudi površino pod ROC krivuljo, ki predstavlja zmožnost, da bo določanje koncentracije KgA v krvi ločilo med zdravimi in bolniki z NET. Le-ta v našem primeru znaša 0,8312. Ostali parametri ROC analize so predstavljeni v spodnji preglednici. Določili smo tudi mejno vrednost, ki predstavlja najboljši kompromis med specifičnostjo in občutljivostjo. To je 72,9 ng/mL KgA. Občutljivost v tem primeru je 64,3 %, specifičnost pa 90,9 %.

**Preglednica 16:** Analiza ROC za KgA

<b>AUC</b>	<b>P</b>	<b>95% interval zaupanja</b>
0,8312	<0,0001	0,7188-0,9435



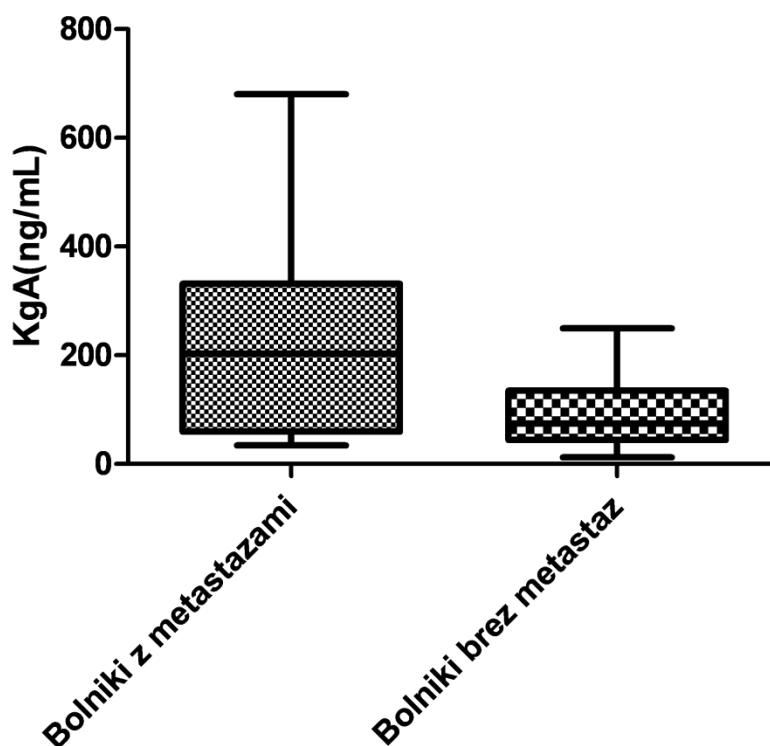


**Slika 12:** Krivulja ROC za KgA (zdravi/bolniki z NET)

## 4.4 PRIMERJAVA VREDNOSTI KgA MED BOLNIKI Z IN BREZ METASTAZ

### 4.4.1 Primerjava srednjih vrednosti in standardnih odklonov

Kvartilni diagram (slika 13) prikazuje primerjavo porazdeljenosti podatkov v obeh skupinah.



Slika 13: Kvartilni diagram

Povprečna vrednost KgA v skupini bolnikov z metastazami je 236,5 ng/mL medtem ko v skupini bolnikov brez metastaz le-ta znaša 92,23 ng/mL. Primerjava ostalih statističnih parametrov je prikazana v spodnji preglednici.

**Preglednica 17:** Vrednosti statističnih parametrov obeh skupin bolnikov

	<b>Bolniki z metastazami</b> [ng/mL]	<b>Bolniki brez metastaz</b> [ng/mL]
<b>Aritmetična sredina</b>	236,5	92,23
<b>Mediana</b>	203,3	74,5
<b>Maksimum</b>	680,2	249,5
<b>Minimum</b>	31,5	12,5
<b>Standardna deviacija</b>	218,3	61,19
<b>Število vzorcev</b>	13	15

#### 4.4.2 Test normalnosti porazdelitve

Za testiranje normalnosti porazdelitve v obeh skupinah bolnikov smo uporabili D'Agostino-Pearsonov test. Spremenljivka se porazdeljuje normalno, če je vrednost p večja od 0,05. Iz preglednice 18 lahko razberemo, da je porazdelitev KgA v obeh skupinah statistično značilno normalna.

**Preglednica 18:** Rezultati testa normalnosti porazdelitve

	<b>Bolniki z metastazami</b>	<b>Bolniki brez metastaz</b>
<b>p</b>	0,0970	0.2436*

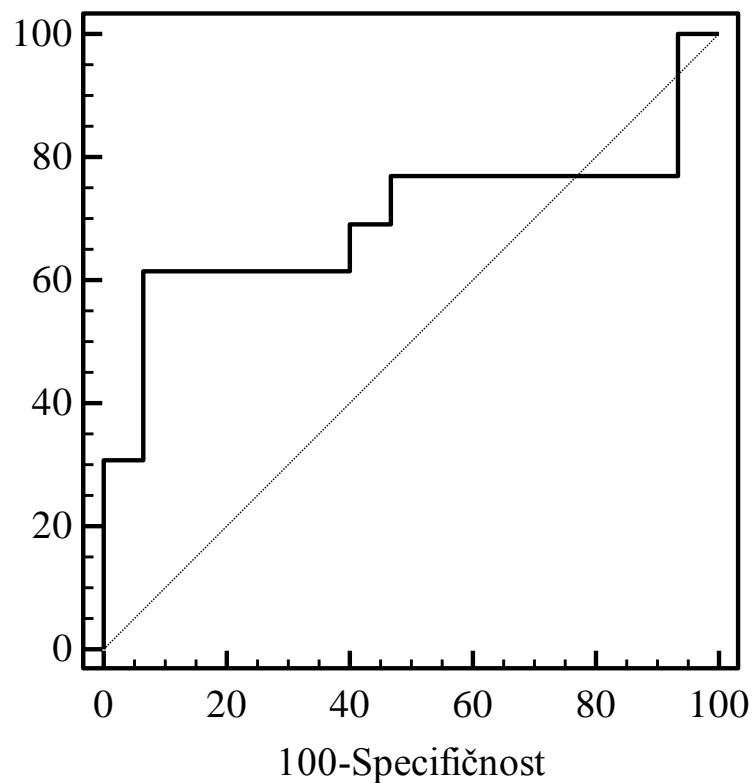
\*Po logaritemski transformaciji

#### 4.4.3 Ugotavljanje statistično signifikantnih razlik med skupinama bolnikov

Za ugotavljanje statistično signifikantnih razlik med obema skupinama bolnikov smo izvedli t-test z upoštevanjem enakih varianc. Za uporabo tega testa smo se odločili na podlagi F- testa, katerega rezultat ( $p=2,112$ ) je potrdil hipotezo o enakosti varianc. Rezultat t-testa ( $p=0.0423$ ) je dokazal, da obstaja statistično signifikantna razlika med obema skupinama bolnikov. Iz rezultatov lahko sklepamo, da imajo bolniki z metastazami višje vrednosti KgA v krvi kot bolniki brez njih.

#### 4.4.4 ROC krivulja

Za določitev mejne vrednosti s pomočjo katere bi lahko razlikovali med bolniki z metastazami in tistimi brez njih, smo uporabili ROC krivuljo (slika 14). Izbrali smo mejno vrednost 160,6 ng/mL, ki predstavlja najboljši kompromis med specifičnostjo (93,3 %) in občutljivostjo (61,5 %). Površino pod ROC krivuljo znaša 0,697.



**Slika 14:** ROC krivulja za KgA (bolniki z/brez metastaz)

## 5 RAZPRAVA

Z namenom, da bi ocenili klinično uporabnost KgA pri bolnikih z NET, smo izmerili njegovo serumsko koncentracijo 22 zdravim preiskovancem in 28 bolnikom z NET.

V prvem delu smo izračunali diagnostično specifičnost in občutljivost KgA glede na zdrave preiskovance. Najprej smo na podlagi rezultatov kontrolne skupine izračunali mejno vrednost, ki smo jo postavili pri 87,8 ng/mL. Na podlagi tega smo opredelili lažno pozitivne in lažno negativne rezultate. Specifičnost v tem primeru je bila 95,5 %, občutljivost pa 53,5 %. Kar pomeni, da vrednosti KgA nad mejno vrednostjo skoraj zagotovo pomenijo prisotnost NET, medtem ko nižja vrednost KgA le-tega ne izključuje. Zato je pri nižjih vrednostih pomembna uporaba drugih diagnostičnih metod. Vrednost nad 87,7ng/mL KgA smo odkrili le pri enem od zdravih preiskovancev. Ne moremo pa izključiti možnosti, da so bili pri njem prisotni drugi dejavniki, ki vplivajo na koncentracijo KgA v krvi. Diagnostično vrednost smo ocenili tudi s pomočjo ROC krivulje. Določili smo mejno vrednost, pri kateri bi dosegli najboljši kompromis med specifičnostjo in občutljivostjo. To je 72,9 ng/mL KgA. Občutljivost v tem primeru je 64,3 %, specifičnost pa 90,9 %. Izračunali smo tudi površino pod ROC krivuljo. Le-ta je znašala 0,8312, kar kaže na dobro zmogljivost našega testa, da loči med bolniki z NET in zdravimi preiskovanci. Podobne študije so pokazale nekoliko večjo občutljivost (77,8-84,0 %) kot v našem primeru a nižjo specifičnost (71,3-85,3 %) (24). Nižjo občutljivost bi lahko pripisali tudi dejstvu, da so naši vzorci naključni. Kar pomeni, da so bili nekateri od naših preiskovancev že izpostavljeni terapiji, kar pa lahko vpliva na koncentracijo KgA v krvi. Rezultati bi bili natančnejši, če bi vzorce zbrali ob postavitvi diagnoze.

V drugem delu smo bolnike razdelili na dve skupini, in sicer na skupino z metastazami (13 bolnikov) in skupino brez njih (15 bolnikov). Ugotovili smo, da so vrednosti KgA v skupini bolnikov z metastazami statistično značilno višje kot pri bolnikih brez njih ( $p = 0,0423$ ). Z uporabo ROC krivulje smo določili tudi mejno vrednost na podlagi katere bi lahko ločili bolnike z oz. brez metastaz. Mejna vrednost, ki predstavlja najboljši kompromis med diagnostično specifičnostjo in občutljivostjo je 160,6 ng/mL KgA. Specifičnost pri tej vrednosti znaša 93,3 %, kar pomeni, da ima 93,3 % bolnikov brez

metastaz koncentracijo KgA nižjo od 160,6 ng/mL. Občutljivost pa je 61,5 % , kar pomeni, da ima 61,5 % bolnikov z metastazami koncentracijo KgA v krvi višjo od mejne vrednosti. Izračunali smo tudi površino pod ROC krivuljo, ki znaša 0,697, kar nakazuje le zmerno zmogljivost našega testa, da razlikuje med obema skupinama bolnikov.

Raziskavo bi bilo smiselno razširiti na večje število preiskovancev s podrobnim pregledom anamneze preiskovancev za izključitev drugih dejavnikov, ki lahko vplivajo na koncentracijo KgA v krvi. Njegovo povišano koncentracijo v krvi lahko poleg NET povzročijo predvsem atropični gastritis, oslABLJENA ledvična funkcija in jemanje protonskih inhibitorjev. Medtem ko lahko terapija NET zniža koncentracijo KgA. Glede na to, da je skupina NET zelo raznolika in obsega veliko različnih vrst tumorjev bi raziskavo lahko nadgradili tudi tako, da bi izračunali specifičnost in občutljivost glede na posamezno vrsto NET. Pri metastazah bi lahko upoštevali lokacijo metastaz in ugotavljali, če je koncentracija KgA povezana s tem, kje se metastaze nahajajo.

## 6 SKLEP

Namen naše raziskave je bil oceniti klinično uporabnost KgA kot tumorskega označevalca pri bolnikih NET. Prišli smo do naslednjih zaključkov:

- Koncentracija KgA je statistično značilno višja pri bolnikih z NET
- Izračunali smo 95,5 % specifičnost, kar pomeni, da koncentracija vrednost KgA nad mejno vrednostjo skoraj zagotovo pomeni prisotnost NET.
- Izračunali smo 53,5 % občutljivost, kar nam pove, da so pri nižjih koncentracijah KgA od mejnih vrednostih pomembne druge diagnostične metode, ki lahko z večjo verjetnostjo izključijo prisotnost NET.
- Koncentracija KgA je statistično značilno višja pri bolnikih z metastazami kot pri tistih brez njih.
- Izračunali smo 93 % specifičnost KgA za razlikovanje med pacienti z metastazami in tistimi brez njih. Torej lahko pri koncentracijah nad mejno vrednostjo z veliko verjetnostjo trdimo, da so pri bolniku prisotne metastaze.
- Občutljivost pri napovedovanju metastaz pa je 61,5 % kar pomeni, da pri koncentracijah pod mejno vrednostjo metastaz še ne moremo izključiti.
- Raziskavo bi bilo smiselno razširiti na večje število bolnikov, s podrobnim pregledom anamneze vseh preiskovancev za izkjučitev vseh ostalih dejavnikov, ki lahko vplivajo na koncentracijo KgA.

## 7 LITERATURA

1. Barakat MT, Meeran K, Bloom SR: *Neuroendocrine tumours*. Endocrine Related - Cancer. 2004; 11: 1-18.
2. Tischler AS: *The dispersed neuroendocrine cells: The structure, function, regulation and effects of xenobiotics on this system*. Toxicologic pathology. 1989; 17: 307-313.
3. [http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/neuroendocrine.pdf](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/neuroendocrine.pdf) (dostopano september 2011)
4. Vinik AI, O'Dorisio TM, Woltering EA, Go VLW. *Neuroendocrine tumors, A comprehensive guide to diagnosis and management*. Inter science institute. 2006
5. <http://www.aboutcancer.com/carcinoid.htm> (dostopano september 2011)
6. <http://endo.wustl.edu/conferences/PDFs/Thur-noon-conf/GEPNET.pdf> (dostopano september 2011)
7. Kiran K, Taruga MD, Kvols LK. *Recent progress in the understanding, diagnosis, and treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors*. A cancer journal for clinicians. 2011, 61-2; 113-132.
8. Vargas Martinez CC, Castano Liano R. *Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETS)*. Rev Col Gastroenterol. 2010, 25-2; 165-176.
9. Schott M, Klöppel G, Raffael A, Saleh A, Knoefel WT, Scherbaum WA, *Neuroendocrine neoplasms of the gastrointestinal tract*. Dtsch Arztebl Int. 2011, 108(18); 305-312.
10. Klimstra DS, Modlin IR, Cappola D, Lloyd RV, Suster S: *The pathological classification of neuroendocrine tumors*. Pancreas. 2010; 39: 707-712.
11. Rindi G, Bordi C: *Highlights of the biology of endocrine tumours of the gut and pancreas*. Endocrine-Related cancer. 2003; 10: 427-436.



12. [http://www.rhoen-klinikum-ag.com/rka/cms/zbb\\_2/deu/download/Neuroendocrine\\_Tumors\\_Pathology.pdf](http://www.rhoen-klinikum-ag.com/rka/cms/zbb_2/deu/download/Neuroendocrine_Tumors_Pathology.pdf)  
(dostopano september 2011)
13. Tan EH, Tan CH. Imaging of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *World journal of clinical oncology*. 2011, 2(1); 28-43.
14. Taal BG, Visser O: *Epidemiology of neuroendocrine tumours*. *Neuroendocrinology*. 2004; 80: 3-7.
15. Mougley AM, Adler DG: *Neuroendocrine tumours: Review and clinical update*. *Hospital Physician*. 2007; 51: 12-20.
16. Luke C, Price T, Townsend A, Karapetis C, Kotasek D, Singhal N, Tracey E, Roder D: *Epidemiology of neuroendocrine cancers in an Australian population*. *Cancer Causes Control*. 2010; 21: 931-938.
17. Duerr EM, Chung DC: *Molecular genetics of neuroendocrine tumors*. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007; 21: 1–14.
18. Kovačič- Palli: *Karcinoidni sindrom*. XIV. strokovni sestanek Sekcije za hipertenzijo, Zbornik. 2005: 65-69.
19. Rott T, Vodovnik A, Hvala A: *Pomen imunohistoogije in elektronske mikroskopije za sodobno razvrstitev neuroendokrinih tumorjev*. Difuzni neuroendokrini sistem, Inštitut za patologijo medicinske fakultete Ljubljana. 1995: 11-17.
20. Ghevariya V, Malieckal A, Ghevariya N, Mazumder M, Anand S: *Carcinoid tumors of gastrointestinal tract*. *Southern Medical Journal*. 2009; 102: 1031-1040.
21. Van der Lely AJ, de Harder WW: *Carcinoid syndrome: Diagnosis and medical management*. *Arch Bras Endocrinol Metab*. 2005; 49:850-860.
22. Öberg K : *Management of neuroendocrine tumours*. *Annals of oncology* 15. 2004; 4: 293-298.
23. Metz DC, Jensen RT: *Gastrointestinal neuroendocrine tumors: Pancreatic endocrine tumors*. *Gastroenterology*. 2008; 135(5): 1469-1492.

24. Vinik AI, Silva MP, Woltering G, Go VLW, Warner R, Caplin M. *Biochemical testing for neuroendocrine tumors*. *Pancreas*. 2009, 38-9; 876-889.
25. Žagar I.: *Nuklearnomedicinska diagnostika navroendokrinih tumorjev*,. *Onkologija / pregledi*. 2004; 4-10.
26. Novaković S, Bračko M, Osredkar J, Skitek M, Podkrajšek M, Žagar I, Rener M, Kocijančič I, Salapura V, Jereb S: *Diagnostika raka*. *Onkologija, raziskovanje, diagnostika in zdravljenje raka*. Mladinska knjiga Založba, d. d, Ljubljana, 2009: 84-115.
27. Paisley AN, Trainer PJ: *Medical treatment in acromegaly*. *Current opinion in Pharmacology*. 2003; 3-6: 672-677.
28. Novaković S: *Tumorski označevalci v klinični onkologiji*. *Onkologija/ pregledi*. 2000; 8-14.
29. Taupenot L, Harper KL; O'Connor DT: *The chromogranin-secretogranin family*. *The New England Journal of Medicine*. 2003; 348: 1134-49.
30. Pavlin R, *Kromogranin A in njegova klinična uporabnost*. *Zdravstveni vestnik*. 2003; 72: 507-513.
31. Montero-Hadjadje M, Vaingankar S, Elias S, Tostivint H, Mahata SK, Anouar Y: *Chromogranin A and B and secretogranin II: evolutionary and functional aspects*. *Acta Physiologica*. 2008, 192: 309-324.
32. Koshimizu H, Taeyoon K, Cawley NX, Loh YP: *Chromogranin A: A New proposal for trafficking, processing and induction of granule biogenesis*. *Regulatory peptides*. 2010, 160; 153-159.
33. Kim T, Gondre-Lewis MC, Arnaoutova I, Peng Loh Y: *Dense-Core Granule Biogenesis*. *Physiology*. 2006, 21; 124-133.
34. Hendy GN, Li T, Girard M, Feldstein RC, Mulay S, Desjardins R, Day R, Karaplis AC, Tremblay ML, Canaff L. *Targeted Ablation of the Chromogranin A (Chga) Gene:*

- Normal Neuroendocrine Dense-Core Secretory Granules and Increased Expression of Other Granins*. *Molecular Endocrinology*. 2006, 20; 1935-1947.
35. Borges R, Diaz-Vera J, Dominguez N, Arnau MR, Machado JD. *Chromogranins as regulates of exocytosis*. *Journal of Neurochemistry*. 2010, 114; 335-343.
36. Montesinos MS, Machado JD, Cmacho M, Diaz J, Morales YG, Alvarez de la Rosa D, Carmona E, Castaneyra A, Viveros OH, O'Connor DT, Mahata SK, Borges R. *The crucial role of chromogranins in storage and exocytosis revealed using chromaffin cells from chromogranin A null mouse*. *The Journal of Neuroscience*. 2008, 28(13);3350-3358.
37. Zhao E, Zhang D, Basak A, Trudeau VL: *New insights into granin- derivated peptides: evolution and endocrine roles*. *General and Comparative Endocrinology*. 2009, 164; 161-174.
38. O'Connor DT, Cadman PE, Smiley C, Salem RM, Rao F, Smith J, Funk SD, Mahata SK, Mahata M, Wen G, Taupenot L, Gonzalez-Yanes C, Harper KL, Henry RR, Sanchez-Margalet V: *Pancreastatin: Multiple Actions on Human Intermediary Metabolism in Vivo, Variation in Disease, and Naturally Occurring Functional Genetic Polymorphism*. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005, 90(9); 5414-5425.
39. Mahapatra NR: *Catestatin is a novel endogenous peptide that regulates cardiac function and blood pressure*. *Cardiovascular Research*. 2008, 80; 330–338.
40. Glinicki P, Jeske W. *Chromogranin A(CgA)-the influence of various factors in vivo and in vitro, end existing disorders on it's concentration in blood*. *Polish journal of endocrinology*. 2010, 61; 384-387.