



ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ И ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ МАРКЕРЫ ИНСУЛИНОМЫ

© М.Ю. Юкина*, Л.С. Селиванова, Н.Ф. Нуралиева, Е.А. Трошина, Н.С. Измайлова, А.Ю. Абросимов

Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии, Москва, Россия

Инсулинома — это наиболее часто встречающаяся функционирующая панкреатическая нейроэндокринная опухоль. В обзоре рассматриваются применяемые в настоящее время иммуногистохимические и циркулирующие маркеры для ее диагностики, обсуждаются чувствительность и специфичность данных параметров. Вместе с тем подчеркивается актуальность поиска новых биохимических показателей наличия инсулиномы и ее характеристик, а также изучения механизмов опухолевого роста и гормональной гиперсекреции. Одним из первостепенных методов решения данных задач является иммуногистохимическое тестирование с определением циркулирующих маркеров. Приводятся результаты последних исследований альтернативных секреторных продуктов, в частности, кокаин- и амфетамин-регулируемого транскрипта (CART), хромогранина В, нейроэндокринного секреторного протеина 55 (NESP55). Кроме того, рассматривается вопрос экспрессии различных рецепторов в ткани инсулиномы, в том числе в контексте определения молекулярных мишеней для ее визуализации или радиотерапии. В частности, охарактеризована экспрессия рецепторов к глюкагоноподобному пептиду 1 в ткани опухоли. Уточняется возможная роль рецепторов к мелатонину MT1 (MTNR1a) и MT2 (MTNR1b) в патогенезе инсулиномы. Также в статье обсуждается возможное применение опухолевого протеина D52 (TPD52) в качестве нового прогностического биомаркера для дифференциальной диагностики доброкачественной и злокачественной инсулиномы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: инсулинома; нейроэндокринная опухоль; иммуногистохимия; биомаркеры.

PROMISING IMMUNOHISTOCHEMICAL AND CIRCULATING MARKERS OF INSULINOMA

© Marina Yu. Yukina*, Liliya S. Selivanova, Nurana F. Nuralieva, Ekaterina A. Troshina, Natalya S. Izmailova, Aleksandr Yu. Abrosimov

Endocrinology Research Centre, Moscow, Russian Federation

Insulinoma is the most common functioning pancreatic neuroendocrine tumor. The review examines the currently used immunohistochemical and circulating markers for its diagnosis, and discusses the sensitivity and specificity of these parameters. At the same time, the relevance of searching for new biochemical indicators of the presence of insulinoma and its characteristics, as well as studying the mechanisms of tumor growth and hormonal hypersecretion is emphasized. One of the primary methods for solving these problems is immunohistochemical testing with the determination of circulating markers. The results of recent studies of alternative secretory products, in particular, cocaine - and amphetamine - regulated transcript (CART), chromogranin B, and neuroendocrine secretory protein 55 (NESP55) are presented. In addition, the question of expression of various receptors in the insulinoma tissue is considered, including in the context of determining molecular targets for its visualization or radiotherapy. In particular, the expression of receptors for glucagon-like peptide 1 in the tumor tissue is characterized. The possible role of melatonin receptors MT1 (MTNR1a) and MT2 (MTNR1b) in the pathogenesis of insulinoma is clarified. The article also discusses the possible use of tumor protein D52 (TPD52) as a new predictive biomarker for the differential diagnosis of benign and malignant insulinoma.

KEYWORDS: Insulinoma; neuroendocrine tumor; immunohistochemistry; biomarkers.

ВВЕДЕНИЕ

Нейроэндокринные опухоли (НЭО) — это новообразования, происходящие из плюрипотентной стволовой клетки или дифференцированных нейроэндокринных клеток и характеризующиеся морфологическими особенностями и экспрессией пептидов и секреторных продуктов [1]. Заболеваемость НЭО составляет 6,98 на 100 000 населения [2]. В настоящее время отмечается значительное увеличение заболеваемости НЭО и низкий уровень 5-летней выживаемости. Средний

период между манифестацией симптомов и установлением диагноза составляет 5–7 лет, в связи с чем почти у половины больных определяются отдаленные метастазы. Отчасти поздняя диагностика объясняется неспецифичной клинической картиной, но также и отсутствием ранних диагностических маркеров [3].

Панкреатические НЭО (П-НЭО) составляют 6% всех НЭО [4] (заболеваемость — 0,43 случая на 100 000 населения [5]). Большинство П-НЭО — гормонально-неактивные; наиболее частой (таблица) функционирующей опухолью является инсулинома (примерно 17% случаев) [4].

Таблица. Функционирующие панкреатические нейроэндокринные опухоли [6]

Название синдрома, ассоциированного с П-НЭО	Секретируемый биологически активный пептид(ы)	Заболеваемость (число новых случаев/10 ⁶ населения/год)	Локализация опухоли	Частота злокачественной опухоли, %	Ассоциация с синдромом МЭН1, %	Основные признаки/симптомы
Наиболее частые синдромы, ассоциированные с функционирующими П-НЭО						
Инсулинома	Инсулин	1–32	Поджелудочная железа (>99%)	<10	4–5	Симптомы гипогликемии (100%)
Синдром Золлингера–Эллисона	Гастрин	0,5–21,5	Двенадцатиперстная кишка (70%) Поджелудочная железа (25%) Другие (5%)	60–90	20–25	Боль (79–100%) Диарея (30–75%) Пищеводные симптомы (31–56%)
Редкие синдромы, ассоциированные с функционирующими П-НЭО (>100 случаев)						
ВИПома (синдром Verner–Morrison, панкреатическая холера, WDHA-синдром)	Вазоактивный интестинальный пептид	0,05–0,2	Поджелудочная железа (90%, взрослые) Другие (10%, нервная система, надпочечники, периганглионарно)	40–70	6	Диарея (90–100%) Гипокалиемия (80–100%) Дегидратация (83%)
Глюкагонома	Глюкагон	0,01–0,1	Поджелудочная железа (100%)	50–80	1–20	Сыпь (67–90%) Нарушение толерантности к глюкозе (38–87%) Потеря веса (66–96%)
Соматостатинома	Соматостатин	Редко	Поджелудочная железа (55%) Двенадцатиперстная/тощая кишка (44%)	>70	45	Сахарный диабет (63–90%) Холелитиаз (65–90%) Диарея (35–90%)
Соматолиберин-продуцирующая опухоль	Соматолиберин	Неизвестно	Поджелудочная железа (30%) Легкие (54%) Тощая кишка (7%) Другие (13%)	>60	16	Акромегалия (100%)
АКТГ-продуцирующая опухоль	АКТГ	Редко	Поджелудочная железа (4–16% всех случаев эктопического синдрома Кушинга)	>95	Редко	Синдром Кушинга (100%)
П-НЭО, вызывающие карциноидный синдром	Серотонин? Тахикинин	Редко (43 случая)	Поджелудочная железа (<1% всех карциноидов)	60–88	Редко	Карциноидный синдром
П-НЭО, вызывающие гиперкальциемию	Пептид, родственный паратиреоидному гормону	Редко	Поджелудочная железа (редкая причина гиперкальциемии)	84	Редко	Абдоминальная боль вследствие метастазов в печень
Очень редкие синдромы, ассоциированные с функционирующими П-НЭО (1–5 случаев)						
П-НЭО, секретирующие ренин	Ренин	Редко	Поджелудочная железа	Неизвестно	Нет	Гипертензия
П-НЭО, секретирующие лютеинизирующий гормон	Лютеинизирующий гормон	Редко	Поджелудочная железа	Неизвестно	Нет	Ановуляция Вирилизация (женщины)/ снижение либидо (мужчины)
П-НЭО, секретирующие эритропоэтин	Эритропоэтин	Редко	Поджелудочная железа	100	Нет	Полицитемия
П-НЭО, секретирующие инсулиноподобный фактор роста II	Инсулиноподобный фактор роста II	Редко	Поджелудочная железа	Неизвестно	Нет	Гипогликемия
П-НЭО, секретирующие холецистокинин	Холецистокинин	Редко	Поджелудочная железа	Неизвестно	Нет	Диарея Язвенная болезнь Потеря веса Холелитиаз
П-НЭО, секретирующие глюкагоноподобный пептид 1 (ГПП1)	ГПП1	Редко	Поджелудочная железа	Неизвестно	Нет	Гипогликемия

Примечание: МЭН-1 — синдром множественных эндокринных неоплазий 1 типа.

ПОИСК НОВЫХ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ И ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МАРКЕРОВ ИНСУЛИНОМЫ

В настоящее время наиболее важным методом в изучении НЭО является иммуногистохимическое (ИГХ) исследование. Для диагностики данных новообразований применяются различные поли- и моноклональные антитела к неспецифическим (общим) или специфическим маркерам [1]. Некоторые из них, например нейронспецифическая енолаза (neuron specific enolase; NSE) и хромогранин А, могут быть исследованы и в сыворотке крови пациентов с целью ранней диагностики НЭО и своевременного выявления рецидива после оперативного лечения. В опухолевой ткани нейроэндокринные маркеры обычно локализуются в цитоплазме в гранулах либо диффундируют в межклеточном пространстве в секреторных везикулах. Цитоплазматические нейроэндокринные маркеры, которые наиболее часто применяются для диагностики НЭО, включают NSE, синаптофизин, белковый продукт гена 9.5 (PGP 9.5) и протеин 7B2.

NSE. Так как данный маркер нейроэндокринной дифференцировки является цитозольным протеином, его исследование имеет большое значение в диагностике опухолей с низким содержанием гранул, то есть низкодифференцированных нейроэндокринных карцином. Однако экспрессия NSE не ограничена исключительно нейроэндокринной тканью и может быть обнаружена также в новообразованиях неэндокринной природы, включая солидные и кистозные опухоли поджелудочной железы, карциномы почек и злокачественные лимфомы [1]. Исследование NSE сыворотки при НЭО обладает недостаточной чувствительностью (36%), несмотря на высокую специфичность (86%) [7].

Синаптофизин (или протеин P38) — это гликопротеин, впервые выделенный из пресинаптических везикул нейронов коров. Позже он был обнаружен в клетках диффузной нейроэндокринной системы, в том числе панкреатических островков и мозгового вещества надпочечников. Синаптофизин также экспрессируется в НЭО с низким содержанием секреторных гранул, что имеет большое значение в диагностике низкодифференцированных опухолей (совместно с экспрессией NSE и PGP 9.5) [1]. В настоящее время синаптофизин и хромогранин А (см. ниже) считаются наиболее специфичными ИГХ-маркерами НЭО [8].

PGP 9.5 выделен из ткани головного мозга и применяется в диагностике низкодифференцированных НЭО, в частности мелкоклеточной недифференцированной карциномы.

Маркеры, ассоциированные с секреторными гранулами, включают семейство гранинов [1] (хромогранин/секретогранин). Данное семейство состоит из нескольких гликопротеинов, которые кодируются разными (но гомологичными) генами, накапливаются в секреторных гранулах с плотным ядром специализированных клеток (нейронов, эндокриноцитов, нейроэндокринных клеток, полиморфноядерных нейтрофилов) и секретируются совместно в процессе экзоцитоза. При этом секреция происходит только в ответ на определенные стимулы, специфичные для каждого типа клеток.

Первый представитель данного семейства — **хромогранин А** (ХрА) — выделен в 1965 г. из хромоаффинных

клеток мозгового вещества надпочечников коров. Далее описаны хромогранин В в феохромоцитоме крыс, секретогранин II в аденогипофизе коров и другие члены семейства: секретогранин III (1B1075), IV (HISL-19), V (нейроэндокринный протеин 7B2), VI (NESP55) и VII (VGF). Наибольшая продукция ХрА отмечается в симпатoadреналовых хромоаффинных клетках, далее в аденогипофизе, поджелудочной железе, желудке, тонком кишечнике, в коре лобной доли головного мозга, околощитовидных железах и щитовидной железе [9]. Согласно результатам многочисленных исследований, ХрА является надежным диагностическим маркером НЭО и может также применяться для определения прогноза НЭО [10]. Так, повышение ХрА имеет место при множестве НЭО, включая феохромоцитому, параганглиому, нейробластому, карциному Меркеля, гастроинтестинальные НЭО, опухоли панкреатических островков и другие. При этом уровень ХрА выше у пациентов с метастазами НЭО (в особенности с отдаленными, по сравнению с региональными). При карциноидных опухолях тонкой кишки и эндокринных новообразованиях поджелудочной железы обнаружена положительная корреляция уровня ХрА с размером и распространенностью опухоли [9]. Исследование ХрА (как циркулирующего биомаркера) широко применяется у пациентов с НЭО [3]. По сравнению с другими неспецифичными онкомаркерами (NSE, раковый эмбриональный антиген (РЭА) или хорионический гонадотропин человека (ХГЧ)) ХрА характеризуется наибольшей чувствительностью и специфичностью в отношении НЭО [9]. Однако определение ХрА характеризуется значительной вариабельностью чувствительности (от 67% до 93%), которая зависит от типа антител и метода анализа [11]. Кроме того, ХрА характеризуется относительно низкой чувствительностью на ранних стадиях заболевания [3]. Нередко при исследовании ХрА могут быть получены ложноположительные результаты. Наиболее частая причина ложноположительных результатов — прием блокаторов протонной помпы, которые вызывают гипергастринемию вследствие ингибирования секреции соляной кислоты. Данный эффект более выражен при длительном приеме препаратов. Некоторые авторы рекомендуют прекратить прием данных медикаментов за 10–14 дней до исследования (они могут быть заменены на антациды из другой группы, которые следует отменить за 3 дня до анализа). Ложноположительные результаты могут быть получены при почечной недостаточности, артериальной гипертензии, сердечной недостаточности, остром коронарном синдроме, хроническом атрофическом гастрите и других заболеваниях [9]. В частности, зафиксировано повышение ХрА при раке предстательной железы (который не является НЭО) [12]. Кроме того, незначительное повышение ХрА (как правило, не более чем в 2 раза выше верхней границы нормы) имеет место у 30% пациентов, получающих лечение кортикостероидами. Возможно, это обусловлено кортикостероидзависимой активацией промотора гена ХрА в надпочечниках и гипофизе [1]. Снижение ХрА может отмечаться у пациентов, получающих терапию аналогами соматостатина, которые обладают антисекреторным эффектом [9].

В отношении инсулиномы определение ХрА обладает недостаточной чувствительностью. Так, при обследовании 211 пациентов с НЭО (верхняя граница нормы для ХрА

принималась как 175 мкг/л для мужчин и женщин в пременопаузе и 220 мкг/л для женщин в постменопаузе) повышение ХрА имело место при гастриноме в 100% случаев ($n=9$), при феохромоцитоме — в 89% ($n=9$), при карциноидных опухолях — в 80% ($n=62$), при нефункционирующих эндокринных опухолях поджелудочной железы — в 69% ($n=13$), а при инсулиноме — только в 10% ($n=21$). При этом Ме (min-max) ХрА составляли: 688 (33–52 340) мкг/л — при карциноидных опухолях, 772 (289–1933) мкг/л — при гастриноме, 306 (85–14 750) мкг/л — при нефункционирующих эндокринных опухолях поджелудочной железы, 275 (110–4674) мкг/л — при феохромоцитоме и только 105 (63–236) мкг/л — при инсулиноме [9].

В исследовании Xin-Wei Qiao и соавт. [10] также выявлено незначительное повышение ХрА при инсулиноме. Исследователи оценили уровень ХрА сыворотки у 57 пациентов с инсулиномой перед оперативным вмешательством (и из них у 17 — также на 3–7-й дни после хирургического лечения), 32 пациентов с другими П-НЭО и 86 здоровых участников. Кроме того, проведено ИГХ-исследование 14 образцов ткани инсулиномой и 12 образцов ткани других П-НЭО. Согласно полученным результатам, серологические уровни ХрА у всех (89) пациентов с П-НЭО были статистически значимо выше, чем в группе контроля. При этом серологические уровни ХрА у 57 пациентов с инсулиномой (медиана 64,8 нг/мл) ненамного превышали уровни в группе здоровых лиц (медиана 53,4 нг/мл), но были значительно ниже, чем у 32 пациентов с другими П-НЭО (медиана 193 нг/мл), $P=0,001$. После оперативного лечения уровень ХрА снизился у 16 из 17 пациентов с инсулиномой. Согласно данным ROC-анализа, определение ХрА при пороговом значении 60 нг/мл позволяет отличить пациентов с инсулиномой от здоровых лиц с чувствительностью 66,7% и специфичностью 73,3%. Важно отметить, что при ИГХ-исследовании значительное или умеренное положительное окрашивание на ХрА выявлено у 12 из 14 пациентов с инсулиномой и слабое окрашивание обнаружено у 2 пациентов.

Предполагается, что незначительное повышение ХрА при инсулиноме обусловлено малыми размерами опухоли и ее выявлением на ранней стадии в большинстве случаев [9]. Однако Xin-Wei Qiao и соавт. [10] не обнаружили корреляции между уровнем сывороточного ХрА и размером инсулиномы, а также градацией и стадией.

Таким образом, в настоящее время актуален поиск дополнительных циркулирующих биохимических маркеров НЭО [13, 14] (особенно в свете выявления новых клеточных сигнальных путей [13]), в частности инсулиномы.

Ряд исследователей предлагают применять в качестве неспецифического опухолевого маркера **кокаин-и амфетаминрегулируемый транскрипт (CART)** [14]. CART впервые определен в головном мозге крыс как мРНК-транскрипт, который регулируется кокаином и амфетамином. Далее показано, что пептид CART экспрессируется в нейронах и нейроэндокринных клетках, включая гипоталамус, мозговое вещество надпочечников, кишечник и поджелудочную железу [3]. По данным ИГХ, CART экспрессируется в соматостатинпродуцирующих D-клетках островков Лангерганса крыс [15]. Предполагаются наличие аноректического эффекта CART (вторичный по отношению к его влиянию на поведение и моторную функцию) [12], а также его протективная роль в отношении β -клеток [16].

Экспрессия CART обнаружена при феохромоцитоме, глюкагономе и инсулиноме [3]. Согласно результатам, полученным Jensen P.B. и соавт., у крыс с инсулиномой уровень экспрессии мРНК CART в ткани низкий, а циркулирующий уровень сопоставим с группой контроля [15]. В ткани инсулиномы человека при иммуноокрашивании CART ко-локализован с инсулином. При этом предполагается, что экспрессия CART определяется степенью дифференцировки опухоли. Так, высокодифференцированные инсулиномы характеризуются высоким уровнем иммунореактивности (ИР) к CART наравне с инсулином. В то же время менее дифференцированные опухоли характеризовались слабой ИР к инсулину и отсутствием ИР к CART [17]. Предполагается, что повышение уровня циркулирующего CART может быть диагностическим в отношении НЭО. В частности, авторы выявили повышение данного маркера при глюкагономе [15].

При обследовании 131 пациента с НЭО повышение CART (за верхнюю границу референсного диапазона принимался уровень 150 пмоль/л) зафиксировано в 56% случаев; средний уровень составил 440 пмоль/л. При этом при опухолях тонкой кишки CART был повышен в 45% случаев, при неизвестной первичной локализации опухоли — в 63% случаев, тогда как при П-НЭО — в 71% случаев. Подчеркивается, что П-НЭО имели достоверно ($P=0,0402$) более высокие средние уровни CART (540 ± 66 пмоль/л) по сравнению с гастроинтестинальными НЭО (337 ± 51 пмоль/л). Кроме того, важно отметить, что средний уровень CART во всей выборке был достоверно выше у пациентов с прогрессирующим заболеванием по сравнению с пациентами со стабильным течением ($P=0,035$). В группе пациентов с прогрессирующими П-НЭО повышение CART выявлено в 95% случаев (средний уровень 625 пмоль/л), тогда как повышение ХрА — только в 80% случаев. При этом из 192 участников группы контроля без диагностированных или подозреваемых опухолей и нарушения функции почек средний уровень CART составил 76 пмоль/л; повышение данного показателя было выявлено только в одном случае. Подчеркивается, что у здоровых участников исследования значение CART статистически значимо не отличалось в течение дня, более того, не обнаружено влияния приема пищи на уровень маркера. Однако необходимо учитывать, что повышение CART может отмечаться при нарушении функции почек [13], а также при раке кишечника, поджелудочной и предстательной желез [12].

В качестве альтернативного онкомаркера при НЭО и инсулиноме в частности может рассматриваться **и хромогранин В (ХрВ)**. Так, при ИГХ-исследовании позитивное окрашивание на ХрВ обнаружено в большинстве клеток инсулиномы крыс (в то время как позитивное окрашивание на ХрА выявлялось реже). Наиболее часто ХрВ расположен интрагранулярно и ко-локализован с инсулином. Таким образом, ХрВ может быть предложен в качестве маркера инсулиномы [18]. Преимуществом ХрВ по сравнению с ХрА является отсутствие влияния на его уровень нарушения функции почек и приема ингибиторов протонной помпы [9]. Однако ложноположительные результаты могут быть получены при сердечной недостаточности и артериальной гипертензии [3]. Также повышение ХрВ обнаружено и у пациентов

с новообразованиями, не относящимися к группе НЭО: гепатомой, панкреатической аденокарциномой и раком предстательной железы [12].

В большинстве исследований, оценивающих возможность применения новых диагностических маркеров НЭО, проводится сравнение их чувствительности с ХрА. Так, в работе Stridsberg M. и соавт. [19] (обследовано 44 пациента с карциноидными опухолями, 17 больных – со спорадическими П-НЭО и 11 — с П-НЭО в рамках синдрома множественных эндокринных неоплазий 1 типа) чувствительность ХрВ составила 88%, тогда как ХрА — 99%. Другие авторы [14] приводят данные по сравнительной оценке чувствительности ХрА (85%) при исследовании изолированно и в комбинации с CART (91%) или ХрВ (89%).

R. Ramachandran и соавт. [3] оценивали плазменную концентрацию CART, ХрА и ХрВ у 353 пациентов с НЭО (в т. ч. 117 — с П-НЭО) и 40 здоровых лиц (у всех участников исключены нарушения функции почек). Исследователи выявили статистически значимое ($P < 0,0001$) повышение всех трех маркеров у пациентов с НЭО и П-НЭО в частности. При этом наилучшим диагностическим маркером в отношении П-НЭО являлся ХрВ (отношение шансов 2,47 [1,28; 4,75]), тогда как дополнительное исследование ХрА и CART не имело диагностических преимуществ. При регрессионном анализе, проведенном с целью определения возможности применения CART, ХрА и ХрВ как маркеров прогрессии П-НЭО, наибольшее значение AUC получено при применении комбинации всех 3 показателей. Важно отметить, что, в отличие от ХрА, уровни как CART, так и ХрВ статистически значимо ($P < 0,05$) коррелировали с индексом Ki67 (общепризнанный маркер при стадировании НЭО, а также пролиферативной активности опухолей, который используется для оценки злокачественности и определяется как процент опухолевых клеток, иммунопозитивных к маркеру пролиферации Ki67) у 162 пациентов с НЭО, у которых данный показатель был известен.

Еще одним возможным биомаркером инсулиномы и других НЭО может быть **NESP55** (нейроэндокринный секреторный протеин 55). Для NESP55 характерен геномный импринтинг: транскрибируется исключительно ген, полученный от матери. Протеин обнаружен в хромоаффинных клетках коров, гипофизе крыс, панкреатических островках мышей, феохромоцитоме человека. При ИГХ-исследовании NESP55 обнаружен в островках здоровой ткани поджелудочной железы (преимущественно в цитоплазме β -клеток с накоплением в перинуклеарной области), тогда как в экзокринной части окрашивания не отмечалось. Согласно данным Jakobsen A-M. и соавт. [20], которые выполнили ИГХ-исследование 118 опухолей, экспрессия NESP55 выявлена в ткани феохромоцитомы (19 из 19 опухолей), нейробластомы (7 из 14 опухолей), П-НЭО (14 из 25 опухолей) и не обнаружена в ткани карциноидов тонкой кишки (исследовано 15 опухолей) и аденокортикальных аденом (исследовано 15 опухолей). При этом в группе доброкачественных П-НЭО интенсивное окрашивание на NESP55 выявлено в ткани 5 из 6 инсулином и 2 из 4 нефункционирующих опухолей, фокальное окрашивание — в ткани одной гастриномы (всего исследовалась 1 опухоль). В группе злокачественных П-НЭО интенсивное окрашивание на NESP55 выявлено в ткани 1 из 2 инсулином, тогда как фокальное окрашивание — в ткани 1 из 2 ин-

сулином и 4 из 9 нефункционирующих опухолей. В группе новообразований не нейроэндокринной природы окрашивание на NESP55 имело место в 1 случае при карциноме желудка (исследовано 6 опухолей) и 1 случае при карциноме поджелудочной железы (исследовано 15 опухолей) и не отмечалось при колоректальных карциномах (исследовано 9 опухолей). Таким образом, экспрессия NESP55 отражает нейроэндокринное происхождение новообразований и поэтому может быть важным маркером при их диагностике.

Необходимо отметить, что изучение при помощи ИГХ-метода экспрессии различных маркеров в ткани инсулиномы актуально и с целью выявления новых механизмов опухолевого роста и гиперсекреции инсулина. Так, предполагается, что ХрВ участвует в регуляции секреции амилина и инсулина, оказывая аутокринный ингибиторный эффект [18]. Некоторые авторы считают, что NESP55 в ткани НЭО может выполнять функцию формирования секреторных гранул, а фрагменты NESP55, которые образуются при протеолизе, оказывают влияние на рост опухолевых клеток и их секреторную активность [20].

ИДЕНТИФИКАЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ НА ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК ИНСУЛИНОМЫ

С целью уточнения механизмов канцерогенеза, а также определения молекулярных мишеней для визуализации опухоли или радиотерапии большое значение имеет изучение экспрессии различных рецепторов в ткани инсулиномы. Как известно, в настоящее время золотым стандартом выявления пептидных рецепторов *in vitro* является автордиография. В качестве альтернативного метода применяется ИГХ-метод, который обладает рядом преимуществ: широко распространена, относительно легко выполняема, осуществляется на тканях, фиксированных в формалине и залитых парафином. В связи с чем, ИГХ-исследование может осуществляться на архивном материале. Метод обладает высоким разрешением на клеточном и субклеточном уровнях [21].

В частности, ИГХ является надежным методом для выявления рецепторов к ГПП-1 (рГПП-1). Как известно, рГПП1 физиологически экспрессируются в эндокринной части поджелудочной железы [22] и опосредуют инкретиновый эффект ГПП-1: глюкозозависимый синтез и секрецию инсулина и ингибирование секреции глюкагона [21]. рГПП-1 обнаружены также в клетках инсулиномы человека [22] и крыс [21]: в исследованиях *in vitro* показано, что ГПП-1 стимулирует пролиферацию и секрецию инсулина в ткани инсулиномы [21].

По сравнению с другими пептидными рецепторами, рГПП-1 характеризуются наибольшим уровнем экспрессии в ткани инсулиномы. Связывание с данными рецепторами аналогов ГПП-1, меченных радиофармпрепаратом, стало основой для разработки высокочувствительных методов визуализации опухоли (однофотонная эмиссионная компьютерная томография, совмещенная с компьютерной томографией, или позитронно-эмиссионная томография, совмещенная с компьютерной томографией) [23]. Важно отметить, что рГПП-1 не экспрессируются другими новообразованиями поджелудочной железы: так, при ИГХ-исследовании 31 доброкачественной инсулиномы, 7 злокачественных инсулином,

88 протоковых карцином и 10 нефункционирующих П-НЭО окрашивание к рГПП-1 выявлено исключительно во всех доброкачественных и 1 злокачественной инсулинпродуцирующей опухоли [22]. Таким образом, экспрессия рГПП-1 характерна в большей степени для доброкачественных инсулином. Похожие данные получили и Wild D. и соавт., которые выявили экспрессию рецепторов к ГПП-1 у 4 из 11 пациентов со злокачественной инсулиномой [24].

Не меньший интерес представляет изучение и других рецепторов в ткани инсулиномы, которые могут играть роль в патогенезе заболевания. Так, при ИГХ-исследовании клеток инсулиномы крысы выявлены рецепторы к мелатонину MT1 (MTNR1a) и MT2 (MTNR1b). Мелатонин синтезируется пинеалоцитами шишковидной железы (у человека достигает максимального уровня в период сна и ночного голодания) и в норме регулирует циркадный ритм секреции инсулина, воздействуя на рецепторы MT1 и MT2 поджелудочной железы. При этом рецептор MT1 сопряжен как с Gi-протеином (эффект — ингибирование секреции инсулина), так и с Gq-протеином (эффект — стимуляция секреции инсулина), в то время как рецептор MT2 сопряжен только с Gi-протеином. Так как экспрессия Gi превышает таковую Gq, мелатонин в норме ингибирует секрецию инсулина. Более того, результаты ряда исследований не исключают, что инсулин ингибирует секрецию мелатонина, воздействуя на рецепторы в клетках пинеалоцитов. Таким образом, предполагается функциональный антагонизм между инсулином и мелатонином [25]. Примечательно, что на ранних стадиях сахарного диабета 2 типа, когда происходит возрастание секреции инсулина, уровень мелатонина снижается, тогда как при сахарном диабете 1 типа на фоне абсолютного дефицита инсулина уровень мелатонина значительно увеличивается [26].

Уровень мелатонина при инсулиноме не исследован. Однако на животных моделях доказано ингибирующее влияние мелатонина на (ГПП-1-стимулированную [26]) секрецию инсулина посредством воздействия на рецепторы MT1 [27], а также на транскрипцию гена инсулина посредством воздействия на рецепторы MT2 [28] ткани инсулиномы. Таким образом, не исключается, что изучение экспрессии рецепторов MT1 и MT2, а также влияния мелатонина на секрецию инсулина инсулиномой человека позволит разработать новые терапевтические мишени при данной опухоли.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ИНСУЛИНОМ

Наиболее важными факторами, определяющими прогноз П-НЭО, являются: размер опухоли, степень дифференцировки, уровень пролиферации, митотическая активность, периневральная и сосудистая инвазия, инфильтративный рост в соседние органы, метастазы. Однако прогноз в отношении ряда П-НЭО остается неясным даже после их описания по всем вышеназванным факторам. В связи с чем требуется поиск новых прогностических биомаркеров [29].

Злокачественные инсулиномы встречаются в 5–15% случаев [24], диагноз устанавливается при выявлении

экстрапанкреатического локорегионарного распространения, а также отдаленных метастазов. При этом размеры опухоли могут быть небольшими (менее 2 см в 40–80% случаев) [30]. При злокачественной инсулиноме 5-летняя выживаемость составляет 55,6%, а 10-летняя — 29% [24].

Предполагается, что в злокачественной инсулинпродуцирующей опухоли поджелудочной железы в процессе неопластической трансформации происходит потеря экспрессии опухолевого протеина D52 (TPD52), который при иммуноокрашивании обнаруживается в островках Лангерганса здоровой ткани поджелудочной железы. Согласно данным Alkatout I. и соавт., которые провели ИГХ-исследование послеоперационного материала 62 пациентов с инсулинпродуцирующими опухолями поджелудочной железы, экспрессия TPD52 в ткани доброкачественных инсулином (у 51 больного) была статистически значимо выше, чем злокачественных (у 11 больных; $P < 0,001$). При этом статистически значимой разницы между первичными очагами злокачественной инсулиномы и метастазами не выявлено. При регрессионном анализе обнаружено, что TPD52 является независимым предиктором злокачественности с отношением шансов 0,92 (низкий уровень экспрессии протеина ассоциирован со злокачественностью, уменьшением безрецидивной выживаемости и выживаемости, связанной с болезнью) [29].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на яркую клиническую картину гипогликемического синдрома, дифференциальная диагностика его причин по результатам лабораторных исследований нередко затруднительна. Кроме того, зачастую возникают сложности при поиске инсулинпродуцирующей опухоли (в связи с небольшими размерами) при помощи инструментальных методов. Таким образом, в настоящее время остаются актуальными вопросы поиска новых биохимических маркеров, прогнозирования рисков при инсулиноме и других НЭО, а также изучения механизмов опухолевого роста и гормональной гиперсекреции. По нашему мнению, одним из наиболее перспективных методов для решения данных задач является ИГХ-тестирование в сочетании с исследованием циркулирующих маркеров (в частности, CART, хромогранина B, NESP55). В контексте определения молекулярных мишеней для визуализации инсулиномы и/или терапии целесообразно изучение экспрессии различных рецепторов в ткани опухоли, в том числе к ГПП1, MT1 и MT2. С целью поиска новых прогностических биомаркеров для дифференциальной диагностики доброкачественной и злокачественной инсулиномы возможно исследование опухолевого протеина D52.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Работа проведена в рамках выполнения государственного задания «Наследственные опухолевые синдромы и множественные эндокринные неоплазии: персонализация диагностики и лечения, прогнозирование рисков, идентификация ядерных семей» на 2018–2020 гг.

Конфликт интересов. Конфликт интересов отсутствует.

Участие авторов: Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и публикацию статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

- Giovannella LC. *Chromogranin A. A circulating neuroendocrine marker biology, pathology, assay technology and clinical applications*. France: CIS bio international; 2005.
- Dasari A, Shen C, Halperin D, et al. Trends in the incidence, prevalence, and survival outcomes in patients with neuroendocrine tumors in the United States. *JAMA Oncol*. 2017;3(10):1335–1342. Doi: 10.1001/jamaoncol.2017.0589.
- Ramachandran R, Bech P, Murphy KG, et al. Comparison of the utility of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART), chromogranin A, and chromogranin B in neuroendocrine tumor diagnosis and assessment of disease progression. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;100(4):1520–1528. Doi: 10.1210/jc.2014-3640.
- Maxwell JE, Dorisio TMO, Howe JR. Biochemical diagnosis and preoperative imaging of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Surg Oncol Clin N Am*. 2016;25(1):171–194. Doi: 10.1016/j.soc.2015.08.008.
- Mckenna LR, Edil BH. Update on pancreatic neuroendocrine tumors. *Gland Surg*. 2014;3(4):258–275. Doi: 10.3978/j.issn.2227-684X.2014.06.03.
- Falconi M, Eriksson B, Kaltsas G, et al. ENETS Consensus Guidelines Update for the management of patients with functional pancreatic neuroendocrine tumors and non-functional pancreatic neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology*. 2016;103(2):153–171. Doi: 10.1159/000443171.
- Tümör N, Genel B, Bakış B, et al. An overview of neuroendocrine tumour markers. *Turkish journal of endocrinology and metabolism*. 2014;18(4):132–136. Doi: 10.4274/tjem.2422.
- Kyriakopoulos G, Mavroei V, Chatzellis E, et al. Histopathological, immunohistochemical, genetic and molecular markers of neuroendocrine neoplasms. *Ann Transl Med*. 2018;6(12):252. Doi: 10.21037/atm.2018.06.27.
- Ángel J, Pérez D, Freixes MC. Chromogranin A and neuroendocrine tumors. *Endocrinol Nutr*. 2013;60(7):386–395. Doi: 10.1016/j.endonu.2012.10.003.
- Qiao X, Qiu L, Chen Y, et al. Chromogranin A is a reliable serum diagnostic biomarker for pancreatic neuroendocrine tumors but not for insulinomas. *BMC Endocr Disord*. 2014;14:64. Doi: 10.1186/1472-6823-14-64.
- Oberg K. Circulating biomarkers in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer*. 2011;18 Suppl 1:S17–S25. Doi: 10.1530/ERC-10-0280.
- Bech PR, Martin NM, Ramachandran R, Bloom SR. The biochemical utility of chromogranin A, chromogranin B and cocaine- and amphetamine-regulated transcript for neuroendocrine neoplasia. *Ann Clin Biochem*. 2013;51(Pt 1):8–21. Doi: 10.1177/0004563213489670.
- Ardill JES, O'Dorisio TM. Circulating biomarkers in neuroendocrine tumors of the enteropancreatic tract: application to diagnosis, monitoring disease, and as prognostic indicators. *Endocrinol Metab Clin N Am*. 2010;39(4):777–790. Doi: 10.1016/j.jec.2010.09.001.
- Bech P, Winstanley V, Murphy KG, et al. Elevated cocaine- and amphetamine-regulated transcript immunoreactivity in the circulation of patients with neuroendocrine malignancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(4):1246–1253. Doi: 10.1210/jc.2007-1946.
- Jensen PB, Kristensen P, Clausen JT, et al. The hypothalamic satiety peptide CART is expressed in anorectic and non-anorectic pancreatic islet tumors and in the normal islet of Langerhans. *FEBS Lett*. 1999;447(2–3):139–143. Doi: 10.1016/S0014-5793(99)00291-4.
- Sathanoori R, Erlinge D, Wierup N. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) protects beta cells against glucotoxicity and increases cell. *J Biol Chem*. 2013;288(5):3208–3218. Doi: 10.1074/jbc.M112.437145.
- Wierup N, Sundler F. CART is a novel islet regulatory peptide. *Peptides*. 2006;27(8):2031–2036. Doi: 10.1016/j.peptides.2006.02.011.
- Bargsten G. Cytological and immunocytochemical characterization of the insulin secreting insulinoma cell line RINm5F. *Arch Histol Cytol*. 2004;67(1):79–94. Doi: 10.1679/aohc.67.79.
- Stridsberg M, Oberg K, Li Q, et al. Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours. *J Endocrinol*. 1995;144(1):49–59. Doi: 10.1677/joe.0.1440049.
- Jakobsen AM, Ahlman H, Ko L. NESP55, a novel chromogranin-like peptide, is expressed in endocrine tumours of the pancreas and adrenal medulla but not in ileal carcinoids. *Br J Cancer*. 2003;88(11):1746–1754. Doi: 10.1038/sj.bjoc.6600924.
- Korner M. Specific biology of neuroendocrine tumors: peptide receptors as molecular targets. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2016;30(1):19–31. Doi: 10.1016/j.beem.2016.01.001.
- Waser B, Blank A, Karamitopoulou E, et al. Glucagon-like-peptide-1 receptor expression in normal and diseased human thyroid and pancreas. *Mod Pathol*. 2015;28(3):391–402. Doi: 10.1038/modpathol.2014.113.
- Luo Y, Pan Q, Yao S, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor PET/CT with 68ga-nota-exendin-4 for detecting localized insulinoma: a prospective cohort study. *J Nucl Med*. 2016;57(5):715–720. Doi: 10.2967/jnumed.115.167445.
- Wild D, Christ E, Caplin ME, et al. Glucagon-like peptide-1 versus somatostatin receptor targeting reveals 2 distinct forms of malignant insulinomas. *J Nucl Med*. 2011;52(7):1073–1078. Doi: 10.2967/jnumed.110.085142.
- Peschke E, Mühlbauer E. New evidence for a role of melatonin in glucose regulation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2016;24(5):829–841. Doi: 10.1016/j.beem.2010.09.001.
- Peschke E, Bähr I, Mühlbauer E. Melatonin and pancreatic islets: interrelationships between melatonin, insulin and glucagon. *Int J Mol Sci*. 2013;14(4):6981–7015. Doi: 10.3390/ijms14046981.
- Mühlbauer E, Albrecht E, Bazwinsky-Wutschke I, Peschke E. Melatonin influences insulin secretion primarily via MT(1) receptors in rat insulinoma cells (INS-1) and mouse pancreatic islets. *J Pineal Res*. 2012;52(4):446–459. Doi: 10.1111/j.1600-079X.2012.00959.x.
- Li Y, Wu H, Liu N, et al. Melatonin exerts an inhibitory effect on insulin gene transcription via MTNR1B and the downstream Raf-1/ERK signaling pathway. *Int J Mol Med*. 2018;41(2):955–961. Doi: 10.3892/ijmm.2017.3305.
- Alkatout I, Friemel J, Sitek B, et al. Novel prognostic markers revealed by a proteomic approach separating benign from malignant insulinomas. *Mod Pathol*. 2015;28(1):69–79. Doi: 10.1038/modpathol.2014.82.
- Baudin E, Caron P, Lombard-Bohas C, et al. Malignant insulinoma: recommendations for characterisation and treatment. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2013;74(5–6):523–533. Doi: 10.1016/j.ando.2013.07.001.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ [AUTHORS INFO]

*Юкина Марина Юрьевна, к.м.н. [Marina Yu. Yukina, MD, PhD]; адрес: ул. Дмитрия Ульянова, д. 11, 117036 Москва, Россия [address: 11 Dm.Ulyanova street, 117036 Moscow, Russia]; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8771-8300>; eLibrary SPIN: 4963-8340; e-mail: kuronova@yandex.ru

Селиванова Лилия Сергеевна, к.м.н. [Liliya S. Selivanova, MD, PhD]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6891-0009>; eLibrary SPIN: 5151-3675; e-mail: liselivanova89@yandex.ru

Нуралиева Нурана Фейзуллаевна [Nurana F. Nuralieva]; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6876-3336>; eLibrary SPIN: 7373-2602; e-mail: Dr.NuralievaNF@yandex.ru

Трошина Екатерина Анатольевна, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН [Ekaterina A. Troshina, MD, PhD, Professor]; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8520-8702>; eLibrary SPIN: 8821-8990; e-mail: troshina@inbox.ru;

Измайлова Наталья Сергеевна, к.м.н. [Natalya S. Izmailova, MD, PhD]; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4713-5661>; eLibrary SPIN: 1984-1519; e-mail: nizm2013@mail.ru

Абросимов Александр Юрьевич, д.м.н. [Aleksandr Yu. Abrosimov, MD, PhD, Professor]; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8284-9996>; eLibrary SPIN: 4089-9502; e-mail: nikitarusskikh@mail.ru

ИНФОРМАЦИЯ:

Рукопись получена: 27.05.2020. Одобрена к публикации: 18.06.2020. Опубликовано online: 09.07.2020.
Received: 27.05.2020. Accepted: 18.06.2020. Published online: 09.07.2020.

ЦИТИРОВАТЬ:

Юкина М.Ю., Селиванова Л.С., Нуралиева Н.Ф., Трошина Е.А., Измайлова Н.С., Абросимов А.Ю. Перспективные иммуногистохимические и циркулирующие маркеры инсулиномы // Эндокринная хирургия — 2020. — Т. 14. — №1. — С. 14-21. doi: <https://doi.org/10.14341/serg12452>

TO CITE THIS ARTICLE:

Yukina MYu, Selivanova LS, Nuralieva NF, Troshina EA, Izmailova NS, Abrosimov AYu. Promising immunohistochemical and circulating markers of insulinoma. *Endocrine surgery*. 2020;14(1): 14-21. doi: <https://doi.org/10.14341/serg12452>