

ЕЛАБОРАТ ЗА НАУЧНОИСТРАЖУВАЧКИ ПРОЕКТ

НАСЛОВ НА ПРОЕКТОТ:

Хромогранин-А: имунохистохемиска експресија во примарни неуроендокрини тумориво корелација со, постоперативното серумско ниво кај пациенти со прогресивна болест и влијание од терапијата со октреотид.

НАУЧНА ОБЛАСТ: Медицина

ПОТЕСНО ПОДРАЧЈЕ: Патологија / Патологија на невроендокрини тумори

КАТЕДРА-НОСИТЕЛ НА ПРОЕКТОТ: Катедра за патологија, Медицински факултет, Скопје

ГЛАВЕН ИСТРАЖУВАЧ: Проф. Д-р Рубенс Јовановиќ; Проф. Д-р Славица Костадинова Куновска

ЛИЦЕ ЗА КОНТАКТ (Адреса, телефон, Email):

Проф. д-р Рубенс Јовановиќ, Институт за Патологија, Медицински факултет
50 Дивизија 66, 1000 Скопје

Тел. +389 75 452000

e-mail: rubens.jovanovic@medf.ukim.edu.mk

СОДРЖИНА НА ПРОЕКТОТ

1. Вовед	3
1.1. Хромогранин-А	3
1.2. Мотив и цели	4
2. Материјал и методи	5
2.1. Субјекти во истражувањето	5
2.2. Постапки за обработка на оперативниот материјал и архивските ткивни примероци за светлосна микроскопија, имунохистохемиски и генетски анализи	6
2.3. Имунохистохемиска анализа	6
2.4. ELISA анализа за серумски хромогранин-А.....	7
2.5. Статистичка анализа на резултатите.....	9
3. Резултати и дискусија	10
3.1. Имунохистохемиско боење со CgA и морфолошки параметри на туморските примероци	Error! Bookmark not defined.
3.2. Резултати од морфолошка анализа на имунохистохемиското боење	10
3.3. Резултати од анализа на серумски нивоа на CgA	11
Референци	12

1. Вовед

1.1. Хромогранин-А

Chromogranin A (CgA) или паратиرويدен секреторен протеин-1 претставува протеин сочинет од 439 аминокиселински резидуи и припаѓа на гранинската фамилија од неуросекреторни протеини. Локализиран е во големите секреторни гранули со густо јадро на невроните и ендокрините клетки. CgA се наоѓа во хромафините клетки во медулата на надбубрежната жлезда, параганглиите, ентерохромафините клетки во гастроинтестиналниот тракт, панкреасот, бронхиите/бронхиолите, т.е. во сите клетки кои му припаѓаат на APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation) системот. Овој протеин има важна улога како прекурсор на повеќе различни функционални пептиди, како што се вазостатин, панкреастатин, катестатин и парастатин, како и прекурсор на “можнофункционални пептиди”, како што се хромостатин, WE-14 и GE-25. (1-3)

Од патохистолошки аспект овој протеин е важен како диференцијационен маркер на повеќето невроендокрини тумори (малигни и бенигни) како и во некои карциноми со парцијална невроендокрина диференцијација. Присуството на овој протеин рутински се спроведува со имунохистохемиска техника со употреба на соодветно моноклонално антитело. (2-3)

Од клинички аспект, значењето на CgA се состои во тоа што серумското ниво му е зголемено при повеќе неопластични заболувања (бенигни и малигни невроендокрини тумори - NET), како што се карциноиди, феохромоцитомы, медуларни карциноми на тироидната жлезда, портки карциноми на простата, ситно-клеточни белодробни карциноми, некои тумори на хипофиза, како и било кој тумор кој содржи барем одредена фракција неопластични клетки со невроендокрина диференцијација.

Серумското ниво на CgA може да биде зголемено и при различни не-неопластични состојби, како што се дијабетес мелитус, употреба на инхибитори на гастрична секреција, хиперплазија на ентерохромафини клетки, кај пушачи или при тешка хронична опструктивна белодробна болест. (4-5)

Анализата на серумското ниво на СgА претставува прволиниски дијагностички тест за дијагностика на карциноиди и генерално NET, заедно со (или како алтернатива) анализата на нивото на серотонин во серум или урина и нивото на 5-HIAA (5-Hydroxy Indol Acetic Acid) во урина. (6)

1.2. Мотив и цели

Мотив за изработка на проектот е потребата да се тестира соодносот помеѓу имунохистохемиската експресија на хромогранин во примероци од примарниот тумор и постоперативното ниво на серумски хромогранин-А кај пациенти со невроендокрини тумори зависно од стадиумот на болеста, како и одредување на потенцијални дискриминаторски рангови на серумски хромогранин-А кои би биле корелирани со агресивен клинички тек и прогресивна болест или напреднат иницијален стадиум на болеста при дијагноза.

Цели на проектот:

- Да се утврди соодносот помеѓу имунохистохемиската експресија на хромогранин во примарниот тумор и постоперативниот серумски хромогранин.
- Да се идентификува (потенцијална) група на пациенти со прогресивна болест кај кои постои дискрепанца помеѓу степенот на имунохистохемиска експресија на хромогранин во примарниот тумор и постоперативното серумско ниво на хромогранин-А (метастатско потекло),
- Да се одредат критични дискриминаторски рангови на серумски хромогранин-А како потенцијални индикатори за прогресивна болест или напреднат стадиум на болеста
- Да се утврди степенот на влијание и долготрајноста на ефектот на терапијата со октеротид врз серумското ниво на хромогранин-А кај пациенти со невроендокрини тумори во напреднат стадиум.

2. Материјал и методи

2.1. Субјекти во истражувањето

Студијата беше изведена на Институтот за патологија при Медицинскиот факултет во Скопје. Истата претставува ретроспективно-проспективна студија која го опфаќа периодот од 2010 до 2020 година.

Во студијата беа вклучени вкупно 410 пациенти, кај кои беа правени серолошки анализи, а кај 72 од нив беа анализирани и хистоморфолошките и имунохистохемиските параметри на примарните тумори кои постоперативно биле доставени на Институтот за патологија вклучувајќи примероци од архивскиот материјал на Институтот за патологија, за кои се утврди дека постои соодветно следење на серумски хромогранин-А и адекватни клинички податоци.

За добивање на потребните податоци беа користени и архивските податоци на Институтот за патологија, Универзитетската клиника за онкологија и радиотерапија при Медицинскиот факултет во Скопје.

Регистрирани беа следните параметри:

- пол
- возраст при иницијалната дијагноза
- големина на туморот
- присуство/отсуство на лимфонодални метастази при иницијалната операција
- присуство/отсуство на далечни метастази при иницијалната операција
- стадиум на болеста според pTNM
- експресија на хромогранин во примарниот тумор
- постоперативни контролни вредности на серумски хромогранин-А
- изминато време по операцијата до евентуална појава на метастази или локален рецидив
- тераписки протокол со октреотид
- време на преживување

2.2. Постапки за обработка на оперативниот материјал и архивските ткивни примероци за светлосна микроскопија, имунохистохемиски и генетски анализи

Стандардната хистолошка обработка на оперативните ткивни примероци опфати фиксација во 10% неутрален формалин, во траење од 24 – 48 часа, после што ткивата беа стандардно спроведувани низ низа алкохоли (етанол) со зголемувачка концентрација и ксилол, после што беа вклопувани во парафин. Од вака добиените парафински калапи беа сечени пресеци со дебелина од 4 до 5 μm , кои потоа беа нанесувани на предметни стакла, депарафинизирани и боени рутински со hematoxylin-eosin (HeEo), хистохемиски и имунохистохемиски. Во оваа студија, од новодоставените оперативни материјали, како и од архивските ткивни примероци, на светлосна микроскопија беа анализирани/реанализирани пресеци боени со HeEo и имунохистохемиски за визуализација на експресијата на хромогранин во туморското ткиво. Од архивските случаи беа регистрирани и сите патохистолошки параметри на кои се базира стадиумот на болеста и присуството на лимфоваскуларна инвазија, од базата на податоци на Институтот за патологија.

2.3. Имунохистохемиска анализа

2.3.1. Имунохистохемиски анализи за Chromogranin-A на ткивни примероци

Беше анализирана имунохистохемиската експресија на Chromogranin, покрај останатите рутински имунохистохемиски боенња за Synaptophysin, NSE, CD56 и Ki67 во 72 оперативни материјали од пациенти дијагностицирани како NET од различни органи (гастроинтестинален, респираторен, ендометриум, дојка и надбубрежна жлезда како и метастатски случаи од непознато примарно потекло). Имунохистохемиската анализа беше изведена со моноклонално антитело anti-Chromogranin [clone DAK-A3 - Dako] со разредување 1:100, anti-Synaptophysin антитело [clone DAK-SYNAP – Dako] со разредување 1:50, anti-NSE антитело [clone BBS/NC/VI-H-14 – Dako] со разредување 1:1000, anti-CD56 антитело [clone 123C3 – Dako] со разредување 1:50 и anti-Ki67 антитело [clone MiB1 – Dako]

со разредување 1:100, кои беа визуелизирани користејќи En-Vision Flex (DAKO) систем за визуелизација.

За имунохистохемиска анализа беше користена модифицирана техника на AVIDIN-BIOTIN IMMUNOPEROXIDASE COMPLEX, опишана од Hsu и соработниците [7], што всушност е вообичаен рутински метод на Институтот за патологија (8). Оваа техника накучо опфаќа:

- апликација на примарно антитело специфично за анализираниот целен епитоп, врз претходно подготвен ткивен пресек;
- апликација на секундарно антитело обележено со биотин и
- апликација на диаминобензидин тетрахлорид (DAB) како прохромоген, и дејство на претходно формираниот и имобилизиран авидин-биотин пероксидаза комплекс врз прохромогенот со последователно развивање на обоена реакција во вид на кафеав талог.

Имунохистохемиската експресија на хромогранин беше анализирана на репрезентативни туморски примероци, а изразена како процент на позитивни туморски клетки, со истовремена семиквантитативна стратификација на сигналот според интензитетот на пребојувањето како негативно пребојување (0), слаб интензитет (1+) или со висок интензитет (2+). Евалуацијата на имунохистохемиските бојења беше независно изведена од два патолози, а за еквивокалните случаи беше консултиран и трет патолог, за консензуално класифицирање. Како негативна контрола беа користени дополнителни ткивни пресеци кои во текот на имунохистохемиското бојење наместо со примарно антитело беа инкубирани со фосфатен пуфер, а како позитивна контрола беа користени претходно анализирани позитивни ткивни примероци.

2.4. ELISA анализа за серумски хромогранин-A

За ELISA анализа на серумското ниво на CgA кај пациентите, беа анализирани 699 примероци од серум од 410 пациенти. Беа користени примероци од венска крв со волумен до 4-5 ml (доставени од други медицински установи) од кои беше издвоен

серумот за понатамошна стандардна анализа со комерцијален, рутински користен кит NEOLISA CHROMOGRANIN A; EURO DIAGNOSTICA по постапка препорачана од производителот (9). Постапката опфаќа:

Подготовка на следниве реагенси:

Се подготвуваат работни раствори од сите калибратори од cal1 до cal6.

- Кај контролите = control (L) Low-ниска

= control(H) High-висока

На сите се додава по 300µl најчиста (ultrapure) H₂O.

Откако ќе се стави по 300µl се замрзнува на -20°C (сите заедно од cal1-cal6 и контролите).

При употреба калибраторите се вадат да се одмрзнат на собна температура.

„WASH BUF” (пуфер за плакнење)

-За 1 стрип се зема: 10ml WASH BUF

+190ml д. H₂O.

„CONJ” (конјугат)

За 1 стрип се зема: 10µl од conj

+990µl BUF conj.

1) Се земаат 8 епендорфи, во првите 6 се става по 25µl од калибраторите од 1-6 (по ред cal 1, cal2, cal3 до cal6), и по 25µl од control H и 25µl од control L. На истите се додава по 100µl DIL (дилуент).

Се земаат други епендорфи (онолку колку што има серуми) и во истите се додава по 25µl од серумот. На истите серуми се додава по 100µl DIL.

2) Од епендорфите се префрла на плочка во иста позиција. Се префрла по 100µl и се инкубира 60мин.

3) Се исфрла течноста и се утапкува на лигнин.

- се испира со WASH BUF 3x300 μ l -15сек.

4) На сите се става(додава) x 100 μ l од разреден сопј.

5) Се испира со WASH BUF 3 x 300 μ l -15сек.

Во сите епендорфи се пипетира x 100 μ l TMB и се инкубира на темно 13мин.

Се додава x100 μ l STOP (H₂SO₄) - 2мин.

8) Се читана ЕЛИСА читачна 450nmбранова должина

9) Резултатите се пресметуваат со програмата за интраполација

2.5. Статистичка анализа на резултатите

Со користење на комерцијален статистички софтвер „*StatisticaforWindows*“ беше направена статистичка анализа на податоците со методи од дескриптивна и аналитичка статистика. Беа одредени фреквенции на појавите во различни групи, а за проценка на сигнификантноста на меѓугрупните разлики беа користени Chi-square, V-square и Yates corrected Chi-square. За тестирање на нултата хипотеза беа користени параметриски и непараметриски аналитички статистички тестови. Кај сериите со нумерички белези беше тестирана нормалноста на дистрибуцијата со помош на Колмогоров-Смирноф, Лилиефорс и Шапиро-Вилков тест.

Од параметриските аналитички тестови беа користени:

- Студентов т-тест за независни примероци [Independentsamplest-test]

- Еднофакторска анализа на варијанса за независни примероци (One-wayANOVA).

- Коефициент на линеарна корелација по Пирсон (Pearsoncorrelation).

Од непараметриските аналитички тестови беа користени:

- Крускал-Волисова еднофакторска анализа на варијанса на рангови (Kruskal-Wallis test).
- За меѓугрупните разлики кај Крускал-Волисовиот тест, беше користен Ман-Витниевиот U тест на инверзија (Mann-Whitney U test of inversion).
- За одредување на корелации беше користен коефициентот на корелација на рангови според Спирман (Spearman's correlation).

Кај сите аналитички тестови нивоата на веројатност за остварување на нултата хипотеза, во согласност со меѓународните стандарди за биомедицински истражувања, изнесуваат $p < 0,05$ и $p < 0,01$.

3. Резултати и дискусија

3.2. Резултати од хистоморфолошки и имунохистохемиски анализи

Биа анализирани примероци од оперативен материјал од 72 пациенти. Средната возраст на пациентите (30 мажи, 42 жени) беше 55 години (15-80). Триесет и осум (53%) од случаите беа класифицирани како бенигни, а 34 (47%) како малигни, од кои 16 беа со локализирана болест, а 18 со напредната болест (метастази во лимфни јазли и далечни метастази). Петнаесет од малигните тумори (44%) беа добро диференцирани (G1), додека останатите (N=19) беа умерено и слабо диференцирани (G2-3). Сите тумори покажаа позитивна експресија на најмалку два од анализираниите невроендокрини маркери. Пролиферативниот индекс (Ki67) покажа опсег помеѓу 1 и 90% и позитивна корелација со биолошкото однесување, градусот, стадиумот на болеста и експресијата на синаптофизин (Spearman's rho 0,52; 0,64, 0,41 и 0,29 соодветно; $p < 0,05$). Имунохистохемиската експресија на CgA е корелирана со експресијата на NSE, Synaptophysin и градусот на туморот (Spearman's rho 0,42; 0,58 и -0,41 соодветно; $p < 0,05$). Серумските нивоа на CgA беа зголемени кај 43 (60%) од пациентите и покажаа позитивна корелација со градусот и стадиумот на туморите (Spearman's rho 0,29 и 0,56 соодветно; $p < 0,05$). Анализата покажа

дека нема сигнификантна корелација на имунохистохемиската експресија на CgA во примарниот тумор со постоперативното серумско ниво на CgA ($p > 0.05$).

Регресиона анализа за за зависна варијабла: Биол.Однесување $R = ,86602540$ $R^2 = ,75000000$ Adjusted $R^2 = ,00000000$ $F(6,2) = 1,0000$ p						
	Beta	Std.Err.	B	Std.Err.	t(2)	p
Intercept			-2,36111	11,83930	-0,19943	0,860363
Градус	0,428084	0,851877	0,41667	0,82916	0,50252	0,665175
CgA-IHH	0,838052	2,139189	1,77778	4,53791	0,39176	0,733037
Syn	-0,900769	0,523128	-1,44444	0,83887	-1,72189	0,227230
NSE	-0,707107	0,500000	-1,00000	0,70711	-1,41421	0,292893
CD56	0,877336	0,926574	1,86111	1,96556	0,94686	0,443653
Ki67	1,124571	1,947815	0,02778	0,04811	0,57735	0,622036

CgA-IHH – имунохистохемиска експресија на хромогранин A; Syn – имунохистохемиска експресија на синаптофизин; NSE – имунохистохемиска експресија на неврон-специфична енолаза; CD56-имунохистохемиска експресија на CD56; Ki-67 – имунохистохемиска експресија на пролиферативен маркер Ki-67.

Мултиваријантната анализа не издвои ниту еден имунохистохемиски параметар, вклучувајќи го градусот на туморот како независен предиктор за биолошкото однесување на NETs.

Заклучно, имунохистохемиската експресија на CgA во примарниот тумор не корелира со серумското ниво на CgA, доколку се разгледува независно од стадиумот и градусот на туморот (в. 3.3).

3.3. Резултати од анализа на серумски нивоа на CgA пред и во тек или после применет хируршки и/или онколошки третман

Во прилог објавен труд под наслов „*SERUM CHROMOGRANIN-A LEVELS IN NEUROENDOCRINE NEOPLASMS AS PROGNOSTIC MARKER IN CORRELATION WITH THE CLINICAL COURSE OF THE DISEASE AND THE INFLUENCE OF OCTREOTID THERAPY*“

4. Заклучоци

1. Нема сигнификантна корелација помеѓу имунохистохемиската експресија на CgA во примарниот тумор со постоперативното серумско ниво на CgA ($p > 0.05$), и со оглед на тоа овој параметар не може да се смета за потенцијален прогностички маркер.

2. Имунохистохемиската експресија на CgA во примарниот тумор не е корелирана со биолошкото однесување на испитуваните невроендокрини тумори.
3. Анализата на серумското ниво на CgA е корисна во дијагностиката на невроендокрините тумори, како и во тек на следењето на болеста, за детекција на рецидив или прогресија на болеста, како и за евалуација на одговорот кон онколошката терапија.
4. Флукуациите на серумското ниво на CgA мора да се интерпретираат особено внимателно и во контекст на болеста. Посебно внимание треба да се обрне на исклучување на причини за лажно позитивни резултати (пр. Употреба на инхибитори на протонска пумпа). Варијации на серумскиот CgA за повеќе од 40-50% при две консекутивни мерења, како и помали но конзистентни промени во ист правец (зголемување, односно намалување), треба да се сметаат за клинички сигнификантни.
5. Редукцијата на серумскиот CgA за најмалку 49.5% во тек на првите 12 месеци после хируршкиот третман, отпочнувањето на специфичен онколошки третман или двете, во однос на иницијалното ниво на серумски CgA, е корелирано со стабилен тек на болеста, Спротивно на тоа, зголемување на нивото или намалување за помалку од 34% во тек на првите 12 месеци по отпочнување на терапијата, е корелирано со неповолен клинички тек на болеста и прогресија на болеста.
6. Потребни се редовни контроли на серумскиот CgA на годишно ниво. Оптимално 1-3 контроли на 12 месеци, зависно од дијагностичката група на пациентот (т.е. дали се работи само за клиничко соменвање за карциноиден синдром, бенигна невроендокрина неоплазма или пак локализиран невроендокрин карцином или напреднат невроендокрин карцином).

Референци

1. Cotesta D, Caliumi C, Alò P, Petramala L, Reale MG, Masciangelo R, Signore A, Cianci R, D'Erasmo E, Letizia C (2005). "High plasma levels of human chromogranin A and

adrenomedullin in patients with pheochromocytoma". *Tumori*. **91** (1): 53–8.
PMID 15850005

2. Rindi G, Arnold R, Bosman FT, et al. Nomenclature and classification of neuroendocrine neoplasms of the digestive system. In: WHO Classification of Tumours of the Digestive System, 4th ed, Bosman TF, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND (Eds), International Agency for Research on cancer (IARC), Lyon 2010. p.13.
3. Travis WD. The concept of pulmonary neuroendocrine tumours. In: Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart, Travis WD, et al (Eds), IARC Press, Lyon, France 2004. p.19.
4. Syversen U, Ramstad H, Gamme K, Qvigstad G, Falkmer S, Waldum HL. Clinical significance of elevated serum chromogranin A levels. *Scand J Gastroenterol*. 2004; 39(10):969-73.
5. Sørhaug S, Langhammer A, Waldum H. L, Hveem K, Steinshamn S. Increased serum levels of chromogranin A in male smokers with airway obstruction. *European Respiratory Journal* 2006 28: 542-548; DOI: 10.1183/09031936.06.00092205
6. First-line tests used in carcinoid tumor follow-up. Available at: <http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/83559>
7. Hsu S, Raine L, Fanger H. Use of avidin–biotin–peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981;29:577-580.

8. Jovanovic R, Kostadinova-Kunovska S, Bogoeva B, Spasevska L, Petrusevska G. Histological features, Ki-67 and Bcl-2 immunohistochemical expression and their correlation with the aggressiveness of pheochromocytomas. Contributions, Sec. Biol. Med. Sci. 2012; 33(2):23-40.
9. Neolisa™ Chromogranin A - Eurodiagnostica CE. Document No. E-23-0196-05, September, 2013. Available at:<http://www.eurodiagnostica.com/index.php?headId=3&pageId=3&langId=1&productId=48>
10. Oberg K, Castellano D. Current knowledge on diagnosis and staging of neuroendocrine tumors. Cancer Metastasis Rev 2011;30(Suppl. 1):3–7.
11. Schimmack S, Svejda B, Lawrence B, Kidd M, Modlin IM. The diversity and commonalities of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. Langenbecks Arch Surg 2011; 396: 273–298.
12. Kloepfel G. Neuroendocrine neoplasms: dichotomy, origin and classifications. Visc Med 2017;33:324-30.
13. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M. Nomenclature and classification of neuroendocrine neoplasms of the digestive system. 4th ed. WHO Press: IARC Lyon: WHO Classification of Tumours of the Digestive System; 2010.
14. Stridsberg M, Eriksson B, Oberg K, Janson ET. A comparison between three commercial kits for chromogranin A measurements. J Endocrinol 2003; 177(2):337- 341.
15. Gut P, Czarnywojtek A, Fischbach J, Baczyk M, Ziemnicka K, Wrotkowska E. et al. Chromogranin A –unspecific diagnostic marker. Clinical utility and potential diagnostic pitfalls. Arch Med Sci 2016; 12(1):1-9.

16. Chuang Zhang, Yue Huang, Jiang Long, Xiaochen Yao, Jun Wang, Shimin Zang, Wei Qu, Feng Wang. Serum chromogranin A for the diagnosis of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms and its association with tumor expression. *Oncology Letters* 2019; 17: 1497-1504.
17. Plapp V.F. ClinLab Navigator/ Test Interpretations/Chromogranin A. Available at: <https://www.clinlabnavigator.com/chromogranin-a.html>
18. Bauer W, Briner U, Doepfner W, Haller R, Huguenin R, Marbach P, Petcher TJ, Pless.SMS 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. *Life Sci* 1982;31:1133–1140.
19. Costa F. Gumz B. Octreotide – A review of its use in treating neuroendocrine tumors. *Eur Endocrinol* 2014; 10(1): 70–74. doi: 10.17925/EE.2014.10.01.70
20. Schneiderman M, Curran T, Lee K, Warner R, Kim M. Serum chromogranin A correlation with tumor burden in metastatic small bowel carcinoid patients. *American Journal of Gastroenterology* 2010; 105:S75.
21. Xu Han X, Chunyan Zhang, Min Tang, Xuefeng Xu, Lingxiao Liu, Yuan Ji, Baishen Pan, Wenhui Lou. The value of serum chromogranin A as a predictor of tumor burden, therapeutic response, and nomogram-based survival in well-moderate nonfunctional pancreatic neuroendocrine tumors with liver metastases. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2015; 27(5):527-535. doi: 10.1097/MEG.0000000000000332
22. Arnold R, Wilke A, Rinke A, Mayer C, Kann HP, Klose K-J, Scherag A, Hahmann H, Muller H-H, Barth P. Plasma chromogranin A as marker for survival in patients with metastatic

endocrine gastroenteropancreatic tumors. *Clinical gastroenterology and hepatology* 2008;6:820–827.

23. Bartolomucci A, Possenti R, Mahata SK, Fischer-Colbrie R, Loh YP, Salton SR. The extended granin family: Structure, function, and biomedical implications. *Endocr Rev* 2011;32:755-797.
24. Boudreaux JP, Klimstra DS, Hassan MM, Woltering EA, Jensen RT, Goldsmith SJ, et al. The NANETS Consensus Guideline for the diagnosis and management of neuroendocrine tumors-Well-differentiated neuroendocrine tumors of the jejunum, ileum, appendix, and cecum. *Pancreas* 2010;39:753-766.
25. Anthony LB, Strosberg JR, Klimstra DS, Maples WJ, O'Dorisio TM, Warner RR, et al. The NANETS Consensus Guideline for the diagnosis and management of neuroendocrine tumors - Well-differentiated NETs of the distal colon and rectum. *Pancreas* 2010;39:767-774.
26. Kulke MH, Benson AB 3rd, Bergsland E, Berlin JD, Blazzkowsky LS, Choti MA, et al. National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines): NCCN Guidelines Version 1. Neuroendocrine Tumors. 2012:1-94. Accessed March 20, 2012. Available at www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/neuroendocrine.pdf
27. Pavel M, Öberg K, Falconi M, Krenning EP, Sundin A, Perren A, Berruti A; ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org. Gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2020;31(7):844-860. doi: 10.1016/j.annonc.2020.03.304. Epub 2020 Apr 6. PMID: 32272208.

28. Cancer Research UK, <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/neuro-endocrine-tumours-nets/stomach-nets>, Accessed November, 2020.
29. Welin S, Stridsberg M, Cunningham J, Granberg D, Skogseid B, Oberg K, Eriksson B, Janson TE. Elevated plasma Chromogranin A is the first indication of recurrence in radically operated midgut carcinoid tumors. *Neuroendocrinology* 2009;89(3):302-307. doi: 10.1159/000179900.
30. Massironi S, Conte D, Sciola V, Pia Spampatti M, Ciafardini C, Valenti L, Rossi ER, Peracchi M. Plasma chromogranin A response to octreotide test: prognostic value for clinical outcome in endocrine digestive tumors. *Am J Gastroenterol* 2010;105(9):2072-2078. doi: 10.1038/ajg.2010.154. Epub 2010 Apr 6.