



ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ENDOCRINOLOGIA

Списание
на Българското дружество
по ендокринология
(БДЕ)

Journal
of the Bulgarian Society
of Endocrinology
(BSE)

Гл. редактор: Боян Лозанов
Зам. Гл. редактор: Вл. Христов
Секретар: Р. Ковачева

Editor-in-Chief: Boyan Lozanov
Associate-Editor-in Chief: Vl. Christov
Scientific secretary: R. Kovatcheva

Редакционна колегия:

А.-М. Борисова, Ал. Куртев, В. Цанева, Д. Коев,
Ив. Цинликов, К. Христовозов, К. Коприварова,
Л. Коева, Л. Дянков, М. Орбецова, М. Протич, М.
Петкова, С. Захариева, Ц. Танкова, В. Митев

Editorial Board:

А.-М. Borissova, Al. Kurtev, V. Tzaneva, L. Koeva, I.
Tzinlikov, D. Koev, K. Koprivarova, K. Hristozov
M. Protich, M. Petkova, L. Dyankov, M. Orbetzova,
S. Zakharieva, Tz. Tankova, V. Mitev

Редакционен съвет:

Г. Кирилов, Ж. Геренова, Ил. Атанасова, И.
Даскалова, К. Цачев, Т. Хаджиева, Т. Сечанов,
Ф. Куманов

Advisory Board:

G. Kirilov, J. Gerenova, I. Atanassova, I. Daskalova,
K. Tzachev, T. Hadzieva, T. Sechanov, F. Kumanov

Международен научен съвет:

М. Богоев (Скопие), А. Булатов (Москва),
Г. Ердоган (Анкара), А. Изидори (Рим), Б.
Каранфилски (Скопие), П. Кендъл-Тейлър (Нюкастъл
на Тайн), М. Кокулеско (Букурещ), Г. Красас
(Солун), П. Лауберг (Дания), Д. А. Кутрас (Атина),
Дж. Лазарус (Кардиф), Е. Нишлаг (Мюнстер), А.
Пинкера (Пиза), С. Рефетоф (Чикаго), М. Серрано
Риос (Магрип), Й. Фьовени (Буганеца)

International Scientific Board:

M. Bogoev (Skopie), A. Bulatov (Moscow),
M. Coculescu (Bucharest), G. Erdogan (Ankara),
J. Fovenyi (Budapest), A. Isidori (Rome),
B. Karanfilski (Scopie), P. Kendall-Taylor (Newcastle
upon Tyne), D. A. Koutras (Athens), G. Krassas
(Thessaloniki), P. Lauberg (Denmark), J. H. Lazarus
(Cardiff), E. Nieschlag (Munster), A. Pinchera (Pisa),
S. Refetoff (Chicago), M. Serrano Rios (Madrid)

Ñi èñàí èà ñà èí ääèñèðà ìò/The journal is indexed by:

- *Bulgarian Citation Index*
- *National Library of Medicine, Bethesda*
- *The Librarian Royal Society of Medicine, London*
- *Academic National de medicine Bibliotheque, Paris*
- *British Diabetic Association, London*
- *Who Regional Office for Europe, Copenhagen*
- *Who Health Organization Library (periodicals), Geneva*
- *Canadian Institute for Scientific and Technical Information, Ottawa*

Ñi èñàí èà

ЕНДОКРИНОЛОГИЯ

том XIV, книжка 3, 2009

Съдържание

Оригинални статии

Атанаска Еленкова, Радина Иванова, Сабина Захариева, Людмила Матева, Стефан Петров

Феохромоцитом: фактори за малигнен характер и постоперативен рецидив 144

Е. Начев, Г. Кирилов, Й. Матророва, Ю. Андреева, К. Калинов, С. Захариева

Честота на артериалната хипертензия при акромегалия и хормонални фактори, участващи в нейната генеза 156

Виолета Йотова, Веселин Бояджиев, Мария Желева, Антоанета Иванова

Първична фамилна хипомагнезиемия – диференциална диагноза и проследяване на 2 годишен пациент 168

Обзори

Цветалина Танкова

Дипептидил пептидаза-4 (DPP-4) инхибитори – нов терапевтичен подход при захарен диабет тип 2 177

В. Василев, С. Захариева

Плазмен хромогранин А като специфичен маркер за откриване на тумори с невроендокринен произход сред пациентите с надбъбречни инциденталомии 186

Указания за авторите 195

Адрес на редакционната колегия: Клиничен център – МБАЛ по ендокринология, „Акад. Иван Пенчев“ ул. „Здраве“ №2, 1431 София; тел. (02) 985 6001; факс (02) 987 4145; Мобилен: 0888/680 343 (проф. Лозанов), Доц. Р. Ковачева – научен секретар (GSM 0898/60 86 02)

- Elsevier Bibliographic Databases, (SCOPUS) Netherlands
- Nagasaki University Medical Library, Nagasaki
- Державна Наукова Медична Библиотека, Київ
- Library, National Institute of Infectious Diseases, Tokio
- ВИНТИ/РАН-МинНауке России, Москва

ISSN 1310-8131

Journal

ENDOCRINOLOGIA

volume XIV, number 3, 2009

Contents

Originale articles

Atanaska Elenkova, Radina Ivanova, Sabina Zacharieva, Ludmila Mateva, Stefan Petrov

Pheochromocytoma: Markers for Malignancy and Postoperative Recidives 144

E. Natchev, G. Kirilov, J. Matrozova, I. Andreeva, K. Kalinov, S. Zacharieva

Prevalence of Hypertension in Acromegaly and Humoral Factors, Playing Role in its Pathogenesis 156

Violeta Iotova, Veselin Boyadzhiev, Maria Zheleva, Antoaneta Ivanova

Primary Familial Hypomagnesaemia – Differential Diagnosis and Follow-up of a 2 Years old Male Patient 168

Reviews

Tsvetalina Tankova

Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) Inhibitors – a Novel Therapeutic Approach of Type 2 Diabetes 177

V. Vasilev, S. Zacharieva

Plasma Chromogranin A as a Specific Marker for Detection of Tumours with Neuroendocrine Origin Among Patients with Adrenal Incidentaloma 186

Instructions to Authors 195

**Editorial Board: Clinical Center of Endocrinology,
2, Zdrave Str., 1431 Sofia, Bulgaria;
Tel (+0359) 2-895 6001; Fax C 2-987 4145; Mobil (+0359) 888 680 343 Lozanov,
Assoc. Prof. R. Kovatcheva – Sci. Secretary (GSM 0898/60 86 02)**

Феохромоцитом: маркери за малигнен характер и постоперативен рецидив

Атанаска Еленкова¹, Радина Иванова¹, Сабина Захариева¹, Людмила Матева², Стефан Петров²

¹Клиничен Център по Ендокринология и Геронтология, Медицински Университет, София

²Катедра химия и биохимия, Медицински Университет, София

Pheochromocytoma: Markers for Malignancy and Post-operative Recidives

Atanaska Elenkova¹, Radina Ivanova¹, Sabina Zacharieva¹, Ludmila Mateva², Stefan Petrov²

¹Clinical Centre of Endocrinology and Gerontology, Medical University, Sofia

²Department of Chemistry and Biochemistry, Medical University, Sofia

Резюме

Сред всички надбъбречни тумори феохромоцитомите са най-трудни за диагностициране и са свързани с най-висок сърдечно-съдов риск. Независимо от усъвършенстваните диагностични методи остават нерешени 2 основни проблема: късното диагностициране и липсата на сигурни критерии за малигненост. **Цел** на настоящето проучване беше изследването на някои имунохистохимични и генетични маркери за диференциране на малигнените от бенигнените феохромоцитомы.

Материал и методи: В проучването бяха включени 40 лица (21 мъже и 19 жени),

Abstract

Among all adrenal tumors pheochromocytomas are the most difficult to diagnose and are associated with the highest cardiovascular risk. In spite of the refined diagnostic methods two major problems remain unresolved: late diagnosis and the lack of reliable criteria for malignancy. **The aim of this study** was to investigate some immunohistochemistry and genetic markers for differentiation between malignant and benign pheochromocytomas.

Material and methods: 40 subjects (21 men and 19 women), operated on for pheochromocytoma were enrolled in the study. Immunohistochemical analysis on sections from

оперирани за феохромоцитом. Извърши се имунохистохимичен анализ върху хистологични препарати от екстирпираните тумори и генетичен анализ при лицата, suspectни за фамилен феохромоцитом, според съвременния алгоритъм.

Резултати: Липсваше корелация между размера на тумора и риска от малигнен характер. Традиционните хистологични белези за малигненост, като ядрен атипизъм, капсулна и съдова инвазия, митози бяха често находка както при малигнените варианти, така и при феохромоцитомите с доброкачествена еволюция. Имунохистохимичният анализ установи ниска *MIB1* експресия и позитивна реакция за *VEGF* при всички изследвани тумори и сигнификантно понижена експресия на *Clusterin* при феохромоцитомите от пациентите с болест на von Hippel-Lindau. Фамилни форми на феохромоцитом се установиха при 20 % от изследваните лица. Малигнени тумори се доказаха при 5% от пациентите, а постоперативни рецидиви се наблюдаваха при 4 пациенти (10%), като при 3 от тях се доказа фамилен характер на тумора.

Изводи: Диференцирането на малигнените от бенигнените феохромоцитомите не може да бъде основано на имунохистохимичните маркери *MIB 1*, *VEGF* и *Clusterin*. Единствени критерии за малигненост при този тумор остават наличните далечни (хематогенни) метастази. При фамилните форми на феохромоцитом, носителството на определени мутации се оказва по-добър предиктор за характера на тумора и риска от постоперативен рецидив. Носителството на мутантен *VHL*-ген е свързано с бенигнен характер на тумора и с много висок риск от постоперативни рецидиви.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: туморогенеза; *Clusterin*; *VEGF*; *SDHB*, *SDHC* и *SDHD*

paraffin-embedded tumor tissue was performed. Genetic analysis according to the contemporary algorithm was performed in patients suspicious for familial forms of pheochromocytoma.

Results: We did not find any correlation between the tumor size and the risk of malignancy. Traditional histological signs of malignancy such as nuclear atypism, capsular and vascular invasion and mitoses were frequent findings not only in malignant but also in benign tumors. Immunohistochemical analysis revealed low *MIB1* expression and positive *VEGF* staining in all investigated tumors and significantly decreased *Clusterin* expression in pheochromocytomas associated with von Hippel-Lindau disease (*VHL*). Eight patients (20%) were diagnosed with familial pheochromocytomas. Clinically malignant tumors (with distant metastases) were found in 5% of the patients. Postoperative recidives were observed in 4 patients (10%), 3 of them diagnosed with familial forms of pheochromocytoma.

Conclusions: Differentiation between malignant and benign pheochromocytomas can not be based on immunohistochemistry markers *MIB 1*, *VEGF* and *Clusterin*. The presence of distant (hematogenous) metastases remains the only reliable criterion for malignancy. Certain mutations in familial forms of pheochromocytoma could be better predictors for the tumor behavior and the risk of postoperative recidive. Carriers of mutant *VHL*-gene develop benign pheochromocytomas but have a very high risk of postoperative recidives.

KEY WORDS: pheochromocytoma; tumorigenesis; *Clusterin*; *VEGF*; *SDHB*, *SDHC*; *SDHD*

Болшинството от феохромоцитомите са бенигнени, с 5-годишна преживяемост над 95% след хирургичната им екстирпация и постоперативни рецидиви под 10%. Около 10% от феохромоцитомите са злокачествени, метастазират по лимфен и хематогенен път и имат 5-годишна средна преживяемост около 44% (30). Малигнените феохромоцитомите са като правило резистентни на лъчетерапия и слабо повлияващи се от стандартните цитостатици, но ранното откриване и оперативно лечение подобрява далечната прогноза. Общоприетите хистологични критерии за малигненост (инвазия в капсулата и съдовете на тумора; некрози; полядрени клетки; ядрен плеоморфизъм; множествени митози) в случая са несигурни. Диагнозата малигнен феохромоцитом се базира на доказани хематогенни метастази и/или инвазия в съседни тъкани и органи (11,12,27,28). Диагностичните търсения за установяване на маркери за малигненост и предиктори за постоперативен рецидив при феохромоцитом са обект на множество проучвания. Младата възраст на изява, мъжкият пол, по-големият размер на тумора, екстраадrenalната локализация и фамилната обремененост, определени от някои автори като независими рискови фактори за постоперативен рецидив и малигнен характер на тумора, категорично се отхвърлят от други научни колективи (1,8,21).

Материал и методи

Основна цел на настоящето проучване беше да се изследва прогностичната стойност на някои имунохистохимични и генетични маркери за диференциране на малигнените от бенигнени феохромоцитомите. Като допълнителни цели си поставихме определяне на процента постоперативни рецидиви при оперираните за феохромоцитом и факторите, които ги обуславят, както и изследване на генотипно-фенотипните корелации при фамилните форми на феохромоцитом.

В проучването бяха включени 40 лица (21 мъже и 19 жени), на средна възраст 41,9 ±

16,9 год. (от 10 до 58 години), оперирани за феохромоцитом в Клиниката по ендокринна хирургия на УСБАЛЕ през последните 15 години.

Хормонален анализ: Диагнозата феохромоцитом беше поставена на базата на типична клинична картина с кризисно протичаща артериална хипертония, повишена 24-часова уринна екскреция на катехоламини и/или метанефрини и данните от образната диагностика (СТ, MRI) за адренален тумор. Изследването на уринните метанефрини беше извършено радиоимунологичен анализ (RIA). При всички пациенти диагнозата феохромоцитом е потвърдена от хистологичния резултат след хирургичната екстирпация.

Хистологичната оценка на характера беше определена на базата на скоровата система на Thompson (27), с включени 12 хистологични параметъра, на базата на които туморите с общ скор ≤ 3 точки се категоризират като доброкачествени, а тези с 4 и повече – хистологично злакачествени (табл.1).

Имунохистохимичен анализ се извърши върху парафинови блокчета от 38 от екстирпирани феохромоцитомите. Изследвани бяха следните имунохистохимични маркери: 1. **MIB-1** като показател за пролиферативна активност, изследвахме с анти тяло MIB-1 (DAKO, Denmark) на цели срези чрез морфометрично измерване броя на позитивните и негативните клетки посредством CAST-grid система, свързана с компютър; 2. **VEGF** като фактор, свързан с туморната ангиогенеза, изследвахме имунохистохимично с моноклонално анти тяло Ab-7 (Thermo Fisher Scientific, UK), чиято степен на експресия беше категоризирана съответно като: липсваща, лека, умерена или изразена; 3. **Clusterin** – като нов маркер за диференциране на малигнени от бенигнени тумори – с моноклонално мише анти тяло срещу човешки Clusterin_α. (Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA).

Генетичен анализ: се осъществи в Европейска Болница „Жорж Помпиду“, Париж, Катедра по генетика. Според съвременни-

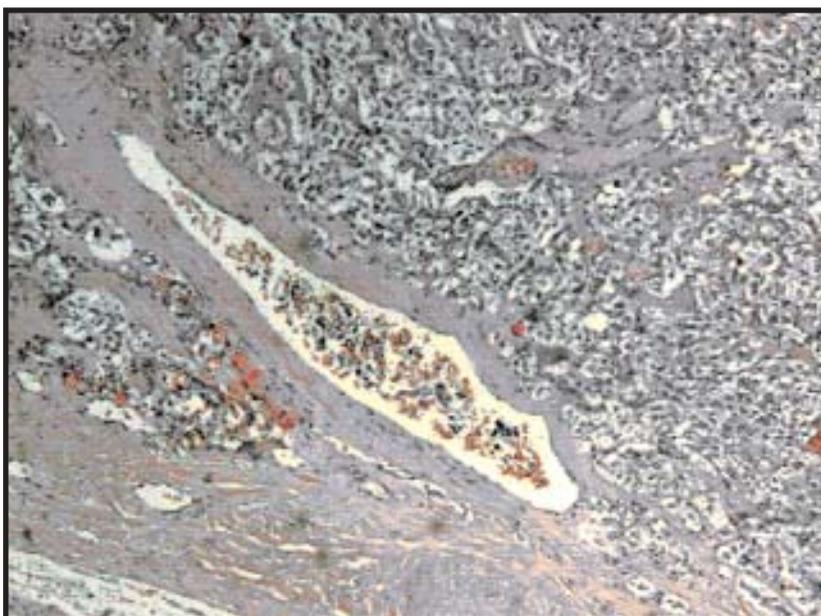
те препоръки генетичен анализ се извърши при пациентите с феохромоцитом и позитивна фамилна анамнеза, множествен феохромоцитом или ранна изява на заболяването (под 30-годишен възраст). След подписано информирано съгласие от пациентите бяха взети проби 20 мл цяла кръв с антикоагулант (ЕДТА), както и проби от екстирпирани феохромоцитомы. До транспортирането им пробите цяла кръв се съхраняваха замразени на -20°C , а пробите от резецирани тъкани – на -70°C . Транспортирането на кръвните проби се осъществи на стайна температура, а на резецираните тъкани – в сух лед, чрез куриерска служба. Генетичният анализ се извърши според утвърдения съвременен алгоритъм (2): 1. Анализ на периферна ДНК, изолирана от венозна кръв на 2 етапа: I етап: скрининг на пациентите с феохромоцитомы чрез директно секвениране на четирите екзона на SDHD, осемте екзона на SDHB и трите екзона на VHL. II етап: лицата, при които не се откриват мутации по горепосочените гени, съобразно тяхната фамилна анамнеза, се изследват за SDHC и RET-протоонкоген. 2. Соматичен туморен ДНК-анализ върху резецираните тъкани от екстирпирани

феоххромоцитомы: по-специално, загуба на хетерозиготност (LOH) чрез изследване на микросателитни маркери.

Резултати

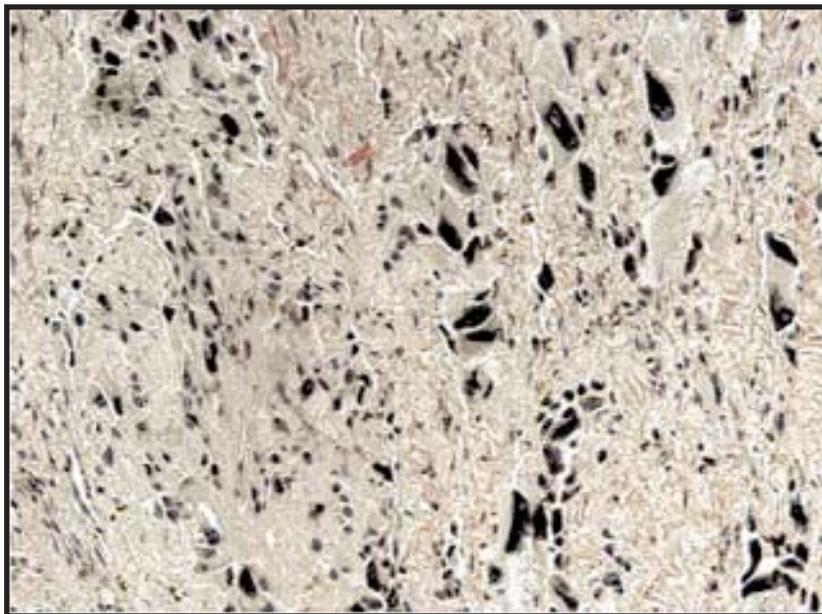
При 22 (55%) от пациентите е диагностициран десностранен тумор, при 14 лица (35%) – левостранен тумор, 3 от пациентите (7,5%) са с двустранни тумори, 1 пациент – с множествен хормоносеكريращ параганглиом. При двамата от изследваните пациенти феохромоцитомът е определен като малигнен на базата на налични хематогенни метастази.

Макроскопски изследваните феохромоцитомы варираха в широки граници по отношение на размерите и теглото си, като в 55% от болните теглото се движеше в рамките от 30 до 100 g, а размерите – между 4 см и 8 см. Липсваше корелация между размера, респективно теглото на тумора и риска от малигнен характер. Хистологичното туморите се представиха с разнообразен строеж, най-често с полигонални клетки с базофилна цитоплазма и везикуларни ядра с рехав хроматин. При всички тумори се отбеляза клетъчен и ядрен



Фигура 1. Феохромоцитом с начална капсулна инвазия.

Figure 1. Pheochromocytoma with initial capsular invasion.



Фигура 2. Феохромоцитом при болест на VHL – наличие на характерни светли клетки, с изразен клетъчен и ядрен полиморфизъм, и балова хистологична оценка – 5.

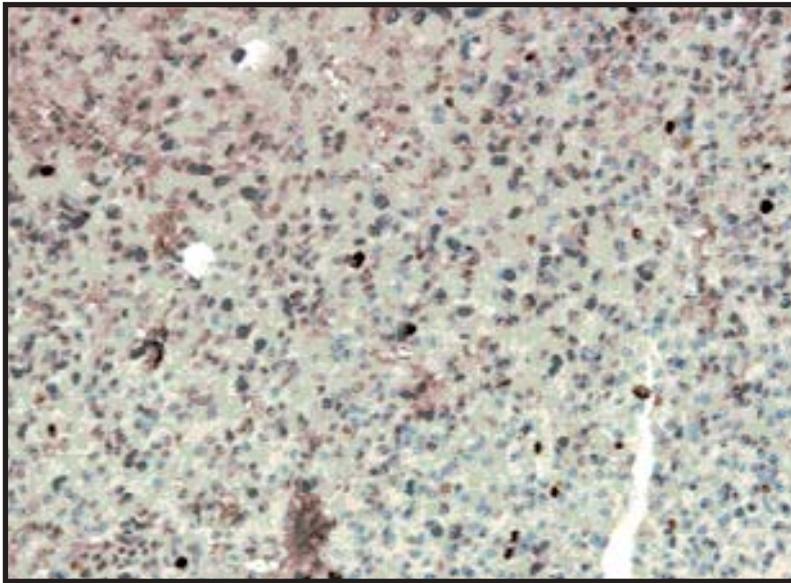
Figure 2. Pheochromocytoma in von Hippel-Lindau disease – presence of typical clear cells with marked cellular and nuclear polymorphism and histological score 5.

полиморфизъм, различен по степен в отделните участъци на тумора. Традиционните хистологични белези за малигненост, като ядрен атипизъм, капсулна и съдова инвазия, митози бяха често находка както при малигнените варианти, така и при феохромоцитомите с доброкачествена еволюция. На базата на скорвата система на Thompson 11 (28%) от феохромоцитомите бяха категоризирани като хистологично малигнени (с общ скор ≥ 4), като само при 2 от пациентите при продължителното проследяване са установени хематогенни метастази като сигурни белези за малигненост (табл.1). Два от туморите с висока скорова оценка (5 и 6 съответно) са в рамките на болест на von Hippel-Lindau и се асоциират с висок риск от постоперативни рецидиви при липса на белези на хематогенни метастази за целия период на проследяване.

Имунохистохимично изследване на MIB-1 като показател за пролиферативната активност на туморите показва, че проучените от нас феохромоцитомите са с много нисък пролиферативен индекс – $0,55 \pm 0,46$, като са налице съществени различия между отделните случаи – границите варират от 0,3 до 1,78. Липсва статистическа значимост между пролиферативния индекс и

баловата хистологична оценка и теглото на тумора. Имунохистохимичното изследване за **VEGF** при всички изследвани феохромоцитомите показва позитивна реакция в цитоплазмата на туморните клетки, която беше хетерогенна по интензитет и локализация. Интензивна експресия на VEGF се наблюдаваше огнищно в съседство на участъци туморна тъкан с липсваща или слаба реакция. Не установихме връзка между интензитета и локализацията на VEGF експресията и баловата хистологична оценка на феохромоцитомите, въпреки че при 6 от 11 случая с хистологично „злокачествени“ тумори позитивната реакция беше по-често изразена. В цитоплазмата на всички изследвани тумори установихме дифузна експресия на **Clusterin** с различен интензитет. По-слаба реакция установихме при 10 тумора с бенигнени клинични и хистологични характеристики, в това число и при двустранните тумори от двама пациенти с болестта на VHL.

Генетичен анализ: Фамилни форми на феохромоцитом се установиха при 8 (20%) от проследените лица. **Неврофиброматоза на Reglinghausen (NF-1)** се установи при 3 пациенти оперирани за феохромоцитом, като според съвременния диагностичен алгоритъм диагнозата беше поставена на



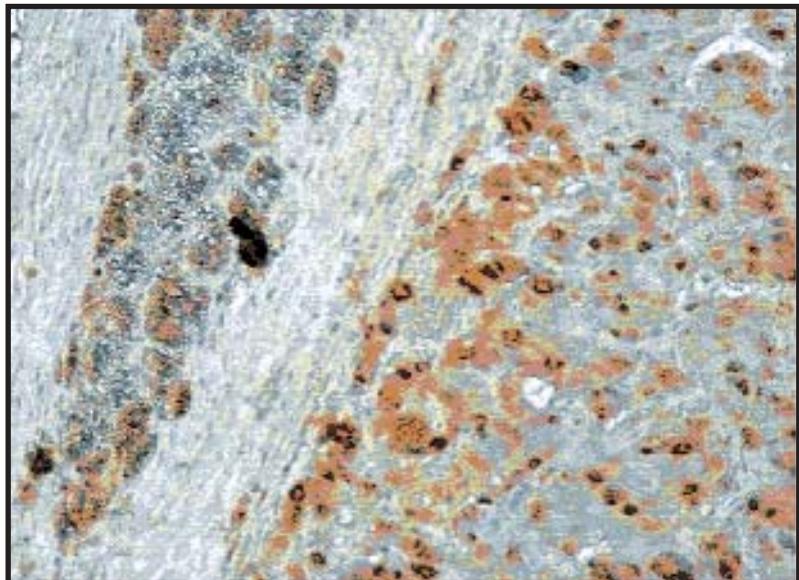
Фигура 3. Феохромоцитом – ниска пролиферативна активност на тумора; слаба експресия на MIB-1.

Figure 3. Pheochromocytoma – low proliferative activity; slight MIB-1 expression.



Фигура 4. Феохромоцитом – VEGF-позитивни туморни клетки, включително в капсулната инвазия.

Figure 4. Pheochromocytoma – VEGF-positive tumor cells, including at the sites of capsular invasion.



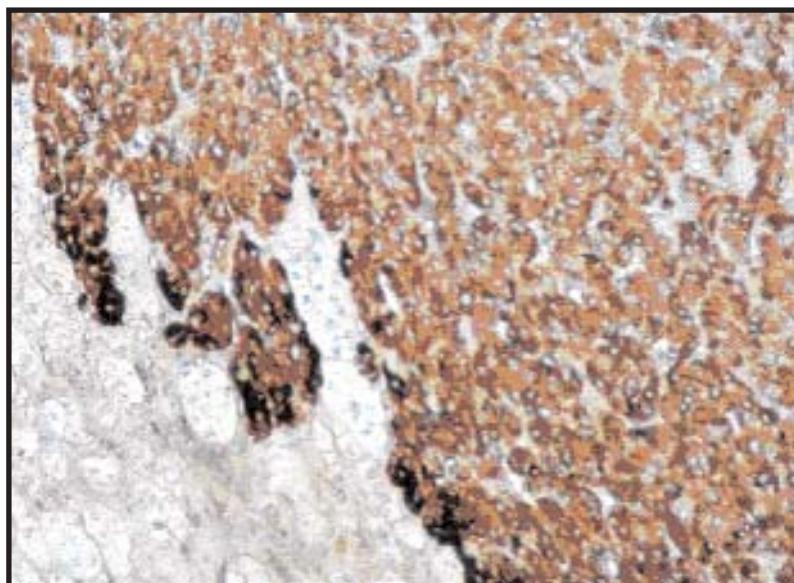
базата на фенотипни характеристики. **Болест на von Hippel Lindau (VHL)** се диагностицира при 4 пациенти, принадлежащи към 4 различни фамилии. Съобразно генотипно-фенотипната класификация (табл. 2), три от тях се отнасят към по-редкия 2C фенотип или т.нар. pheochromocytoma only syndrome, с единствена изява двустранен феохромоцитом, погрешно диагностициран преди анализа като спорадичен. Установиха се 2 точкови **missense-мутации**, съответно с.499C>T (p.Arg167Trp) при 2 от фамилиите и с.500G>A (p.Arg167Gln) при тре-

тата фамилия. Четвъртата българска фамилия се представя клинично като фенотип 2B, а идентифицираната мутация е съответно с.194C>T (p. Ser65Leu). **Мутация в гена за SDHD** субединицата на сукцинатдехидрогеназата, **с. 479_480insGT (p.X160TrpextX*8)**, се доказва при 1 пациент, представящ се като множествен хормоно-секретиращ параганглиом, стартирал при диагностицирането като двустранен шивен параганглиом. При нито един от изследваните пациенти не установихме данни за **множествена ендокринна неоплазия тип 2**

Таблица 1. Хистологични параметри според скорвата система на Thompson при изследваните феохромоцитому

Table 1. Histological parameters according to the Thompson's score system

Хистологични параметри <i>Histological parameters</i>	Феохромоцитому (n=40) <i>Pheochromocytomas (n=40)</i>
Ядрен полиморфизъм (1т.) Nuclear polymorphism (1 point)	3 (7,5%)
Хиперхромност на ядрата (1т.) Nuclear hyperchromasia (1 point)	3 (7,5%)
Съдова инвазия (1т.) /Vascular invasion (1 point)	1 (2,5%)
Капсулна инвазия (1т.) /Capsular invasion (1 point)	5 (12,5%)
Дифузен строеж (1т.) /Diffuse pattern (1 point)	29 (72%)
Некрози (1т.) /Necroses (1 point)	3 (7,5%)
Хиперцелуларитет (2т.) Hypercellularity (2 points)	0 (0 %)
Вретеновидни клетки (2т.) Fusiform cells (2 points)	9 (14%)
Монотонност (2т.) /Monotony(2 points)	0 (0%)
Митотични фигури >3/10 HPF (2т.) Mitotic figures (2 points)	2 (5 %)
Атипични митози (2т.) Atypical mitoses (2 points)	0 (0%)
Инвазия в мастна тъкан (2т.) Adipose tissue invasion (2 points)	0 (0%)



Фигура 5. Феохромоцитом – изразена експресия на clusterin в туморните клетки, при липса на експресия в клетките на надбъбречната кора в съседство.

Figure 5. Pheochromocytoma – marked Clusterin expression in the tumor cells; lack of expression in the adrenal cortex cells.

Таблица 2. Генотипно-фенотипна класификация при болестта на Hippel-Lindau

Table 2. Genotype-phenotype classifications in von Hippel-Lindau disease*. Source: Lancet 2003; 361: 2062.

ТИП	КЛИНИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ Clinical Characteristics
Тип 1 <i>Type 1</i>	1. Хемангиобластоми на ретината / <i>Retinal hemangioblastomas</i> 2. Хемангиобластоми на ЦНС/CNS hemangioblastomas 3. Бъбречен карцином / <i>Renal cell carcinoma</i> 4. Кисти и солидни тумори на панкреаса / <i>Pancreatic tumors and cysts</i>
Тип 2A <i>Type 2A</i>	1. Феохромоцитом / <i>Pheochromocytoma</i> 2. Хемангиобластоми на ретината / <i>Retinal hemangioblastomas</i> 3. Хемангиобластоми на ЦНС/CNS hemangioblastomas
Тип 2B <i>Type 2B</i>	1. Феохромоцитом / <i>Pheochromocytoma</i> 2. Хемангиобластоми на ретината / <i>Retinal hemangioblastomas</i> 3. Хемангиобластоми на ЦНС /CNS hemangioblastomas 4. Бъбречен карцином / <i>Renal cell carcinoma</i> 5. Солидни тумори и кисти на панкреаса / <i>Pancreatic tumors and cysts</i>
Тип 2C <i>Type 2C</i>	Феохромоцитом изолиран <i>Pheochromocytoma only</i>
<p>*Туморите, произхождащи от ендолимфатичния сак и епидидимиса и широкия лигачмент не могат да бъдат отнесени към точно определен тип на болестта на von Hippel-Lindau. <i>*Endolymphatic sac tumors and cystadenomas of the epididymis and broad ligament have not been assigned to specific von Hippel-Lindau types.</i></p>	

(MEN 2) – фамилно заболяване, включващо феохромоцитом.

Средната възраст при поставяне на диагнозата феохромоцитом при нашите пациенти с NF-1 е 50 год, а при болестта на von Hippel Lindau – 17,7 год. Пациентът с доказана SDHD – мутация е изявил заболяването на 24 годишна възраст.

Обсъждане

Изследването на нови маркери-предиктори за малигнен характер при феохромоцитом е обект на множество проучвания. Макроскопските характеристики на тумора не корелират с неговия характер, а тра-

диционните хистологични белези за малигненост, като ядрен атипизъм, капсулна и съдова инвазия, са честа находка както при малигнените, така и при бенигнените тумори. До момента не са открити и надеждни имунохистохимични маркери, предсказващи малигненост. В разрез с някои проучвания, при нашите пациенти установихме ниска пролиферативна активност, а повишената експресия на **VEGF** може да бъде израз по-скоро на богатата васкуларизация на този тумор, отколкото на неговия характер. Проучвания от последните няколко години фокусират вниманието върху **Clusterin** – гликопротеин, чиято функция

не е напълно изяснена, но все повече се свързва с туморогенезата и процесът на метастазиране при редица тумори. Повишена експресия на **Clusterin** се установява при редица малигнени тумори, основно от ектодермален произход: карцином на млечната жлеза, колоректален карцином, ренален карцином, простатен карцином, малигнен меланом; карцином на ларинкса; хепатоцелуларен карцином и др. (5,7,26). Обсъжда се ролята му в резистентността на туморните клетки към изкуствено предизвикана апоптоза, един от основните проблеми на съвременната химиотерапия (23). В изследваните от нас тумори не установихме сигнификантна корелация между експресията на Clusterin и победенето на феохромоцитомата. Регистрираната от нас понижена експресия при случаите с болест на von Hippel-Lindau е в унисон с литературните данни (22). Основният продукт на VHL-гена е VHL-протеин (pVHL), изпълнява ролята на клетъчен кислороден сензор. Механизмът на тази сигнализация е опосредстван от взаимодействието на pVHL с elongin B и elongin C и cullin 2, образувайки т.нар. VHL-комплекс, чиято основна функция е негативна регулация на VEGF mRNAs, и съответно ангиогенезата чрез инхибиторен ефект върху продукцията на т.нар. индуцируеми от хипоксията фактори (HIF-1 и HIF-2). Мутациите, предизвикващи фенотип 1, 2A и 2B, водят до загуба на способността на pVHL да взаимодейства с елонгините и възпрепятстват образуването на VHL-комплекс. Подава се погрешен сигнал за хипоксия, покачват се нивата на индуцируемите от хипоксията фактори (HIF), което води до повишена продукция на съдови растежни фактори, основно VEGF (vascular endothelial growth factor) и PDGF (platelets derived growth factor), в резултат се стимулира ангиогенезата, която е в основата на туморния растеж. При фенотип 2C, pVHL запазва способността си за down-регулация на HIF. Имунохистохимичният анализ показва загуба на способността за up-регулация на Clusterin-овата продукция, която е независима от HIF. Ре-

зултатите от този анализ внушават възприемането на Clusterin-овата секреция като биомаркер за HIF-независимата тумор-супресорна функция на pVHL специално по отношение развитието на феохромоцитом (22). Ниската експресия при 2C фенотип на болестта на VHL се асоциира с изключително бенигният характер на феохромоцитомите в рамките на този синдром. Изхождайки от тези данни спекулативно може да се допусне участието на този гликопротеин в определянето на характера на феохромоцитомата.

За разлика от имунохистохимичните маркери, носителството на мутации в някои от гените, предразполагащи към развитие на феохромоцитом изглежда се оказва по-добър предиктор за характера на тумора и риска от постоперативен рецидив. Носителството на мутации във VHL-гена определя бенигният характер на феохромоцитомите, но висок риск от ранни постоперативни рецидиви. Установените при българските фамилии точкови мутации са известни в литературата и са описани за първи път от Crossey и сътр. (10). Нашите данни повтарят данните от литературата, че герминативни мутации в кодон 167 на VHL-гена (R167W and R167Q) носят висок риск от развитие на феохромоцитом, но са в противоречие с установения висок риск от изява на бъбречен карцином (31). При нито един член от описаните фамилии при продължителното проследяване до момента не е диагностициран бъбречен карцином. Повишен риск от постоперативни рецидиви определя и носителството на мутации в SDHD-гена. Въпреки бенигният си характер, туморите в рамките на този синдром често са двустранни, с шийна локализация или множествени, определящи труден оперативен достъп и нердикалност на извършените хирургични интервенции. В противовес Мутации в NF-1 гена определя бенигният характер на феохромоцитомата и не носи риск от постоперативни рецидиви след екстирпация на тумора. От друга страна, носителството на мутации в VHL-гена и SDHD-гена

обулавя ранна изява на феохромоцитом, докато при неврофиброматозата на Reglinghausen средната възраст при поставяне на диагнозата феохромоцитом е около 50 год и не се различава от тази при спорадичните форми (29). Мутациите в NF1, тумор-супресорен ген, локализиран в 17-та хромозома (17q) не се асоциира с повишен риск от малигнен потенциал или постоперативни рецидиви при пациентите с феохромоцитом.

Литературен обзор по проблема

Туморогенезата е сложен и многостъпален процес, за осъществяването на който са необходими няколко есенциални нарушения в клетъчната физиология: автономен растеж; загуба на сензитивност към външни инхибиращи растежа сигнали; резистентност към програмираната клетъчна смърт (апоптозата); неограничен репликационен потенциал, туморна ангиогенеза и способност за тъканна инвазия и метастазиране (19).

Туморната ангиогенезата е критично важна за туморния растеж и метастазирането на малигнените тумори. За да се осъществи метастатичният процес трябва да са изпълнени няколко задължителни условия, първото от които е неоваскуларизацията – неосъдовете осигуряват адекватна туморна перфузия, а новообразуваните ендотелни клетки секретират множество растежни фактори (IGFs, PDGF, TGF β , IL-1), стимулиращи туморния растеж (9). Изхождайки от факта, че феохромоцитомите са изключително добре васкуларизирани, множество проучвания се опитаха да дадат отговор за връзката между ангиогенния статус и характера на тумора. Получените противоречиви резултати не дават основание диференциалната диагноза между малигнени и бенигнените форми на феохромоцитом да бъде базирана на съдовата архитектура на тумора. Понякога проучвания изследват нивото на експресия на някои агенти, действащи като промотори или инхибитори на ангиогенезата, като най-добре проучен в тази група

е съдовият ендотелен растежен фактор (VEGF). Нормалната медула и над 70% от бенигнените феохромоцитомы са негативни при имунохистохимичен анализ за VEGF, докато малигнените феохромоцитомы са по-често позитивни (24).

Пролиферативната активност на туморите може да бъде оценена чрез използване на MIB-1-антитяло за детекция на Ki-67 (ядрен протеин, есенциален за клетъчната пролиферация)(13). Няколко проучвания установяват повишен индекс на MIB-1/Ki-67-експресия като предиктор на малигненост при феохромоцитом и определят висока специфичност на този показател (8,12,27).

Неограниченият репликационен потенциал е в основата на туморната прогресия. Ключов елемент е запазването на теломера (терминалните участъци на хромозомите), за целта малигнените клетки поддържат повишена експресия на ензима теломераза. Проучвания върху **човешката теломераза** показват сигнификантно по-висока експресия на един от компонентите ѝ – теломераза обратна транскриптаза (hTERT) при малигнените тумори в сравнение с бенигнените (6).

Придобитата резистентност към апоптозата е „запазена марка“ на болшинството малигнени тумори. Ключова роля в програмираната клетъчна смърт играят протеините от Bcl-2 – фамилията, към която се отнасят агенти с проапоптозна (Bax, Bak, Bid, Bim) или антиапоптозна функция (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W) и действат като регулатори на апоптозата, повлиявайки отделяне от митохондриите на Cytochrome C, мощен катализатор на апоптозата. Експресията на един от проапоптозните агенти – Bax, се стимулира от p53-протеин, продукт на тумор-супресорен ген, локализиран в 17^{-ма} хромозома (17p13.1). Това е един от гените с най-много описани до момента мутации при различни малигнени тумори. Неговият продукт - p53 – ядрен фосфопротеин, понастоящем се разглежда като мощен антиканцерозен агент. В нормалните клетки активирането на p53 от хипоксия или агенти,

увреждащи ДНК, води до „арест“ на клетъчния цикъл във фаза G1 и индукция на репаративни процеси на ДНК. В случай на неуспех на ДНК-репарацията, индуцираната от p53 активация на Вах гена задейства апоптозата. Мутантният p53 има по-гълъг полуживот и се установява повишена експресия при имунохистохимичен анализ на много тумори. Редица проучвания цитират сигнификантно повишена експресия на **Vcl-2** и **p53** при малигнени феохромоцитом.

Широко дискутиран е въпросът за ролята на **инхибин** и **активин** в **туморогенезата**. Тези димерни гликопротеини принадлежат към TGF β -суперфамилия, включваща фактори с паракринно и автокринно действие в регулацията на туморния растеж и диференциация. (14). Акцентира се върху ролята на **инхибин/активин β В-субединицата** (обща за инхибин и активин), която се експресира нормално от надбъбречната медула, но не и от надбъбречната кора. Проучванията, базирани на имунохистохимичен анализ, не оправдаха очакванията за информативността на този маркер в разграничаването на бенигнените от малигнени варианти на феохромоцитом. (20,25).

Проучвания от последните няколко години установиха връзка между носителството на определени мутации в гените, кодиращи някои от субединиците на **сукцинатдехидрогеназата (SDH)** и локализацията, характера на феохромоцитомата и риска от постоперативни рецидиви (2,15,16,17,18). Възникна хипотезата за митохондриално медирана недостатъчност на апоптозата и евентуално активиране на ангиогенния път. При пациенти с феохромоцитомати и параганглиоми са идентифицирани множество различни мутации в гените за три от четирите субединици на **SDH** – SDHB, SDHC и SDHD. На базата на анализ върху 116 лица, носители на мутации в гените за субединиците SDHB и SDHD, през 2005 г. Международният SDH Консорциум (**International SDH Consortium**) публикува следните данни: носителството на SDHB-мутации е свързано с по-висок риск от екстраадrenalна локализация (абдоминална или торакална) и малигнен

характер на тумора, но с по-късна изява, докато носителите на SDHD-мутации по-често развиват параганглиоми локализовани в областта на главата и шията или мултипленни тумори, но възрастта на изява е по-млада (3).

***Проучването е финансирано по проект към МУ-София, договор №25/2007 год.**

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Amar L., A Servais, AP Gimenez-Roqueplo, F Zinzindohoue, G Chatellier, PF Plouin. Year of Diagnosis, Features at Presentation, and Risk of Recurrence in Patients with Pheochromocytoma or Secreting Paraganglioma. *J Clin Endocrinol & Metab*, 2005; 90 (4): 2110-2116
2. Amar L, J Bertherat et al. Genetic testing in pheochromocytoma or functional paraganglioma. *J Clin Oncol*. 2005;23(34):8812-8.
3. Benn DE, AP Gimenez-Roqueplo, JR Reilly, J Bertherat, J Burgess, K Byth, M Croxson, PL Dahia, M Elston, O Gimm, D Henley, P Herman, V Murday, P Niccoli-Sire, JL Pasieka, V Rohmer, K Tucker, X Jeunemaitre, DJ Marsh, PF Plouin, BG Robinson. Clinical presentation and penetrance of Pheochromocytoma/ Paraganglioma syndromes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;
4. Benn D, M Croxson. Novel succinate dehydrogenase subunit B (SDHB) mutations in familial pheochromocytomas and paragangliomas, but an absence of somatic SDHB mutations in sporadic pheochromocytomas. *Oncogene*, 2003;22:1358-1364
5. Bjork JK, L Sistonen. Clustering of heat-shock factors. *Biochem J*. 2006 395(1):223-3
6. Boltze C; H Lehnert; R Schneider-Stock; B Peters; C Hoang-Vu; A Roessner HSP90 Is a Key for Telomerase Activation and Malignant Transition in Pheochromocytoma. *Endocrine*, 2003; 22 (3),193-202
7. Busam KJ, D Kucukgol, S Eastlake-Wade, D Frosina, R Delgado, AA Jungbluth. Clusterin expression in primary and metastatic melanoma. *J Cutan Pathol*. 2006 Sep; 33(9):619-23.
8. Clarke MR, RJ Weyant, CG Watson, SE Carty. Prognostic markers in pheochromocytoma. *Hum Pathol*, 1999;30(4):486-7.
9. Cotran RS, V Kumar, Collins, T. Robbins Pathologic Basis of Disease, 6 edn (Philadelphia, W.B. Saunders Company) 1999; pp. 301-302.

10. Crossey PA, FM Richards, K Foster, JS Green, A Prowse, F Latif, MI Lerman, B Zbar, NA Affara, MA Ferguson-Smith et al. Identification of intragenic mutations in the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene and correlation with disease phenotype. *Hum Mol Genet.* 1994 Aug;3(8):1303-1308.
11. Eisenhofer G, SR Bornstein, FM Brouwers, NK Cheung et al. Malignant pheochromocytoma: current status and initiatives for future progress. *Endocr Relat Cancer.* 2004 Sep;11(3):423-36.
12. Eisenhofer G, YJ Chen, SF Wu, J Gao, WJ Jiang, ZH Lu, J Guan, SZ Wei, YF Luo, JL Cao, JW Wan. Distinction between benign and malignant pheochromocytomas. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2004;33(3):198-202
13. Endl E, J Gerdes. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res* 2000; 257: 231-237.
14. Gail P, J Risbridger, F Schmitt, DM Robertson. Activins and Inhibins in Endocrine and Other Tumors. *Endocrine Reviews*; 2001; 22 (6): 836-858
15. Gimenez-Roqueplo AP, J Favier, P Rustin, C Riubland, M Crespin et al. Mutations in the SDHB gene associated with extra-adrenal and/or malignant pheochromocytomas. *Cancer Research* 2003;63:5615-5621
16. Gimenez-Roqueplo AP, J Favier, P Rustin, C Riubland, V Kerlan et al. Functional consequences of a SDHB mutations in an apparently sporadic pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol&Metabol.*2002;87(10):4771-4774
17. Gimenez-Roqueplo AP, J Favier, P Rustin, C Riubland et al. The R22X mutation of the SDHD gene in hereditary paraganglioma abolishes the enzymatic activity of complex II in the mitochondrial respiratory chain and activates the hypoxia pathway. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 1186-1197.
18. Gimm O, M Armanios, H Dziema, HP Neumann, C Eng. Somatic and occult germ-line mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in nonfamilial pheochromocytoma. *Cancer Res* 2000;60:6822-5
19. Hanahan D, R A Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
20. Hofland J, FH van Nederveen, MA Timmermann, E Korpershoek, WW de Herder, JW Lenders, AA Verhofsstad, RR de Krijger, FH de Jong. Expression of activin and inhibin subunits receptors and binding proteins in human pheochromocytomas: a study based in mRNA analysis and immunohistochemistry. *Clin Endocrinol* 2007; 66: 335-340
21. Laurent Yon, J Guillemot, M Montero-Hadjadje, LGrumolato, J Leprince, H Lefebvre, V Contesse, PF Plouin, HVaudry and YAnouar Identification of the Secretogranin II-Derived Peptide EM66 in Pheochromocytomas as a Potential Marker for Discriminating Benign Versus Malignant Tumors. *J Clin Endocrinol& Meta*; 2003; 886: 2579-2585
22. Nakamura E, P Abreu-e-Lima, Y Awakura, T Inoue, T Kamoto, O Ogawa, H Kotani et al. Clusterin Is a Secreted Marker for a Hypoxia-Inducible Factor-Independent Function of the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein. *American Journal of Pathology.* 2006 (168):574-584
23. Pajak B, A Orzechowski. Clusterin: the missing link in the calcium-dependent resistance of cancer cells to apoptogenic stimuli. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2006; 60:45-51.
24. Salmenkivi K, P Heikkilä, J Liu, J Arola. VEGF in 105 pheochromocytomas: enhanced expression correlates with malignant outcome. *APMIS* 2003;111(4):458-64
25. Salmenkivi K, J Arola, R Voutilainen, V Ilvesmäki, C Haglund, A Kahri, P Heikkilä and J Liu. Inhibin/Activin β -Subunit Expression in Pheochromocytomas Favors Benign Diagnosis. *J Clin Endocrin Metab*; 2001; 86 (5): 2231-2235
26. Shannan B, M Seifert, K Leskov, D Boothman, C Pfohler, W Tilgen, J Reichrath. Clusterin (CLU) and melanoma growth: CLU is expressed in malignant melanoma and 1,25-dihydroxyvitamin D3 modulates expression of CLU in melanoma cell lines in vitro. *Anti-cancer Res.* 2006; 26 (4A):2707-16
27. Thompson LD. Pheochromocytoma of the adrenal gland scaled score (PASS) to separate benign from malignant neoplasms: a clinicopathologic and immunophenotypic study of 100 cases. *American Journal of Surgical Pathology*; 2002 (26):551-566.
28. Van der Harst E, WW de Herder, RR de Krijger, HA Bruining, HJ Bonjer, SW Lamberts, AH van den Meiracker, Stijnen TH & Boomsma F The value of plasma markers for the clinical behaviour of phaeochromocytomas. *European Journal of Endocrinology*; 2002 (147): 85-94.
29. Walther MM, R Reiter, HR Keiser, PL Choyke, D Venzon, K Hurley, JR Gnarra, JC Reynolds, GM Glenn, B Zbar, WM Linehan. Clinical and genetic characterization of pheochromocytoma in von Hippel-Lindau families: comparison with sporadic pheochromocytoma gives insight into natural history of pheochromocytoma. *Journal of urology.* 1999 ; 162 (3 Pt 1) : 659-664.
30. Yoshida S., M Hatori, T Noshiro, N Kimura and S Kokubun. Twenty-six-years' survival with multiple bone metastasis of malignant pheochromocytoma. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001; 121: 598-600.
31. Zbar B, T Kishida, F Chen, L Schmidt, ER Maher, FM Richards, PA Crossey, AR Webster, NA Affara, MA Ferguson-Smith, H Brauch, D Glavac, HP Neumann, S Tisherman, JJ Mulvihill, DJ Gross, T Shuin, J Whaley, B Seizinger, N Kley, S Olschwang, C Boisson, S Richard, CH Lips, Lerman. Germline mutations in the Von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in families from North America, Europe, and Japan. *MHuman mutation.* 1996 ; 8 (4) : 348-357.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Д-р Атанаска Еленкова
Клиничен Център по Ендокринология
УСБАЛЕ „Акад. Иван Пенчев“, ул. Здраве №2
1431 София, България
e-mail: atanaska@yahoo.com

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Dr. Atanaska Elenkova, M.D.
Clinical Centre of Endocrinology, USHATE
„Acad. Ivan Penchev“, 2 Zdrave Str.
1431 Sofia, Bulgaria
e-mail: atanaska@yahoo.com

Честота на артериалната хипертония при акромегалия и хуморални фактори, участващи в нейната генеза

Е. Начев¹, Г. Кирилов¹, Й. Матрозова¹, Ю. Андreeва¹, К. Калинов², С. Захариева¹

¹Клиничен център по Ендокринология и Геронтология МУ – София;

²Нов Български Университет – София

Prevalence of Hypertension in Acromegaly and Humoral Factors, Playing Role in its Pathogenesis

E. Natchev¹, G. Kirilov¹, J. Matrozova¹, I. Andreeva¹, K. Kalinov², S. Zacharieva¹

¹Clinical Centre of Endocrinology and Gerontology, Medical University, Sofia;

²New Bulgarian University, Sofia

Резюме

Акромегалията се съчетава с висока честота на артериална хипертония (АХ). В патогенезата на АХ при Акромегалия участват различни механизми, голяма част от които не са добре проучени.

Цел. Да се установи честотата на АХ при болни с Акромегалия; да се изследва връзката между активността на Акромегалията и АХ, както и между давността на Акромегалията и АХ; да се покаже ефекта на понижаване на хиперсоматотропизма върху АХ; да се установят промени в някои хуморални фактори участващи в патогенезата на АХ (плазмена ренинова активност (ПРА), Алдостерон).

Abstract

A high prevalence of hypertension (HTN) in acromegaly has been reported. Different mechanisms, which have not been yet clearly elucidated, participate in the pathogenesis of HTN in acromegalic patients.

Aim. To determine the prevalence of HTN in acromegalic patients; to investigate the relationship between the disease activity in acromegaly and HTN, as well as between the duration of acromegaly and HTN; to demonstrate the effect of attenuation of hypersomatotropism on HTN; to investigate the changes in some humoral factors, playing role in the pathogenesis of HTN (plasma renin activity (PRA), aldosterone).

Пациенти и методи. В проучването бяха включени 55 болни с Акромегалия, разделени в 3 групи (активна без лечение- 20, активна с лечение-15, неактивна- 20), сравнени с групи от 20 здрави контроли и 20 контроли с есенциална хипертония (ЕХ). Растежният хормон беше измерен чрез флуороимунологичен метод, а IGF-I- чрез имунорадиоиметричен метод. Алдостерон и ПРА бяха измерени по радиоимунологичен метод.

Резултати. Установихме висока честота на АХ при болни с Акромегалия- 63,64%. Не намерихме връзка между активността и давността на Акромегалията и АХ. Понижаването на хиперсоматотропизма не се асоциира с по- ниска честота на АХ. Намерихме зависимост между стойностите на IGF-I и систолното артериално налягане, но резултатите са трудно интерпретируеми. Установихме значимо по- високи нива на ПРА и по- ниско съотношение Алдостерон/ПРА при здравите контроли, сравнени с болните с Акромегалия. Установихме по- висока ПРА при болни с активна Акромегалия без лечение спрямо активна с лечение. Не се установиха други сигнификантни разлики по тези показатели между различните сравнявани групи. Това говори за относително активиране на ренин- ангиотензин-алдостероновата система (РААС) в условия на хиперволемиа при болните с Акромегалия.

Изводи. Акромегалията се асоциира с висока честота на АХ. Няма зависимост между активността и давността на Акромегалията и АХ. РААС е относително активирана спрямо хиперволемията и най- вероятно съучаства в патогенезата на АХ при Акромегалия.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: акромегалия, артериална хипертония, РААС

Patients and methods. The study population consisted of 55 patients with acromegaly, divided into 3 groups (untreated patients with active acromegaly- 20, treated patients with active acromegaly- 15, acromegalic patients in remission- 20), compared with 20 healthy controls and 20 controls with essential hypertension (ЕХ). Growth hormone was measured by fluorometric assay and serum IGF-I - by an immunoradiometric assay. PRA and aldosterone were measured by radioimmunoassay.

Results. A high prevalence of HTN was found in acromegalic patients- 63,64%. There was no statistically significant relationship between the activity or the duration of acromegaly and HTN. The attenuation of hypersomatotropism is not associated with a lower prevalence of HTN. We found a correlation between the levels of IGF-I and systolic blood pressure, but results are difficult to interpret. PRA was higher and the aldosterone -to renin-ratio was lower in healthy controls, compared to acromegalic patients. PRA was higher in untreated patients with active acromegaly compared with treated patients with active acromegaly. There were no other significant differences in the investigated parameters in the other groups. This is in favour of a relative activation of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) in relation to the state of hypervolemia in the patients with acromegaly.

Conclusions. Acromegaly is associated with a higher prevalence of HTN. There is no significant relationship between the activity or the duration of acromegaly and HTN. RAAS is relatively activated in relation to hypervolemia and possibly participates in the pathogenesis of HTN in acromegaly.

KEY WORDS: acromegaly, hypertension, RAAS

Акромегалията е клиничен синдром, гължащ се на повишена секреция на растежен хормон (РХ).

РХ осъществява своите ефекти в периферните тъкани по директни и индиректни механизми (23). Повечето от ефектите на РХ се реализират чрез инсулиноподобен растежен фактор тип 1 (IGF-I) (8). Акромегалията се характеризира с висока честота на сърдечно-съдови усложнения, които са главна причина за повишената смъртност при тези болни (4, 24). Счита се, че Акромегалията е второто ендокрино заболяване след захарния диабет, свързано с висок сърдечно-съдов риск. АХ е второто по честота усложнение (30-60% от пациентите) (2, 7, 14, 16, 17) след нарастването на сърдечната маса /кардиоомегалия/. При активна акромегалия не се установява корелационна зависимост между стойностите на артериалното налягане (АН) и нивата на РХ (1). Налице е зависимост с давността на заболяването. Това е характерно и за други промени в сърдечно-съдовата система при акромегалия. Овлажняването на хиперсоматотропизма, след адекватно лечение, довежда до понижаване на стойностите на АН (1).

В генезата на АХ при акромегалия участват много фактори. Ролята на някои от тях за повишеното АН е безспорна, докато на други не е така добре изяснена.

Такива са:

- увеличеният съдечен дебит, следствие на хиперкинетизъм на лява камера (15, 6);
- задебеляването на съдовата стена с ендотелна дисфункция (21) и последваща повишена съдова резистентност;
- повишението на нивата на катехоламините, както и променената циркадианна активност на симпатиковата нервна система (5);
- наличие на ендогенен дигоксиподобен фактор (22);
- хиперинсулинизъм, следствие на инсулинова резистентност (19).

Отдавна е известно, че при болни с акромегалия има повишена задръжка на Na⁺ и

Cl⁻ на нивото на дисталните бъбречни тубули (11). Тези ефекти на РХ и IGF-I се медируют от специфични рецептори в бъбреците (3). Други фактори, които допринасят за задръжката на соли и вода, са намалените нива на атриалния натриуретичен пептид (10, 12) и мозъчния натриуретичен пептид (12), като резултатите от различните проучвания не са еднозначни.

Данните за ролята на ренин-ангиотензин-алдостероновата система /РААС/ в патогенезата на хипертонията при акромегалия са противоречиви (10, 18). Прилагането на РХ в експериментални модели води до увеличаване на нивото на ренина (10, 18). Допуска се, че този ефект на РХ се дължи от една страна на хиперкатехоламинемията (5), а от друга е отговор на повишеното ниво на ангиотензиногена (19). Хиперренинемията е последвана от повишаване на ангиотензин II, който има директен натрийзадръжач ефект върху проксималните бъбречни тубули (9). Повечето автори не установяват повишаване на нивото на алдостерона. Нещо повече, при акромегалия се установява потискане на РААС (13), най-вероятно поради продължителна задръжка на натрий и вода с последваща хиперволемия.

Наличието на генен полиморфизъм на алелите отговорни за синтеза на компонентите на РААС се съчетава със значително по-висока честота на АХ при пациенти с акромегалия. Около 73% от пациентите с акромегалия и CYP11B2-344T/C генен полиморфизъм имат АХ (20). Това също говори за участие на РААС в патогенезата на АХ при акромегалия.

С настоящото проучване си поставихме следните задачи:

1. Да се установи честотата на АХ при болни с Акромегалия.
2. Да потвърди или отхвърли връзка между АХ и активността на Акромегалията.
3. Да докаже връзка между АХ и давността на Акромегалията.

4. Да покаже ефекта от понижаването на хиперсоматотропизма върху АН.

5. Да се установят промени в някои хуморални фактори, участващи в патогенезата на АХ (ГПА, Алдостерон).

Пациенти и методи

Пациенти

В проучването бяха включени 55 болни с Акромегалия, 18 мъже и 37 жени, на средна възраст 50,87г. \pm 11,99г., разделени в три групи:

- 20 болни с активна Акромегалия, без лечение, 8 мъже, 12 жени, на средна възраст 49,65г. \pm 12,17г.

- 15 болни с активна Акромегалия на фона на патогенетично лечение, без да са достигнати критериите за ремисия, 5 мъже и 10 жени, на средна възраст 50,53г. \pm 13,66г.

- 20 болни с неактивна Акромегалия, 5 мъже и 15 жени, на средна възраст 52,35г. \pm 10,92г.

Всяка от горните групи беше разделена на 2 подгрупи - с и без АХ.

Използваните критерии за активност на Акромегалията бяха: висок IGF-I за възрастта и пола, както и висок базален РХ над 4 mIU/l, непотискащ се под 2 mIU/l в хода на обременяване със 75 гр. глюкоза.

Бяха включени две групи контроли:

- 20 клинично здрави контроли - 10 мъже и 10 жени, средна възраст - 39,75г. \pm 10,42г.

- 20 контроли с есенциална хипертония - 8 мъже и 12 жени, средна възраст - 52,6г. \pm 5,39г.

При всички включени в проучването АН беше измервано с живачен манометър в седнало положение, трикратно през 5 минути (средна стойност). Беше провеждано и 24 часово мониториране на АН и пулсовата честота с апарат Oscar (Sun tech USA). Измерванията през деня (от 6 до 22ч) бяха извършвани през 15 минутни интервали, а през нощта (от 22 до 6 ч) - на 30 минутни интервали. Бяха регистрирани средно дневно, средно

нощно и средно генонощно АН. Като критерии за АХ приехме стойности на АН над 140/90мм Hg или при документирана АХ- нормални стойности на АН на фона на антихипертензивна терапия, неповлияваща РААС.

Лабораторни измервания

Биохимични показатели. Определянето на биохимични показатели (кръвна захар, калий, холестерол, триглицериди, креатинин) беше извършвано по стандартни методи в Клинична лаборатория на УСБАЛЕ.

Хормонални показатели. Хормоналните измервания бяха осъществени в сертифицирана и централизирана лаборатория (Клинична, стероидна и радиоимунологична лаборатория - УСБАЛЕ „Акад. Иван Пенчев“). Серумният РХ беше измерван чрез флуороимунологичен метод, базиран на директна-сандвич техника с две моноклонални антители, свързващи два различни епитопа на човешка молекула на РХ (Delfia). Бяха използвани реактиви на фирмата Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Wallac Oy, Finland с аналитична чувствителност < 0,03 mIU/l и точност- коефициент на грешка на вътрешния анализ (intraassay coefficient of variation- CV) 3,9% и interassay CV (коефициент на междуаналитична грешка)- 5,0%. Серумният IGF-I беше измерван чрез имунорадиомеричен метод след кисела алкохолна екстракция с реактиви на фирмата Immunotech, Beckman Coulter Co, France с аналитична чувствителност < 0,26 pmol/l и точност- intra- assay CV 6,3% и interassay CV 6,8%. Алдостерон (pmol/l) беше измерен по радиоимунологичен метод с реактиви на фирмата Immunotech, Beckman Coulter Company, Марсилия, Франция с аналитична чувствителност 16,6 pmol и точност- intra- и interassay CV 9% и 9,2 %, съответно. Плазмена ренинова активност (ГПА) (ng/ml/h) беше измерена чрез количествено определяне на ангиотензин I използвайки комерсиален радиоимунологичен реактив на фирмата DiaSorin S.p.A., Saluggia (VC), Italy.

Аналитичната чувствителност на този реактив беше 0,20 ng/ml; точност- intra-assay CV 5,4% и inter-assay CV 7,5%, съответно. Кръстосаната реактивност с ангиотензин II, хептапептид и хексапептид беше под 0,02%. В случаите при ПРА<0,3 ng/ml/h или недоловими нива бе приета ПРА= 0,3 ng/ml/h.

Статистически методи

Бяха сравнени клиничните, биохимичните и хормоналните показатели между трите подгрупи пациенти с акромегалия, както и между болни с акромегалия и контроли с есенциална хипертония (ЕХ), между болни с акромегалия и здрави контроли (ЗК) и между болни с и без АХ в групата с акромегалия. Наличието на статистически значима разлика при качествените показатели беше изследвано с помощта на Chi-square test и резултатите са представени като брой пациенти (процент). За да се оцени нормалността на разпределението на количествените данни, беше използван тестът на Kolmogorov-Smirnov. В анализа на показателите на трите подгрупи с акромегалия бяха използвани еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA) с прилагане на Post Hoc тестове за множествени сравнения при данни с нормално разпределение и непараметричен метод на Kruskal-Wallis при данни с неправилно разпределение. В анализа на показателите при сравнението между болни с акромегалия и контроли с ЕХ, между болни с акромегалия и здрави контроли и болни с акромегалия с и без АХ беше използван параметричен t-тест на Student при данни с нормално разпределение (резултатите са представени като средна \pm SD) и непараметричен тест на Mann-Whitney при данни с неправилно разпределение (резултатите са представени като медиана [interquartile range]). Беше изследвана взаимовръзката между IGF1 и систолно и диастолно АН, както и взаимовръзката между РХ и систолно и диастолно АН с помощта на корелационен анализ (коэффициенти на

линейна корелация- параметричен (Pearson) и непараметричен (Spearman), както и логистичен регресионен анализ. Статистическата обработка на резултатите беше осъществена с помощта на статистически пакет SPSS 16,0 при ниво на значимост $p < 0,05$.

Резултати

За период от 18 месеца в проучването бяха включени 55 болни с Акромегалия, разпределени в описаните по-горе групи, както и група от 20 клинично здрави контроли и контролна група от 20 болни с ЕХ. Демографските характеристики и средните стойности на основните изследвани показатели на лицата, включени в проучването, са представени в съответните таблици (табл. 1,2,3,4).

При болните с Акромегалия беше установена много висока честота на АХ-63,64%. Не бе установена статистически значима разлика в честотата на АХ при трите групи болни с Акромегалия (табл.1). Това отхвърля връзката между тежестта на АХ и активността на Акромегалията. Не бе установена разлика в честотата на АХ и при сравнението на групите с активна (А и В) спрямо групата с неактивна (С) Акромегалия (фиг.1). Понижаването на хиперсоматотропизма (сравняване на групите А и В) също не води до значимо понижаване на честотата на АХ. Бе установена корелация между нивата на IGF-I и систолното АН при болни с Акромегалия (фиг. 2), което говори за възможна връзка между тежестта на АХ и степента на хиперсоматотропизма, но липсата на зависимост на АН с нивата на РХ, както и трудната преценка на стойностите на АН, поради наличието на антихипертензивна терапия при част от болните, не дават възможност за категоричен извод.

В групата пациенти с Акромегалия сравнихме болните с и без артериална хипертония, като не се установи статистически значима разлика по отношение на ни-

вата на изследваните показатели, вкл. гавността на заболяването (табл. 2).

По отношение на ПРА и Алдостерона бяха сравнени:

– групите болни с Акромегалия (А, В и С), като не бе установена статистически значима разлика (табл.1), но в отделен анализ беше сравнена ПРА при пациенти с активна акромегалия без терапия (група А) и пациенти с активна акромегалия на фона на терапия (група В), като се установи статистически значимо по-висока ПРА при болни от група А ($p=0,031$).

– болните с Акромегалия с и без АХ, като не бе установена значима разлика (табл. 2).

– общата група болни с Акромегалия и контролна група с ЕХ, като също не бе установена значима разлика (табл. 3).

– общата група болни с Акромегалия и група здрави контроли, като бе намерена значима разлика по отношение на ПРА /повисока при контролната група/ и съотношението Алдостерон/ПРА /повисоко при групата с Акромегалия (Табл. 4).

Таблица 1. Сравнение между пациенти с активна акромегалия без терапия (група А), пациенти с активна акромегалия на терапия (група В) и пациенти с акромегалия в ремисия (група С). Показателите са представени като брой болни (пропорции), средна \pm SD или медиана [interquartile range].

Table 1. Comparison among untreated patients with active acromegaly (group A), treated patients with active acromegaly (group B) and acromegalic patients in remission (group C). Values are given as number of patients (proportions), mean \pm SD or median [interquartile range].

Показатели Variables	Група А, n= 20 Group A, n=20	Група В, n=15 Group B, n=15	Група С, n=20 Group C, n=20	p
Мъже, (%) Men, (%)	8 (40)	5 (33,3)	5 (25)	0,599
Средна възраст, г Mean age, y	49,65 \pm 12,17	50,53 \pm 13,66	52,35 \pm 10,92	0,776
Давност на АМ Duration of AM	15,6 \pm 6,84	19,87 \pm 4,73	18,65 \pm 7,58	0,148
АХ, %/АН, (%)	15 (75)	7 (46,7)	13 (65)	0,223
РХ, mIU/l GH, mIU/l	15,65 (6,47-35,4)	7,1 (5,02-46,7)	1,8 (0,46-2,17)	<0,001
IGF1, ng/ml	82,2 (46,97-95,3)	40,55 (20,92-86,47)	18,95 (14 -25,7)	<0,001
ПРА, ng/ml/h PRA, ng/ml/h	0,94 (0,37-1,66)	0,62 (0,1-0,75)	0,255 (0,1-1,31)	0,099
Алдостерон, pmol/l Aldosterone, pmol/l	262 (194-518,7)	231 (118-425)	207,5 (145-404)	0,343
Съотношение А/Р ARR	333 (212-700)	355 (140-2970)	639 (318-1650)	0,579

г-години, АМ-акромегалия, АХ-артериална хипертония, РХ- растежен хормон, ПРА- плазмена ренинова активност, съотношение А/Р- съотношение алдостерон/ПРА

y-years, AM-acromegaly, AH-arterial hypertension, GH-growth hormone, IGF 1- insulin growth factor 1, PRA- plasma renin activity, ARR- aldosterone-to-renin ratio

Таблица 2. Сравнение между пациенти с и без артериална хипертония (АХ) в групата акромегалия. Показателите са представени като брой болни (пропорции), средна \pm SD или медиана (interquartile range).
Table 2. Comparison between hypertensive (H) and non-hypertensive (NH) acromegalic patients. Values are given as number of patients (proportions), mean \pm SD or median (interquartile range).

Показатели Variables	С АХ; n=35 пациенти H; n=35 Patients	Без АХ; n=20 пациенти NH; n=20 Patients	p
Мъже, (%) Men, (%)	14 (40)	4 (20)	0,128
Средна възраст, г Mean age, y	52,68 \pm 11,53	47,7 \pm 12,43	0,14
Давност на акромегалията Duration of acromegaly	17,91 \pm 6,7	17,8 \pm 7,04	0,953
ПРА, ng/ml/h PRA, ng/ml/h	0,75 (0,1-1,31)	0,29 (0,1-1,05)	0,226
Алдостерон, pmol/l Aldosterone, pmol/l	255 (165-413)	201 (86-315)	0,167
Съотношение А/Р ARR	359 (279-840)	331 (124-2755)	0,813

m-мъже, г-години, ПРА- плазмена ренинова активност, съотношение А/Р- съотношение алдостерон/ПРА
y-years, PRA- plasma renin activity, ARR- aldosterone-to-renin ratio

Обсъждане

Проучването показва много висока честота на АХ, при пациентите с Акромегалия – 63,64%. Това потвърждава становището, че Акромегалията по различни механизми води до АХ и че е второто по честота сърдечно-съдово усложнение, след кардиомиопатията (7, 14, 16, 17). За голямата честота на АХ, допринася и високата средна възраст на болните с Акромегалия – 50,87г. \pm 11,99г.

Бе отхвърлена връзка между активността на Акромегалията и АХ (като честота и тежест). Явно, веднъж отключени механизмите, водещи до АХ, не изчезват след овладяването на хиперсоматотропизма или се включват допълнителни фактори, стабилизиращи хипертонията. Възможно е за този ефект да допринася дългият

период от началото на заболяването до диагностицирането му (около 10 години) и до прилагането на адекватно лечение.

Не се намери връзка между АХ и давността на Акромегалията, въпреки че в друго проучване установихме такава (1).

Понижаването на хиперсоматотропизма не се асоциира с по-ниска честота на АХ. Не се установи зависимост между стойностите на РХ и тежестта на АХ. Бе намерена статистически значима корелация между систолното артериално налягане и нивата на IGF-I, но интерпретация на тази зависимост е трудна, поради факта че повечето пациенти с АХ са на фона на различна антихипертензивна терапия и тези отклонения в систолното артериално налягане могат да се дължат и на различията в антихипертензивната терапия.

Таблица 3. Сравнение между пациенти с акромегалия и контроли с есенциална хипертония (ЕХ). Показателите са представени като брой болни (пропорции), средна \pm SD или медиана [interquartile range].

Table 3. Comparison between patients with acromegaly and controls with essential hypertension (EH). Values are given as number of patients (proportions), mean \pm SD or median [interquartile range].

Показател Variables	Акромегалия; n=55 Acromegaly, n=55	ЕХ; n=20 EH; n=20	p
Мъже, (%) Men, (%)	18 (32,7)	8 (40)	0,558
Средна възраст, г Mean age, y	50,87 \pm 11,99	52,6 \pm 5,39	0,395
Систолично АН, mmHg Systolic BP, mmHg	128,73 \pm 17,38	143,5 \pm 22,72	0,004
Диастолично АН, mmHg Diastolic BP, mmHg	81,25 \pm 9,93	90,75 \pm 9,36	<0,001
Калий, mmol/l Serum Potassium, mmol/l	4,76 \pm 0,37	4,69 \pm 0,41	0,55
Кръвна захар, mmol/l Fasting blood glucose, mmol/l	5,59 \pm 1,44	6,13 \pm 1,71	0,187
Общ холестерол, mmol/l Total cholesterol, mmol/l	5,38 \pm 1,1	5,54 \pm 1,1	0,58
Триглицериди, mmol/l Triglycerides, mmol/l	1,33 \pm 0,82	2,03 \pm 1,21	0,007
Креатинин, μmol/l Creatinine, μmol/l	60,07 \pm 17,38	63,15 \pm 10,22	0,461
ПРА, ng/ml/h PRA, ng/ml/h	0,62 (0,1-1,26)	0,36 (0,3-0,79)	0,833
Алдостерон, pmol/l Aldosterone, pmol/l	232 (148-405)	239 (125-382)	0,806
Съотношение А/Р ARR	361 (191-1517)	415 (257-644)	0,9

г-години, АН- артериално налягане, ПРА- плазмена ренинова активност, съотношение А/Р- съотношение алдостерон/ПРА
y-years, BP- blood pressure; PRA- plasma renin activity, ARR- aldosterone-to-renin ratio

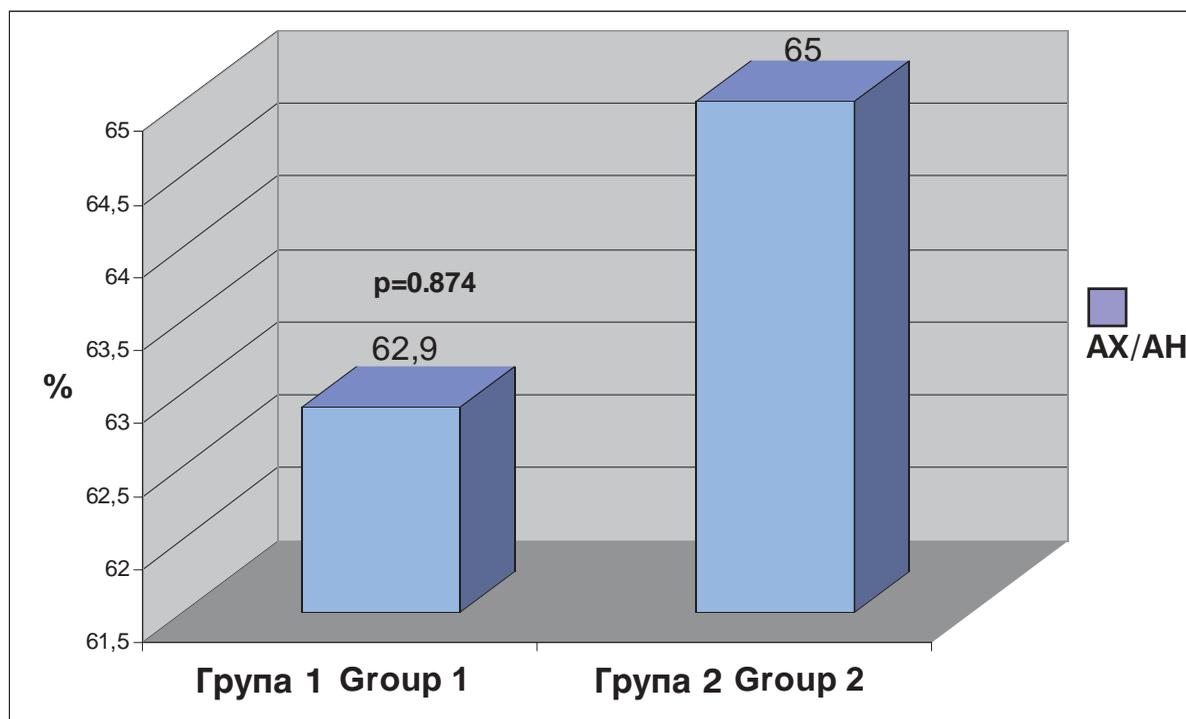
Таблица 4. Сравнение между пациенти с акромегалия и здрави контроли (ЗК). Показателите са представени като брой болни (пропорции), средна \pm SD или медиана [interquartile range].

Table 4. Comparison between patients with acromegaly and healthy subjects (HS). Values are given as number of patients (proportions), mean \pm SD or median [interquartile range].

Показатели Variables	Акромегалия n=55	ЗК n=20	p
Мъже, (%) Men, (%)	18 (32,7)	10 (50)	0,171
Средна възраст, г Mean age, y	50,87 \pm 11,99	39,75 \pm 10,42	<0,001
ПРА, ng/ml/h PRA, ng/ml/h	0,62 (0,1-1,26)	1,02 (0,59-1,52)	0,012
Алдостерон, pmol/l Aldosterone, pmol/l	232 (148-405)	169 (105-293)	0,114
Съотношение А/Р ARR	361 (191-1517)	215 (84-322)	0,002

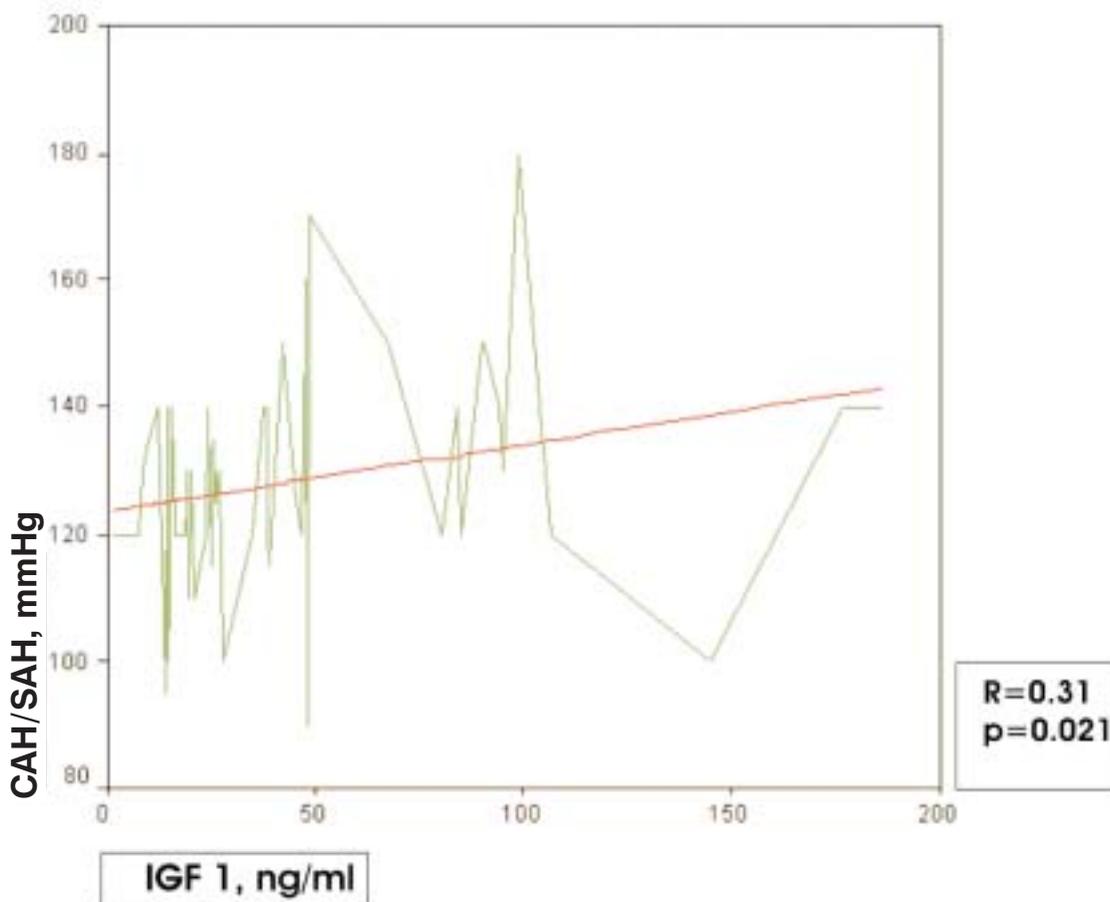
г-години, ПРА- плазмена ренинова активност, съотношение А/Р- съотношение алдостерон/ПРА

y-years, BP- blood pressure; PRA- plasma renin activity, ARR- aldosterone-to-renin ratio



Фигура 1. Честота на артериалната хипертония (АХ) при пациенти с активна акромегалия (група 1) и акромегалия в ремисия (група 2)

Figure 1. Prevalence of arterial hypertension (AH) in patients with active acromegaly (group 1) and acromegalic patients in remission (group 2).



Фигура 2. Изследване на корелация между нивата на IGF 1 и систолно артериално налягане (САН) сред пациенти с акромегалия.

Figure 2. Investigation of the relationship between the levels of IGF 1 and systolic blood pressure (SAH) in patients with acromegaly.

Нивото на ренина при акромегалия е резултантна на две противоположни тенденции. Задръжката на Na^+ и вода води до потискане на ренина. Тя е следствие на: директния ефект на P^{X} и IGF-I върху дисталните бъбречни тубули (3, 11); намалението на атриалния и мозъчен натриуретични пептиди (10, 12); както и ефекта на ангиотензин II върху проксималните тубули (9). От друга страна, хиперкатехоламинемията и увеличеният ангиотензиноген водят до повишаване на ренина (5, 19).

Проучването установи сигнификантно по-ниска ПРА, при болните с Акромегалия, спрямо здравите контроли, което най-вероятно е следствие на хиперволемията,

причинена по описаните по-горе механизми.

Не бе установена сигнификантна разлика в ПРА при болните с Акромегалия с и без АХ. Не бе установена разлика и при сравняването на ПРА при болните с Акромегалия и тези с ЕХ. Тъй като хиперволемията е безспорен факт, при Акромегалия, бихме очаквали потискане на ПРА при тези болни, особено в съчетание с АХ. Липсата на такова значимо потискане, говори за относително по-високи ренинови нива спрямо хиперволемията.

Намерихме значимо по-висока ПРА, при болните с Акромегалия без лечение спрямо тези с лечение. Това потвърждава тезата

за активиране на ренина от хиперсоматотропизма, извън общата тенденция за потискане на ренина от хиперволемията.

Най-вероятно при пациентите с акромегалия и артериална хипертония тенденцията за потискане на ренина да е по-слабо изразена, като това се явява един от патогенетичните механизми на хипертонията при акромегалия.

Нивото на алдостерона не показва сигнификантна разлика между отделните групи. При групите с акромегалия, обаче, в условия на хиперволемия и тенденция към понисък ренин (особено сравнени със здравите контроли), алдостеронът може да се интерпретира като относително висок-констелация близка до тази с първичен алдостеронизъм. В потвърждение на тази теза са и сигнификантно по-високите стойности на съотношението Алдостерон/ПРА при болните с Акромегалия, сравнени със здравите контроли. Много е вероятно в генезата на артериалната хипертония при Акромегалия да съучаства стимулация на алдостероновата синтеза от хиперсоматотропизма по неизяснени механизми.

Въз основа на горните изводи, бихме могли да заключим, че Акромегалията се асоциира с висока честота на АХ. В генезата на АХ при Акромегалия съучаства и относително активирана РААС. Необходими са допълнителни проучвания върху ролята на РААС, както и на групи хуморални фактори, които могат да участват в патогенезата на АХ при Акромегалия. От друга страна събраният доказателствен материал дава основание за прилагане на антихипертензивни медикаменти блокиращи РААС при болни с акромегалия и артериална хипертония – АСЕ-инхибитори, сартани и бета-блокери (последните биха повлияли благоприятно и хиперкатехоламинемията).

***Проучването е осъществено с подкрепата на Медицински Университет-София, по проект № 65, съгласно договор № 52/2007г. на тема:Честота на артериалната хипертония при акромегалия и хуморални фактори, които я определят.**

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Начев Е, Р Шигарминова, С Захариева. Артериална хипертония при акромегалия.- *собствен опит*. Мединфо, 2005, 22.
2. Орбецова М. Нарушения във въглехидратната и липидната обмяна при хипоталамо-хипофизарни заболявания с автономна хормонална свръхсекреция-акромегалия, болест на Cushing и пролактиноми. *Автореферат*, София, 2002.
3. Chin E, J Zhou, CA Bondy. Renal growth hormone receptor gene expression: relationship to renal insulin-like growth factor system. *Endocrinology* 1992; 131:3061-3066.
4. Courville C, VR Mason. The heart in acromegaly. *Arch Intern Med* 1938; 61:704-713.
5. DiBona GF, U Kopp. Neural control of renal function. *Physiol Rev* 1997; 77:75-197.
6. Fazio S, A Cittadini, A Cuocolo, B Merola, D Sabatini, E Nicolai, A Colao, B Biondi, G Lombardi, L Saccl. Impaired cardiac performance is a distinct feature of uncomplicated acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:441-446.
7. Fazio S, A Cittadini, D Sabatini, B Merola, AM Colao, B Biondi, G Lombardi, L Sacci. Evidence for biventricular involvement in acromegaly: a Doppler echocardiographic study. *Eur Heart J* 1993 14:26-33.
8. Foster J, CB Rich, JR Florini. Insulin-like growth factor I, somatomedin C, induces the synthesis of tropoelastin in aortic tissue. *Collagen and Related Research* 1987; 7:161-169.
9. Harris PJ, LG Navar. Tubular transport responses to angiotensin. *Am J Physiol* 1985; 248:F621-F630.
10. Hoffman DM, L Crampton, C Sernia, TV Nguyen, KK Ho. Short term growth hormone (GH) treatment of GH-deficient adults increases body sodium and extracellular water, but not blood pressure. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:1123-1128.
11. Ikkos D, R Luft, B Sjo?gren. Body water and sodium in patients with acromegaly. *J Clin Invest* 1954; 33:989-994.
12. Johannsson G, YB Sverrisdo'ttir, L Ellegarrd, PA Lundberg, H Herlitz. GH Increases Extracellular Volume by Stimulating Sodium Reabsorption in the Distal Nephron and Preventing Pressure Natriuresis. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(4):1743-1749.
13. Karlberg BE, AM Ottosson. Acromegaly and hypertension: role of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1982; 100:581-587.

14. Lie JT, SJ Grossman. Pathology of the heart in acromegaly: anatomic findings in 27 autopsied patients. *Am Heart J* 1980; 100:41-52.

15. Mayoux E, R Ventura-Clapier, J Timsit, C Behar-Cohen Hoffmann, J-J Mercadier. Mechanical properties of rat cardiac skinned fibers are altered by chronic growth hormone hypersecretion. *Circ Res* 1993; 72 :57-64.

16. McGuffin Jr WL, BM Sherman, J Roth, P Gorden, CR Kahn, WC Roberts, PL Frommer. Acromegaly and cardiovascular disorders. A prospective study. *Ann Intern Med* 1974; 81:11-18.

17. Minniti G, C Moroni, ML Jaffrain-Rea, F Bondanini, A Gulino, R Cassone, G Tamburrano. Prevalence of hypertension in acromegalic patients: clinical measurement versus 24-hour ambulatory blood pressure monitoring. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998; 48(2):149-52.

18. Müller J, N Müller, E Frandsen, T Wolthers, JOL Jørgensen, JS Christiansen. Blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system prevents growth hormone-induced fluid retention in humans. *Am J Physiol* 1997; 272(5 Pt 1):E803- E808.

19. Msller N, OSchmitz, JOL Jorgensen, J Astrup, JF Bak, SE Christensen, KGMM Alberti, J Weeke Basal- and insulin-stimulated substrate metabolism in patients with active acromegaly before and after adenectomy. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74:1012- 1019

20. Mulatero P, F Veglio, P Maffei, M Bondanelli, S Bovio, F Daffara, G Leotta, A Angeli, C Calvo, C Martini, E Uberti, M Terzolo. CYP 11B2-344T/C gene polymorphism and blood pressure in patients with acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(12):5008-12

21. Rizzoni D, E Porteri, A Giustina, C De Ciuceis, I Sleiman, GEM Boari, M Castellano, ML Muiesan, S Bonadonna, A Burattin, B Cerudelli, E Agabiti-Rosei. Acromegalic patients show the presence of hypertrophic remodeling of subcutaneous small resistance arteries. *Hypertension*, 2004; 43:562-565.

22. Soszynski P, J Slowinska-Szrednicka, S Zgliczynski. Increased activity of digoxin-like substance in low renin hypertension in acromegaly. *Clin Exp Hypertens A* 1990; 12(4):533-49

23. Underwood LE, JJ Van Wyk. Normal and aberrant growth. 1992; In: Wilson JD, Foster DW (eds) Textbook of Endocrinology, ed 8. WB Saunders Co, Philadelphia, pp 1079-1138.

24. Wright AD, DM Hill, C Lowy, TR Fraser 1970 *Mortality in acromegaly*. *Q J Med* 39:1-18.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Д-р Емил Начев

Клиничен център – УМБАЛ по Ендокринология
ул. Здраве №2, София 1463
Тел: 8956040, E-mail: enatchev@abv.bg

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Emil Natchev MD

Clinical Center of Endocrinology
2, Zdrave Str, 1463 Sofia, Bulgaria
Tel: 8956040, E-mail: enatchev@abv.bg

Първична фамилна хипомагнезиемия – диференциална диагноза и проследяване на 2 годишен пациент

Виолета Йотова, Веселин Бояджиев, Мария Желева, Антоанета Иванова
Катедра по педиатрия и медицинска генетика, Медицински университет – Варна

Primary Familial Hypomagnesaemia – Differential Diagnosis and Follow-up of a 2 Years old Male Patient

Violeta Iotova, Veselin Boyadzhiev, Maria Zheleva, Antoaneta Ivanova
Dept. of Pediatrics and Medical Genetics, Varna Medical University

Резюме

Представяме рядък случай на кърмаче с късни хипокалциемични гърчове, вследствие на рядкото заболяване първична (фамилна) хипомагнезиемия с вторична хипокалциемия. Описани са дебютът и клиничният ход на заболяването, предприетият диагностичен подход и терапевтичното поведение. Направен е подробен обзор на възможните придобити и вродени нарушения на магнезиевата обмяна, самостоятелни и свързани с други нозологични единици, като е поставен акцент на съвременните разбирания и познания за тези редки заболявания.

Abstract

An infant patient with late hypocalcaemic seizures due to the rare disease primary (familial) hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia, is presented. The start and the clinical course of the disease, the diagnostic approach and therapeutic conduct are described. A thorough review of the possible congenital and acquired derangements of the magnesium metabolism, alone or in connection with other entities, is made. The modern understanding and knowledge about these rare illnesses is accentuated.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: първична хипомагнезиемия, вторична хипокалциемия, диагноза, проследяване

KEY WORDS: primary hypomagnesaemia, secondary hypocalcaemia, diagnosis, follow-up

Нарушенията в калциево-фосфорната обмяна са чести в неонаталния период и създават диагностични и терапевтични проблеми с необходимост от спешно разрешаване. Целта на описания по-долу за първи път у нас много рядък клиничен случай е да се проследи естественото развитие и хода на диагностичните търсения, при възможно най-широка диференциална диагноза и насоки за адекватно лечение.

Клиничен случай

Д.С.А. е първо дете от нормална бременност на млади родители без кръвно родство. Раждането настъпва 40 дни преди термина поради изтекли околоплодни води. Определена е морфологична зрялост около 36 г.с. при тегло 3060 g и ръст 48 cm. Поради рентгенологични и клинични данни за хиалинно-мембранна болест е поставено на механична вентилация, проведена е антибиотична и сърфактант-терапия.

На 18 дневна възраст момчето е изписано в дома. Няколко дни по-късно родителите забелязват потрепвания на крайниците, устните, неестествено „въртене“ на очите. Въпреки отсъствието на други симптоми (афебрилен, с добър апетит, без гагене, повръщане), наблюдаваните потрепвания зачестиха, което става повод за нова хоспитализация. Детето е прието в Интензивно детско отделение, където при прегледа не се установяват други неврологични симптоми или данни за вродена инфекция, а общото състояние и клиничният статус не показват отклонения. Първоначалните лабораторни резултати изключват **хипогликемия** като причина за гърчовете, подозирана поради раждането на

детето с големи за гестационната възраст размери и възможната връзка с тип 2 захарен диабет. Всички биохимични изследвания (вкл. албумин), КАС и ПКК са в референтните граници. Единственото отклонение е силно заниженото ниво на общия серумен калций – 0,69...0,72 mmol/l (норма 2,12 - 2,60 mmol/l), при нормални фосфор, натрий, хлор и алкална фосфатаза. Както първоначалните, така и всички последвали периодични измервания на серумен албумин и КАС не показаха отклонения, поради което нямахме причини за отделно проследяване нивото на йонизирания Ca.

За уточняване на неврологичния статус се осъществиха още ЕЕГ и КТ на главен мозък, които изключиха подлежащо органично увреждане на ц.н.с. Като причина за наблюдаваната гърчова симптоматика се прие наличната **хипокалциемия**. Започна се лечение с парентерален Ca (Ca глюконат) и витамин D р.о. Успоредно с това се установи наличието на изразена **хипомагнезиемия** със серумни нива на Mg 0,22 mmol/l (н. 0,66-1,03 mmol/l). Тези резултати наложиха добавянето на парентерален магнезиев препарат към терапията (Кормагнезин).

В следващите дни до изписването наблюдаваните до момента дифузни, предимно клонични потрепвания и гърчове намаляха по интензитет и честота и постепенно изчезнаха. Така след 10 дневен престой в клиниката, въпреки че не бе достигната нормокалциемия, детето бе дехоспитализирано, а лечението в дома продължи с перорални препарати по схема – Калциев глюконат, Кормагнезин и Вигантол (Табл. 1). Една седмица по-късно детето постъпи отново по повод на внезапно влошаване с то-

нично-клоничен гърч, със спиране на дишането и пяна на уста, продължил около 1 минута (Фиг. 1). Състоянието се овладя с ново парентерално приложение на калциеви препарати, успоредно с повишаване дозата на пероралните медикаменти. Фенобарбитал 2x10мг бе добавен само в следващите 10 дни.

Известно е, че подобни форми на хипокалциемии могат да се развият по-често при доносени, едри бебета, хранени предимно с богати на фосфор млека. Такива рискови фактори у нашия пациент обаче липсваха. Освен това, включването на калциеви препарати към терапията не бе последвано от очакваното подобрене – неврологичните прояви персистираха, а нивото на калций си остана ниско. Всичко това наложи разширение в диференциално-диагностичните търсения и провеждането на допълнителни изследвания. Изключи се **Псевдохипопаратиреодизъм тип IA**, подозиран поради фенотипно съмнителна леля по майчина линия с добавено умствено изостаиване. Освен че при нея не бяха дока-

зани отклонения, паратхормонът при нашия пациент бе с долно-гранични стойности – PTH 18,33 pg/ml при норма 15-65 pg/ml при все още ниска стойност на Ca по време на изследването, което отхвърли категорично наличието на тъканна резистентност спрямо действието на хормона.

До навършване на 5 месечна възраст не бяха наблюдавани нови гърчови епизоди. Тогава бяха достигнати и първите нормални калциеви нива – 2,32 mmol/l. Стойностите на магнезия също се повишиха, но останаха далеч под долната граница – 0,29...0,33 mmol/l. Нормализиране на Mg нива настъпи за първи път на 1,5 год. възраст. Нервно-психичното и физическо развитие на детето е отлично, боледуванията са обичайните за тази възраст и са без усложнения.

Описаното протичане на заболяването и всички проведени до този етап изследвания говореха най-вече в полза на първична хипомагнезиемия с вторична хипокалциемия. Направената от нас обширна литературна справка разкри голяма и хете-



Фигура 1. Д.С.А. на 40 дневна възраст при поредна хоспитализация.

Figure 1. D.S.A. during hospital admission at 40 post-natal days.

рогенна група от различни и понастоящем добре проучени и дефинирани състояния свързани с нарушения в йонната и в частност магнезиевата и калциева обмяна, чийто обзор излагаме по-долу.

Обсъждане и диференциална диагноза

Магнезият е изключително разпространен в природата – той е в центъра на молекулата на хлорофила и придава зеления цвят на растенията. Голямото значение на магнезия и участието му в редица биохимични процеси е доказано от десетилетия. След Na^+ , K^+ и Ca^{2+} , магнезият е четвъртият най-разпространен катион в тялото. Като активатор на над 300 ензима, той участва в протеиновата синтеза, стабилитета на нуклеиновите киселини, нервно-мускулното възбуждение и оксидативното фосфорилиране. В организма около 99% е разпределен интрацелуларно (предимно в костната система) и само около 1% формира серумното ниво. Само половината от него е в свободна и биохимично активна форма. Доставя се с храната (абсорбция 30-70%), като най-високо съдържание е установено в слънчогледовите семена, пшенични зародиши, ядки – кашу, фъстъци и др., спанак, броколи, боб, банани, риба и др. морски продукти. Абсорбцията се осъществява основно в тънките черва, посредством активен трансцелуларен и пасивен парацелуларен механизъм (10). Дневните нужди от Mg са различни през отделните възрастови периоди – най-високи са в кърмаческа възраст, през пубертета и по време на бременност. Елиминира се през бъбреците, но уринарните загуби не надвишават 3 до 5% от филтрираното количество, което представлява около 100 mg дневно в зряла възраст. Реабсорбцията на магнезия се осъществява основно в дебелото възходящо рамо на бримката на Хенле (60-70%) и в по-малка степен в проксималните бъбречни тубули (15-20%) и в дисталните събирателни каналчета (5-10%), (5, 10).

Сред състоянията, асоциирани с придобит Mg дефицит, на първо място стоят сърдечно-съдовите заболявания (16), хроничният алкохолизъм, захарният диабет, малабсорбционните синдроми, продължителната употреба или злоупотреба с диуретици и лаксативи, бременността (14). Вродените нарушения, характеризирани се с хипомагнезиемия, оформят 2 големи етиологични групи – хипомагнезиемии, свързани с нарушения в бъбречната йонна регулация и хипомагнезиемии вследствие на първични интестинални увреждания.

Най-широко известната и описана първа (1960 г.) тубулопатия е **синдромът на Бартер (СБ)**. Той се характеризира с хипокалиемия, солева загуба, метаболитна алкалоза и се дължи на дефект в транспорта на хлорни йони с последващ вторичен хипералдостеронизъм и хиперплазия на ЮГА. Диагнозата се поставя обикновено след 2 годишна възраст. Синдромът притежава вариабилна клинична картина – от леки повръщания до тежка дехидратация и може да имитира много от присъщите за възрастта заболявания. Характерна е липсата на хиперкалциурия и нефрокалциноза. Обикновено в около половината от пациентите е налице лекастепенна хипомагнезиемия (18) поради съпътстващи нарушения в реабсорбцията на магнезия и повишените му уринарни загуби.

Освен класическия по-лек вариант на синдрома са известни още 2 негови подформи, дължащи се на мутации, засягащи други компоненти от транспортните йонни системи: **антенатален СБ (АСБ)**, започващ с масивна полиурия още *in utero* и полихидрамнион, с бързо развитие на нефрокалциноза, прогресираща и трудно овладяема дехидратация, и висока перинатална смъртност (без хипомагнезиемия), и **трета подформа, подобна на АСБ**. Тя се причинява от мутации в гена, кодиращ β -субединицата на бъбречните хлоридни канали – белтъчна структура, наречена Barttin. Същата се открива и в *stria vascularis* на маргиначните клетки на вътрешното ухо, по-

ради което засегнатите от синдрома страдат и от сензоневрална глухота.

Друга тубулопатия, асоциирана с хипомагнезиемия, е **синдромът на Гителман** – едно относително благоприятно по протичане състояние, дълго време останало неразпознато поради голямото си клинично сходство със СБ. Лабораторно се наблюдават електролитни промени, характерни за приложение на тиазидни диуретици – хипокалиемия, метаболитна алкалоза, хипокалциурия. Концентрационната способност на бъбреците е запазена. Клиниката се владее от епизоди на мускулна слабост и тетании (17). Хипомагнезиемията е умерено изразена и се среща при около 1/3 от пациентите (18), но диагнозата се поставя най-често в и след юношеска възраст.

Изолираната доминантна хипомагнезиемия е описана през 1987 г. от Seven et al. (6), които наблюдават 2 датски фамилии със синдрома. Болните се характеризират с генерализирани гърчове, хипокалциемия и хипомагнезиемия. Заболяването се дължи на мутации в FXVD2 гена, водещи до нарушение на активния Mg транспорт в дисталните събирателни каналчета на бъбрека и повишени уринарни загуби (2, 5). В някои близкородствени бракове е описана и изолирана рецесивна хипомагнезиемия, също дължаща се на повишени уринарни загуби, но с все още неустановен молекулярен дефект (8, 10).

Фамилната хипомагнезиемия с хиперкалциурия и нефрокалциноза /FHHNC/ е друго тежко разстройство в магнезиевата и калциева обмяна, водещо до ранна двустранна нефрокалциноза и прогресивна бъбречна недостатъчност. Клиниката се разгръща след кърмаческа възраст и включва рецидивиращи инфекции на пикочните пътища, полиурия/полидипсия, изостенурия, нефролитиаза, тетания, гърчове, коремни болки, повръщания, изоставане във физическото развитие. У нас е описано от Буева и съавт. (1). През 1999 г. Simon et al. (20) клонират гена CLDN16, чиято експресия е най-висока в медуларните и кортикалните сегменти на

бримката на Henle. Генният продукт – Paracellin-1 (Claudin-16), член на т.нар. claudin белтъчна фамилия, участва във формирането на Ca^{2+} и Mg^{2+} парацелуларни пътища на реабсорбция (11, 20). Мутации в гена водят до ексцесивни уринарни загуби на Ca^{2+} и Mg^{2+} , което е в основата на тежката клинична картина (10, 18).

Друга интересна и хетерогенна група нарушения в транспорта на дивалентните катиони се дължи на различни активизиращи или инактивизиращи мутации на Ca^{2+} рецептор (Ca-sensing receptor, CASR). Той е открит през 1993 г. от Brown и Hebert (4) и представлява G-протеин-свързан рецептор, локализиран основно в РТН-секретиращите клетки на паращитовидните жлези и по базолатералната повърхност на гелелата възходяща част на бримката на Henle (TAL) и дисталните събирателни каналчета на бъбрека. CASR е с доказана ключова роля в поддържането на Ca хомеостаза чрез регулиране на РТН-секрецията и бъбречната калциева и магнезиева реабсорбция. При инактивизиращи мутации се развиват два синдрома:

➤ **Фамилна хипокалциурична хиперкалциемия (у хетерозиготи);**

➤ **Тежък неонатален хиперпаратиреоидизъм (у хомозиготи).**

Активизиращите мутации на рецептора водят от своя страна до:

➤ **Автозомно доминантна хипокалциемия** – състояние, характеризиращо се с хипокалциемия, хиперкалциурия, полиурия, а в около 50% от случаите и с хипомагнезиемия. Важна особеност в терапията на болните е, че приложението на витамин D и калциеви препарати не само е неефективно, но води до засилване на калциурията и потенцира развитието на нефрокалциноза и бъбречна недостатъчност.

➤ При възрастни през последните години са описани няколко пациента, които в хода на заболяването развиват **Bartter-like солгубеци нефрити**. Мутационният анализ при тези болни установява, че всички те са носители на изключително активни мутации

на CASR, поради което с течение на времето вероятно настъпва и вторична инхибиция на NaCl реабсорбция в TAL (18, 21).

Освен изброените „бъбречни“ причини за развитие на хипомагнезиемия още през 60-те години на миналия век се появяват и първите съобщения за случаи на хипокалциемия с хипомагнезиемия у кърмачета, при които не се установяват нито повишени ренални загуби на дивалентни катиони, нито други отклонения в бъбречната функция като цяло. Постепенно се оформя нова нозологична единица, известна като:

➤ **Първична (фамилна) хипомагнезиемия с вторична хипокалциемия** (ПХВХ, OMIM # 602014) – състояние, дължащо се на изолирана генетично детерминирана невъзможност за адекватна интестинална абсорбция на магнезия. За разлика от многото други известни малабсорбционни състояния (възпалителни дебелочревни заболявания, цьолиакия, кистична фиброза и др.), при ПХВХ не се установяват нарушения в усвояването на хранителните вещества и други микроелементи. Значителното преобладаване на мъжкия пол сред засегнатите индивиди първоначално заблуждава за евентуален X-свързан механизъм на унаследяване. През последното десетилетие обаче, се натрупват все повече съобщения за наблюдавани случаи и сред женския пол, като съотношението постепенно се променя от 10/1 в полза на момчетата до 1,8/1 според скорошни данни (12).

Освен това са публикувани и някои интригуващи съчетания с други известни заболявания, напр. описаните от Minty и Hall (13) през 1993 г. двама братя с акромегалична дисплазия тип Maroteaux (AMDM; OMIM#602875) и ПХВХ. Няколко години по-късно Kant et al. картират AMDM гена в периферичния район на 9 хромозома – 9p13-q12 (7). Успоредно с това R. Walder и H. Shalev от Университета в Айова доказват, че ПХВХ се дължи на генетичен дефект в същата хромозома – 9q12, където е разположен генът TRPM6, кодиращ йонен канал от transient receptor potential (TRP) фамилията

(22). Посредством RT-PCR и in situ хибридазация се намира най-висока експресия на TRPM6 в тънките черва и по-слаба в бъбречните тубули. Въпреки адекватния хранителен внос нарушената Mg резорбция у засегнатите индивиди води още в първите месеци след раждането до тежка хипомагнезиемия и вторична хипокалциемия.

Патогенетичните механизми на съпътстващата хипокалциемия на този етап са спорни. Съществуват няколко хипотези – напр. неадекватна PTH синтеза и/или секреция от паращитовидните жлези, за каквато има данни при нашия пациент, органична нечувствителност към PTH, нарушена синтеза на 25-(OH)²-vit. D, нарушено костно калциево освобождаване по PTH-независими механизми и др. (1а, 22).

Първите симптоми се наблюдават най-рано в края на неонаталния период, обикновено около 3 месечна възраст и най-често са представени като фокални потрепвания, миоклонии, усилени сухожилни рефлексии, генерализирани конвулсии и гърчове (19). По-рядко се описват карпопедални спазми, стридор или общо неспокойствие. Появата на подобна неврологична симптоматика в неонаталния и кърмаческия период изисква бързото отгиференциране на редица централно-мозъчни заболявания – малформации, вътречерепни инфекции, кръвоизливи, хипоксемично-исхемична енцефалопатия и техните трайни последици, най-вече детска церебрална парализа и епилепсия. От метаболитните етиологични фактори следва веднага да се изключат най-честите – хипогликемията и хипокалциемични отклонения, а в последствие евентуално и други обменни заболявания. След установяването на ниски серумни нива на калций, ако опитите за корекция на хипокалциемията с парентерални Ca препарати останат безуспешни, задължително се налага определянето и на серумните магнезиеви нива. За поставяне на диагнозата ПХВХ са необходими пълни изследвания на бъбречната функция и изключване на малабсорбция.

Таблица 1. Динамика в нивата на проследените електролити при дълготрайното наблюдение на пациента ни.

Table 1. Dynamics in the levels of the investigated electrolytes during the long-term follow-up of our patient.

	сер. Са/ serum Ca (2,12-2,60 mmol/l)	сер. Mg/ serum Mg (0,66-1,03 mmol/l)	сер. PO4/ serum PO4 (1,29-2,26 mmol/l)	ур. Са/ urine Ca (2,50-4,36 mEq/24h)	ур. Mg/ urine Mg (2,50-8,50 mEq/24h)	ур. PO4/ urine PO4 (11-32 mEq/24h)	АФ/AP (serum) (<390 IU/ml)
39 дни/ days	0,69	0,22	2,23	2,81	-	0,03	555
52 дни/ days	1,72	0,29	2,69	-	-	-	627
5 мес./ mo.	2,32	0,33	2,30	1,03	0,16	21,86	624
7 мес./ mo.	1,70	0,37	1,53	-	-	-	650
8 мес./ mo.	2,24	0,32	1,83	0,34	0,19	39,70	309
13 мес./ mo.	2,53	0,54	1,59	0,62	0,39	14,08	292
18 мес./ mo.	2,40	0,60	1,80	-	-	-	932
24 мес. /mo.	2,43	0,67	1,87	1.20	0,41	15,74	406

При наблюдаваното от нас дете клиничната изява и еволюцията на заболяването имаха типичен ход (Табл. 1). Липсваха данни за малабсорбция, което се потвърди с провеждането на D-ксилозен тест, не бяха установени и отклонения в бъбречната функция – стойностите на уреята и креатинина останаха трайно в референтни граници. Многократните ехографски изследвания на мозък и бъбреци не показаха отклонения, като нефрокалциноза е търсена целенасочено.

Поради малката възраст, електролитните уринарни нива бяха определяни чрез метода на „spot urine“ (единична порция урина), като стойностите се преизчисляваха за 24 часова диуреза. От многократ-

но проведените измервания се получиха данни за персистираща хипомагнезурия и хипокалциурия, като последната непрекъснато се подобряваше, успоредно с покачващите се серумни нива (Табл. 2).

Отделно до края на 1-та година се контролираше отношението Са/креатинин, което остана под 1,0. Минималните електролитни загуби с урината бяха очаквана находка като резултат от адаптираната към ниските серумни нива бъбречна йонна екскреция, играеща в случая ролята на регулиращ компенсаторен механизъм. Нито веднъж не се установи отклонение в нивата на фосфора както в серума, така и в урината.

В заключение, представеният пациент е първият с това заболяване, публикуван у

Таблица 2. Диференциална диагноза на възможните етиологични причини.

Table 2. Differential diagnosis of the possible etiological causes.

Заболяване	Начало	Серум / Serum				Урина Urine		Нефро-калциноза Nephro-calcinosis
		Mg ²⁺	Ca ²⁺	K ⁺	pH	Mg ²⁺	Ca ²⁺	
Първична фамилна хипомагнезиемия/ Primary familial hypomagnesaemia	Кърмаческа възраст/ Infancy	⇓	↓	N	N	↑	N	-
Изолирана доминантна хипомагнезиемия/ Isolated dominant hypomagnesaemia	Детство/ Childhood	↓	N	N	N	↑	↓	-
Изолирана рецесивна хипомагнезиемия/ Isolated recessive hypomagnesaemia	Кърмаческа възраст/ Infancy	↓	N	N	N	↑	⇓	-
Фамилна хипомагнезиемия с хиперкалциурия и нефрокалциноза/ Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis	Детство/ Childhood	↓	N	N	N	⇓	⇓	+++
Автозомно-доминантна хипомагнезиемия/ Autosome-dominant hypomagnesaemia	Кърмаческа възраст/ Infancy	↓	↓	N	N	↑	⇓	+
Аntenatalен синдром на Бартер/ Antenatal Bartter syndrome	Неонатална възраст/ Neonatal period	N	N	⇓	↑	N	⇓	+
Класически синдром на Бартер/ Classical Bartter syndrome	Кърмаческа възраст/ Infancy	↓	N	⇓	N	N	↑	±
Синдром на Гителман/ Gitelman syndrome	Вариабилно/ Variable	↓	N	⇓	↑	↑	↓	-

нас. Най-същественият принос при дълготрайното му проследяване според нас е в неговото лечение. Всички статии подчертават факта, че приложението на Са е спирано веднага след поставяне на диагнозата, рано в хода на заболяването (19). Съответно, няма достатъчно данни как такава приложение би се отразило и дали няма да предизвика нарушения по типа на патологичната хиперкалциемия. Диагнозата на нашия пациент бе поставена окончателно на 5 мес. възраст, но опитите ни да

спрем приема на Са не успяха поради вметнати гърчови еквиваленти или кашлица, третирана с Са глюконат от личния лекар (Табл. 1). Едва след намаляване на остриите инфекции и стабилизиране в състоянието на детето на 14 мес. възраст успяхме да го спрем. Достъпните ни изследвания понастоящем показват липса на увреда от продължителния Са прием. Приемаме този факт за важен и успокояващ в нашите условия, където вероятно често подобни пациенти остават недиагностицирани док-

рай. Приемът на магнезий е спрян през месец януари 2009 г., без проблеми до момента и при запазване на нормални Са и приемливи Mg нива. Родителите са инструктирани за правилно хранене, без допускане на хранителни дефицити, особено по отношение на магнезий. Очаква се нормално развитие на детето, но с възможност за предаване на заболяването в следващите поколения.

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Буева А, М Георгиев, П Кача. Синдром на хипомагнезиемия-хиперкалциурия. УРОНЕТ 2004, 3(3): 9-11
- 1а. Борисова АМ. Хипопаратиреоидизъм. В: Ендокринология. Под ред. на Б. Лозанов, София, 2000 г.
2. Barakat MT, H Ashrafian. Renal magnesium loss causing hypomagnesaemia and autonomous hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant* 2004, 19: 977-80
3. Birkan I, D Turkkahraman, O Dorsun, G Karaguzel. Successful management of primary hypomagnesaemia with high-dose oral magnesium citrate: a case-report. *Acta Paediatr* 2006, 95: 1697-99
4. Brown EM, SC Hebert. Calcium-receptor-regulated parathyroid and renal function. *Bone* 1997, 20: 303-309
5. Cole D, GA Quamme. Inherited disorders of renal magnesium handling. *Am Soc Nephrol* 2000, 11: 1937-47
6. Geven WB, LA Monnens, JL Willems. Magnesium metabolism in childhood. *Miner Electrolyte Metab* 1993, 19: 308-13
7. Kant SG, A Polinkovsky, S Mundlos et al. Acromesomelic dysplasia Maroteaux type maps to human chromosome 9. *Am J Hum Genet* 1998, 63: 155-62
8. Kantorovich V, JS Adams, JE Gaines et al. Genetic heterogeneity in familial renal magnesium wasting. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87: 612-17
9. Kausalya PJ, S Amasheh, D Gunzel et al.. Disease-associated mutations affect intracellular traffic and paracellular Mg²⁺ transport function of Claudin-16. *J Clin Invest* 2006, 116: 878-91
10. Konrad M, KP Schlingmann, T Gudermann et al. Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004, 286: 599-605
11. Lee B, E Huang, HJ Ward. Tight junction biology and kidney dysfunction *Am J Physiol Renal Physiol* 2006, 290: F20-F34

12. Meyer P, MB Boettger. Familial hypomagnesaemia with secondary hypocalcaemia: a new case that indicates autosomal recessive inheritance. *J Inherit Metab Dis* 2001, 24: 875-76

13. Minty I, CM Hall. Case report: hypomagnesaemia in a patient with acromesomelic dysplasia. *Brit J Radiol* 1993, 66: 1061-64

14. Mouw DR, Latessa RA. Clinical inquiries: What are the causes of hypomagnesaemia? *J Fam Pract* 2005, 54: 174-76

15. M?ller D, PJ Kausalya, IC Meij, W Hunziker. Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: blocking endocytosis restores surface expression of a novel Claudin-16 mutant that lacks the entire C-terminal cytosolic tail. *Hum Mol Genet* 2006, 15: 1049-58

16. Nair RR, P Nair. Alteration of myocardial mechanics in marginal magnesium deficit. *Magnes Res* 2002, 15: 287-306

17. Ng H-Y, SH Lin, C-Y Hsu et al. Hypokalemic paralysis due to Gitelman syndrome: a family study. *Neurology* 2006, 67: 1080-82

18. Scheinman SJ, LM Guay-Woodford, RV Thakker, DG Warnock. Genetic disorders of renal electrolyte transport. *N Engl J Med* 1999, 340: 1177-87

19. Shalev H, M Phillip, A Galil et al. Clinical presentation and outcome in primary familial hypomagnesaemia. *Arch Dis Child* 1998, 78: 127-30

20. Simon DB, Lu Y, Choate KA et al. Paracellin-1 a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science* 1999, 285: 103-106

21. Vargas-Poussou R, C Huang. Functional characterization of a calcium-sensing receptor mutation in severe autosomal dominant hypocalcemia with a Bartter-like syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2002, 13: 2259-66

22. Walder RY, D Landau, P Meyer et al. Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat Genet* 2002, 31: 171-74

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Доц. г-р Виолета Йотова
Кат. по педиатрия и мед. генетика
бул. „Христо Смирненски“ 1, Варна 9010
тел.: 052/ 300 249; факс: 052/302 889
e-mail: detendo.varna@gmail.com

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Assoc. Prof. Violeta Iotova MD
Dept. of Pediatrics and Medical Genetics,
9010 Varna Medical University, Bulgaria
тел.: 052/ 300 249; факс: 052/302 889
e-mail: detendo.varna@gmail.com

Дипептидил пептидаза-4 (DPP-4) инхибитори – нов терапевтичен подход при захарен диабет тип 2

Цветалина Танкова

Клиника по Диабетология, Клиничен Център по Ендокринология и Геронтология, Медицински Университет, София

Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) Inhibitors – a Novel Therapeutic Approach of Type 2 Diabetes

Tsvetalina Tankova

Department of Diabetology, Clinical Center of Endocrinology and Gerontology, Medical University, Sofia

Резюме

Инкретин-базираната терапия се разработва като нов и обещаващ подход в лечението на захарен диабет тип 2. Глюкагоноподобен пептид-1 (GLP-1) и глюкозо-зависим инсулинотропен полипептид (GIP) са чревни хормони, които се освобождават в отговор на прием на храна и стимулират глюкозо-зависимата секреция на инсулин. В допълнение, GLP-1 стимулира инсулиновата биосинтеза и потиска секрецията на глюкагон. Установено е, че GLP-1 упражнява трофични ефекти върху панкреасните клетки, като стимулира диференциацията на прекурсорните клетки и потиска апоптозата им. Секрецията на GLP-1 при захарен диабет тип 2 е нарушена, докато инсулинотропните му ефекти са съхранени.

Abstract

Incretin-based therapy has been developed as a promising novel treatment of type 2 diabetes. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) are intestinal incretin hormones, released in response to meal ingestion that potentiate the glucose-induced insulin response. In addition, GLP-1 stimulates insulin biosynthesis and inhibits glucagon secretion. GLP-1 has been shown to exert trophic effects on pancreatic beta cell mass, promoting the differentiation of precursor cells and exhibiting antiapoptotic effects. GLP-1 secretion in type 2 diabetes is impaired while its insulintropic effect is preserved. The incretin hormones are rapidly inactivated by an enzyme – dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4); thus the native GLP-1 has a short half-life – about 2 minutes and

Инкретините бързо се инактивират от ензим, наречен дипептидил пептидаза-4 (DPP-4), поради което полуживотът на естествените инкретини е кратък – около 2 минути за GLP-1, и около 5 минути за GIP. Един от подходите, които имат за цел да използват антидиабетните ефекти на инкретините, както и да преодолеят проблема с бързото инактивиране на естествените хормони, е насочен към потискане на активността на ензима DPP-4. Няколко DPP-4 инхибитори са в процес на клинично разработване; те са активни при прием през устата и повишават нивото на активния GLP-1, който от своя страна стимулира инсулиновата секреция и потиска глюкагоновата секреция, като така снижава нивото на кръвната захар. Понастоящем на пазара са налични два препарата – ситаглиптин и вилдаглиптин, които са безопасни, понасят се добре и са свързани с нисък риск от хипогликемия. И двата са неутрални по отношение на телесното тегло. Проучванията до момента показват, че DPP-4 инхибиторите са ефективен терапевтичен подход при захарен диабет тип 2, както като монотерапия, така и в комбинирана терапия, и имат потенциал да съхранят функционалната бета-клетъчна маса и да променят естествения ход на заболяването.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: захарен диабет тип 2, DPP-4 инхибитори, ситаглиптин, вилдаглиптин, GLP-1

Инкретин-базираната терапия се разработва и въвежда в клиничната практика през последните години като нов и обещаващ подход в лечението на захарен диабет тип 2.

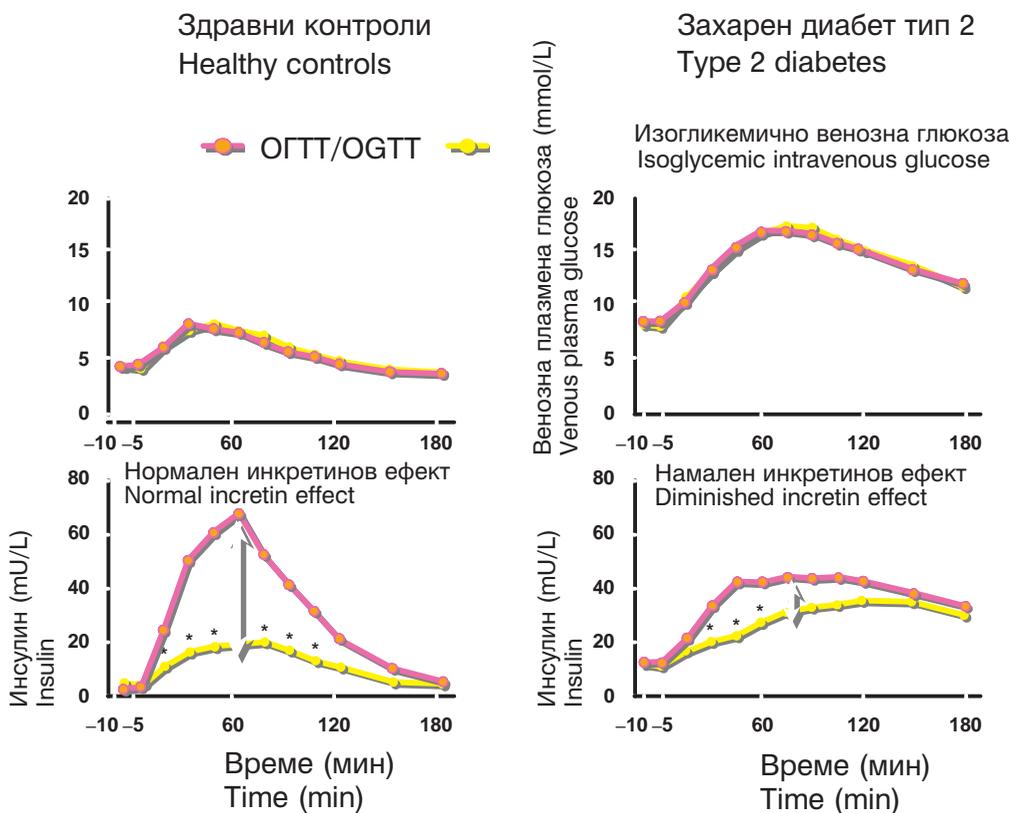
Инкретини

Установено е, че глюкоза, приета през устата, стимулира в по-голяма степен секре-

GIP – less than 5 minutes. One approach to harness the antidiabetic action of incretins and at the same time overcome the problem of the rapid inactivation of the native hormones is to inhibit the activity of DPP-4. Several DPP-4 inhibitors are in clinical development; these are orally active and increase the levels of active GLP-1, which in turn increases insulin secretion and reduces glucagon secretion and thereby lowers glucose levels. The currently available DPP-4 inhibitors – sitagliptin and vildagliptin, are safe and tolerable, with low risk of hypoglycemia. They are both body weight neutral. The studies presented thus far suggest that DPP-4 inhibition is an efficient treatment of type 2 diabetes, both as monotherapy and combination therapy and could be potentially useful in preserving functional beta cell mass and changing the progression of the disease.

KEY WORDS: type 2 diabetes, DPP-4 inhibitors, sitagliptin, vildagliptin, GLP-1

цията на инсулин спрямо глюкоза, приложена венозно, независимо от подгържането на едно и също ниво на глюкозата в кръвта. Този т.нар „инкретинов ефект“ при хора се свързва с два пептидни хормона – инкретини (29). (Фиг. 1) Те са чревни хормони, които се освобождават в отговор на прием на храна. Основните инкретини са глюкагоноподобен пептид – 1 (GLP-1), изграден



Фигура 1. Инкретиновият ефект е снижен при захарен диабет тип 2 при сравнение със здрави контроли.

Figure 1. Incretin effect is diminished in type 2 diabetes as compared to healthy controls.

от 30 аминокиселини, които се произвежда от L клетките в дисталната част на червата (илеум и колон); и глюкозо-зависим инсулинотропен полипептид (GIP), съставен от 42 аминокиселини, който се секретира от K клетките в проксималните отдели на червата (дуоденум, ѝеюнум) (7). Плазмените нива на инкретините са ниски при състояние на гладно, но бързо нарастват след прием на храна (16). Инкретините упражняват ефектите си чрез свързване с рецептори в различни тъкани, включително алфа- и бета-клетките на панкреаса. Те стимулират освобождаването на инсулин от бета-клетките на панкреаса (7,19,38). В допълнение, GLP-1 потиска секрецията на глюкагон от алфа-клетките (16,19). Тези ефекти са силно зависими от нивото на глюкозата (16). (Фиг.1) В изолирани бета-клетки е установено, че GLP-1 стимулира транскрипцията на инсулиновия ген и всички етапи на биосинтеза на инсулина, като така осигурява необходимия за секреция хормон. Други физиологични ефекти на

GLP-1 са потискане на киселинната секреция и изпразването на стомаха, с което се снижават постпрандиалните покачвания на нивото на кръвната захар (19). GLP-1 рецептори са установени и в хипоталамичните ядра, които контролират приема на храна, като чрез активирането им, GLP-1 повишава чувството на ситост (7). (Фиг. 2) Проучвания при животни са установили, че GLP-1 и GIP увеличават бета-клетъчната маса на панкреаса чрез стимулиране на бета-клетъчната неогенеза, растеж и пролиферация (11,14). Експерименти с пряно изолирани човешки острови са установили намаление на броя на апоптотичните клетки след 5-дневно *in vitro* третиране с GLP-1 (17). Тези ефекти са от изключително значение при захарен диабет тип 2, тъй като бета-клетъчната дисфункция е важен фактор в патогенезата и прогресирането на заболяването.

Дипептидил пептидаза 4 (DPP-4)

След освобождаването на инкретините, те бързо се инактивират от ензим, наречен дипептидил пептидаза-4 (DPP-4). Това е серинова протеаза на клетъчната повърхност, свързана с клетъчната мембрана, която е широко експресирана в различни органи, като разтворима част от нея е налична и в циркулацията. Под влияние на DPP-4 се отцепват първите две аминокиселини от двата инкретина и те се превръщат в неактивни пептиди (напр. GLP-1 9-36 амид), които не взаимодействат със съответните рецептори (13). Разцепването на GLP-1 и GIP от DPP-4 е процес на инактивиране, който настъпва бързо и поради това полуживотът на естествените инкретини е кратък – около 2 минути за GLP-1 и около 5 минути за GIP.

Инкретини при захарен диабет

GLP-1 и GIP допринасят за около 60-70% от постпрандиалния инсулинов отговор при здрави лица (29,38). При захарен диабет тип 2 инкретиновият ефект е намален (36,39). (Фиг.3) Това се дължи на отклонения в GLP-1 и GIP, които са разнопосочни – ефектът на GLP-1 е съхранен, но нивото му е понижено, докато по отношение на GIP, неговата концентрация е в нормални граници, но ефектът му е понижен (29). Разработени са две стратегии на инкретин-базирана терапия при захарен диабет, които имат за цел да използват антидиабетните ефекти на инкретините, както и да преодолеят проблема с бързото инактивиране на естествените хормони. Едната от тях включва използване на GLP-1 рецепторни агонисти (GLP-1 миметици), които не се разграждат от DPP-4 – такъв препарат е екзенатид (Byetta); или на дългодействащи инсулинови аналози, които също не са обект на действие на DPP-4 – лираглутид (2,16). Другата възможност е инхибиране на активността на DPP-4, чрез което GLP-1 и GIP се предпазват от разграждане, като по този начин се увеличава

и удължава действието на ендогенно освобождаваните инкретини (1,3,9,40).

Механизъм на действие на DPP-4 инхибитори

През 1998г. Holst и сътр. стигат до извода, че инхибирането на DPP-4 има потенциал на антидиабетна терапия (20). Инхибирането на DPP-4 предпазва GLP-1 и GIP от инактивиране и така увеличава нивата им в циркулацията във физиологични граници в продължение на 24 часа – както след прием на храна, така и на гладно (22,24). Трябва да се подчертае, че инхибирането на DPP-4 води до повишаване на нивото на GLP-1, при запазен циркаден ритъм през деня. От своя страна, GLP-1 и GIP стимулират секрецията на инсулин от бета-клетките на панкреаса (6). Установено е повишение на ранната фаза на инсулинова секреция след прием на храна (4,12), както и снижение на отношението проинсулин:инсулин (също маркер за бета-клетъчна функция) (32). Повишената инсулинова секреция води до увеличаване на поглъщането на глюкоза от периферните тъкани – мускули и мастна тъкан. Друг важен ефект на инхибирането на DPP-4 и последващото увеличаване на нивото на GLP-1 е потискането на глюкагоновата секреция (22). Това също е от изключителна важност, като се има предвид несъответно високата секреция на глюкагон при захарен диабет тип 2. Снижението на глюкагоновата секреция в съчетание с повишената секреция на инсулин води до намаляване на ендогенната чернодробна глюкозна продукция (8).

Установено е, че освен благоприятно повлияване на инсулиновата секреция, DPP-4 инхибирането подобрява и инсулиновата чувствителност (5). Този ефект може да е свързан със снижените нива на глюкагона, съчетани с повлияване на инсулиновото действие поради подобрения метаболитен контрол (1).

За разлика от GLP-1, DPP-4 инхибиторите нямат ефект върху изпразването на стомаха (37).

Проучвания при експериментални животни са установили значимо увеличение на бета-клетъчната маса (със 75%) при приложение на DPP-4 инхибитори, дължащо се на стимулиране на репликацията и потискане на апоптозата на бета-клетките на панкреаса (25). Няма данни за ефекти на DPP-4 инхибитори върху бета-клетъчната маса при хора.

Препарати

Понастоящем на пазара са налични два препарата – ситаглиптин (Januvia), разрешен за употреба в Европейския съюз от Европейската комисия на 23.03.2007, и вилдаглиптин (Galvus), наличен в Европейския съюз от 2.10.2007. Те са високоселективни и мощни DPP-4 инхибитори. Приемат се през устата, абсорбират се бързо и инхибират плазмената DPP-4 активност в почти 100% 15-30 минути след перорален прием, като над 80% от инхибирането продължава повече от 16 часа (4). Дозата на двата препарата е 100mg дневно. Фармакокинетиката на препаратите не се нарушава при чернодробна недостатъчност, докато при бъбречна недостатъчност дозата на ситаглиптин, който се метаболизира основно в бъбреците, трябва да се намали на 50mg (при креатининов клирънс < 50ml/min) или 25mg (при креатининов клирънс < 30 ml/min) (10). Ето защо Администрацията за храните и лекарствата в САЩ (FDA) препоръчва изследване на бъбречната функция преди включване на ситаглиптин. В различен стадий на клинично развитие понастоящем са над 10 препарата от групата на DPP-4 инхибиторите – алоглиптин, саксаглиптин, линаглиптин, дутоглиптин и др (21).

Основни клинични ефекти

В многобройни проучвания с хиляди пациенти със захарен диабет тип 2, някои с продължителност до 2 години, е натрупан богат клиничен опит с приложение на DPP-4 инхибитори (34,35). Установено е снижение на плазмената глюкоза на гладно и пос-

тпрандиално, както и на нивото на HbA_{1c} (30). При нелекувани пациенти е наблюдавано снижение на HbA_{1c} с 1% след приложение на ситаглиптин и вилдаглиптин в продължение на една година (35). Има данни, че ефектът на медикаментите върху HbA_{1c} в голяма степен зависи от изходното му ниво. Редица проучвания са установили траен ефект на DPP-4 инхибиторите върху нивото на HbA_{1c} в продължение на 2 години (3,34). В сравнителни проучвания с други перорални средства – розиглитазон, пиоглитазон, метформин, инсулин, вилдаглиптин е показал сходен хипогликемизиращ ефект, при намален брой странични ефекти (33,35). При сравнение с глипизид, ситаглиптин е показал сходен ефект върху нивото на кръвната захар, като при пациентите на глипизид е наблюдавана по-висока честота на хипогликемии, както и увеличение на телесното тегло (1). Това показва, че хипогликемизиращият ефект на ситаглиптин и вилдаглиптин е сравним с този на другите групи перорални антидиабетни средства в монотерапия. В комбинирана терапия с метформин, тиазолидиндиони, СУП и инсулин, DPP-4 инхибиторите показват допълнителен ефект (18,33,34). Добавянето на ситаглиптин към инсулин при захарен диабет тип 2 е довело до значимо по-голямо снижение на HbA_{1c} спрямо самостоятелна терапия с инсулин, съчетано с по-нисък риск от хипогликемии (18). В едно директно сравнително проучване с продължителност три месеца е установено, че двата препарата – ситаглиптин и вилдаглиптин, имат сходни ефекти върху кръвната захар на гладно, постпрандиалната кръвна захар и HbA_{1c} (31). Клиничните проучвания със ситаглиптин и вилдаглиптин не са установили значимо повлияване на липидния метаболизъм. В едно проучване е наблюдавано изразено снижение на постпрандиалните нива на триглицеридите след консумиране на богата на мазнини храна в края на 4-седмично приложение на вилдаглиптин (23).

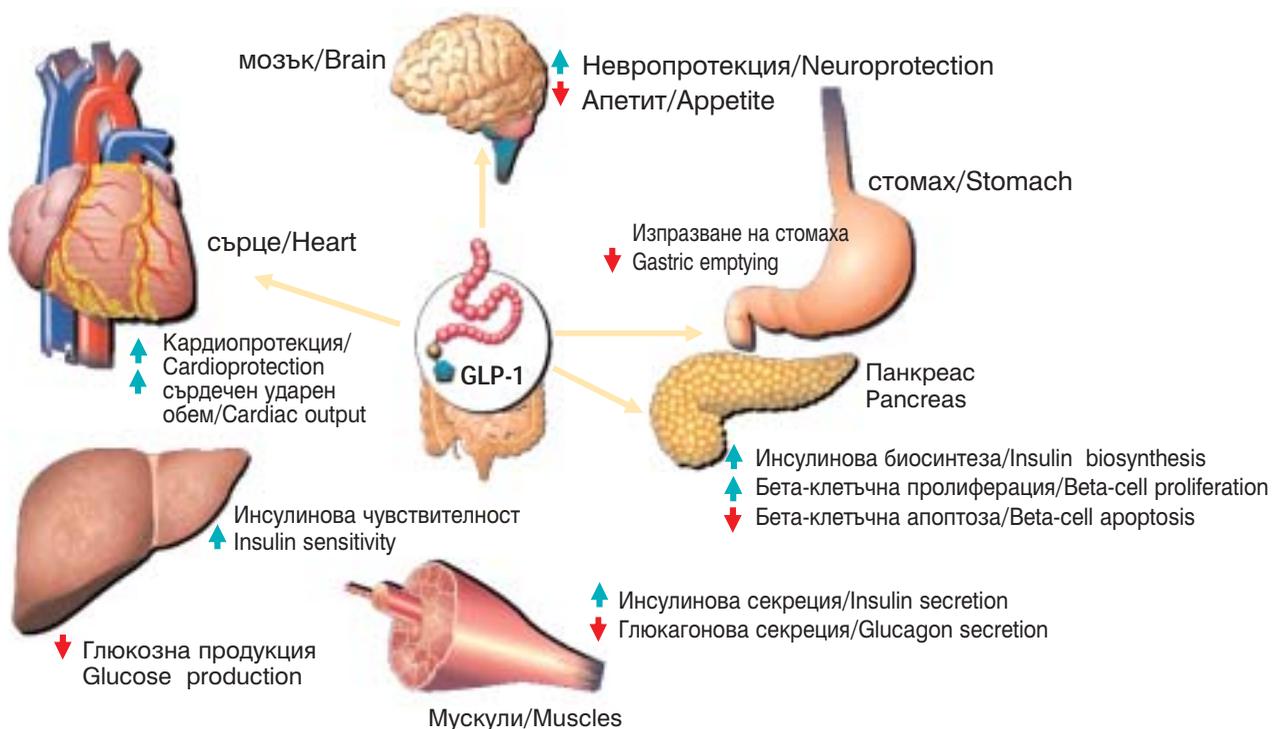
Проучванията до момента са установили благоприятен ефект на DPP-4 инхибитори върху гликемичния контрол, но както и с редица други по-нови средства за контрол на захарния диабет, не са съобщени данни за ефекти върху смъртност и усложнения на заболяването. В ход е клинично проучване (TECOS), в което ще участват и изследователи от България, и което е планирано да установи ефектите на приложение на DPP-4 инхибитор (ситаглиптин) върху смъртността, нефатален миокарден инфаркт, нефатален мозъчен инсулт, нестабилна стенокардия, налагаща хоспитализация.

Странични ефекти

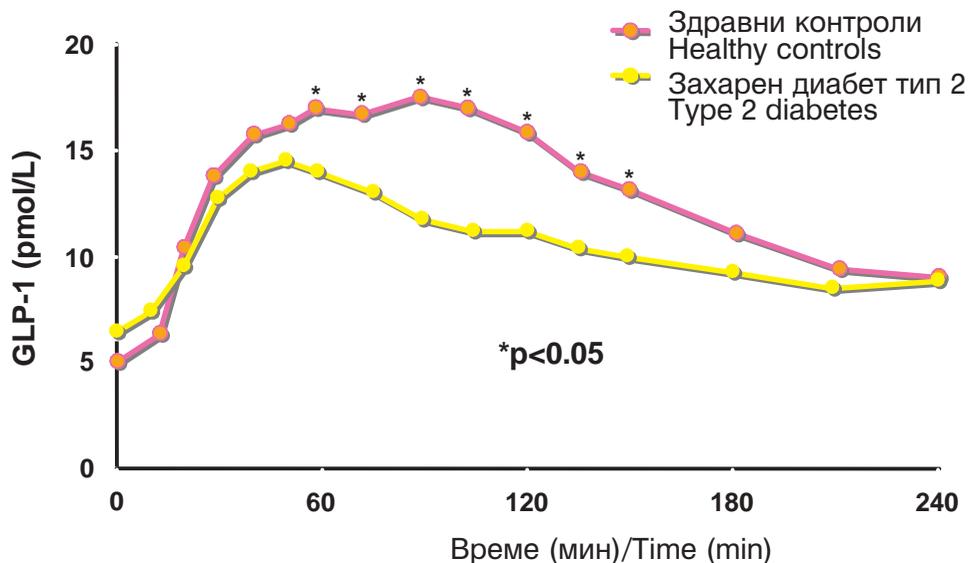
Субстрати на DPP-4 са също субстанция P, невропептид Y, инсулиноподобен растежен фактор (IGF-1), брадикинин, гастрин-освобождаващ пептид, ентеростатин, интерлевкин 2 (IL-2), интерлевкин 1 β (IL-1 β), хромогранин, различни хемокини (15). Това потенциално би могло да свърже приложение на DPP-4 инхибитори с поява на стра-

нични ефекти, като например повишаване на артериалното налягане, невrogenно възпаление, имунологични реакции. Досега, обаче, не са съобщени подобни странични реакции при приложение на препаратите при експериментални животни и хора. При хора не е доказано повлияване на метаболизма на други биоактивни пептиди при инхибиране на DPP-4.

Наличните в клиничната практика представители на групата на DPP-4 инхибитори – ситаглиптин и вилдаглиптин, са ефективни медикаменти с изключително малко странични ефекти, сравними с тези при приложение на плацебо. Болшинството от проучванията не са установили ефект на препаратите върху артериалното налягане. И двата медикамента се понасят добре и са безопасни. Тъй като ефектите на GLP-1 са глюкозо-зависими, рискът от хипогликемии при приложение на DPP-4 инхибитори е много нисък (3,4,9,16). DPP-4 инхибиторите са неутрални по отношение на телесното тегло, което е от изключително



Фигура 2. Ефекти на инкретините върху различните тъкани и органи.
Figure 2. Incretin effects on different tissues and organs.



Фигура 3. Нивото на GLP-1 е значимо снижено при захарен диабет тип 2.

Figure 3. GLP-1 level is significantly decreased in type 2 diabetes.

голяма важност, като се има предвид, че над 80% от пациентите със захарен диабет тип 2 са с наднормено тегло и затлъстяване. Това различава тази група антидиабетни средства от СУП и тиазолидиндионите, приложението на които е свързано с увеличаване на теглото. При приложение на вилдаглиптин е наблюдаван леко повишен риск от увеличение на чернодробните ензими, поради което е необходимо изследване на чернодробните показатели преди започване на лечението, през три месеца през първата година и периодично след това. Препоръчва се преустановяване на лечението с вилдаглиптин при повишение на чернодробните ензими над три пъти горната граница на нормата.

Основни показания

Основно показание за приложение на DPP-4 инхибитори е захарен диабет тип 2. Ситаглиптин се предлага в таблетки по 100мг. Прилага се в доза 1 таблетка 100мг дневно, добавен към метформин, сулфонилуреен препарат, тиазолидиндион или към комбинация от тези медикаменти. Вилдаглиптин се предлага в таблетки по 50мг и се прилага в доза 2 пъти по 1 таблетка от 50мг дневно, добавен към метформин или

тиазолидиндион, и в доза 1 таблетка от 50мг дневно, добавен към сулфонилуреен препарат.

Разработени са комбинирани препарати – Eucreas (50 mg вилдаглиптин и 850mg метформин) и Janimet (50mg ситаглиптин и 500mg/1000mg метформин). През 2006г. бе публикуван консенсус алгоритъм на Американската диабетна асоциация и Европейската асоциация за изучаване на диабета, който е създаден на базата на резултатите от клинични проучвания, изследвали влиянието на различни терапевтични режими при захарен диабет тип 2, както и на базата на опита на водещи експерти в областта на захарния диабет (26). Целта е постигане и поддържане на стойности на кръвната захар максимално близо до тези на хора без диабет. През януари 2008г. този консенсус алгоритъм бе актуализиран с оглед на появата на нова група медикаменти в клиничната практика – DPP-4 инхибиторите. В него е отбелязано, че очакваното снижение на HbA_{1c} след приложението на тези препарати е около 0,5-0,8% (ситаглиптин) (27). През м.октомври 2008г. се появи трети вариант на този консенсус алгоритъм, в който GLP-1 агонистите са посочени като втора стъпка в

терапевтичния подход след приложение на метформин и при непостигане на желаното ниво на HbA_{1c}. Тези медикаменти са отнесени към групата на по-малко добре валидираната терапия (28).

Опитът, натрупан до момента с DPP-4 инхибитори показва, че те са ефективни при перорален прием, безопасни, с добра поносимост и с минимален риск от хипогликемия. Нещо повече, те показват трайно и клинично значимо подобрене на гликемичния контрол, както самостоятелно, така и в комбинация с други перорални антидиабетни средства, като са неутрални по отношение на телесното тегло. Наличните данни показват, че двата регистрирани понастоящем медикамента имат сходни ефекти върху гликемичния контрол. Този нов терапевтичен подход явно е с голям потенциал, като се има предвид механизъм на действие (подобряване на бета-клетъчната функция), ефективност, поносимост и безопасност и обещава да се намеси и да промени естествения ход на захарен диабет тип 2 (24).

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Ahren, B. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Diabetes Care*, 30, 2007, 1344-1350.
2. Ahr?n, B. Exenatide: a novel treatment of type 2 diabetes. *Therapy*, 2, 2005, 207-222.
3. Ahr?n, B. Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) - novel approach to treat type 2 diabetes. *Curr. Enzyme Inhib.*, 1, 2005, 65-73.
4. Ahren, B., M. Landin-Olsson, P.A. Jansson, M. Svensson, D. Holmes, A. Schweizer. Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemia, sustains insulin levels and reduces glucagon levels in type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 89, 2004, 2078-2084.
5. Ahr?n, B., G. Pacini, J.E. Foley, A. Schweizer. Improved meal-related beta-cell function and insulin sensitivity by the dipeptidyl peptidase-IV inhibitor vildagliptin in metformin-treated patients with type 2 diabetes over 1 year. *Diabetes Care*, 28, 2005, 1936-1940.
6. Azuma, K., Z. Radikova, J. Mancino, F.G. Toledo, E. Thomas, C. Kangani, C. Dalla Man, C. Cobelli, J.J. Holst, C.F. Deacon, Y. He, M. Ligueros-Saylan, D. Serra, J.E. Foley, D.E.

Kelley. Measurements of islet function and glucose metabolism with the dipeptidyl peptidase 4 inhibitor vildagliptin in patients with type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 93, 2008, 2, 459-464.

7. Baggio, L.L., D.J. Drucker. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, 132, 2007, 6, 2131-2157.

8. Balas, B., M.R. Baig, C. Watson, B.E. Dunning, M. Ligueros-Saylan, Y. Wang, Y.L. He, C. Darland, J.J. Holst, C.F. Deacon, K. Cusi, A. Mari, J.E. Foley, R.A. DeFronzo. The dipeptidyl peptidase IV inhibitor vildagliptin suppresses endogenous glucose production and enhances islet function after single-dose administration in type 2 diabetic patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 92, 2007, 1249-1255.

9. Barnett, A. DPP-4 inhibitors and their potential role in the management of type 2 diabetes. *Int. J. Clin. Pract.*, 60, 2006, 1454-1470.

10. Bergman, A.J., J. Coyte, B. Yi. Effect of renal insufficiency on the pharmacokinetics of MK-0431 (sitagliptin), a selective dipeptidyl-peptidase-IV (DPP-IV) inhibitor. *Clin. Pharmacol. Therapeut.*, 38, 2006, P-II46.

11. Bulotta, A., H. Hui, E. Anastasi, C. Bertolotto, L.G. Boros, U. Di Mario, R. Perfetti. Cultured pancreatic ductal cells undergo cell cycle re-distribution and beta-cell-like differentiation in response to glucagon-like peptide-1. *J. Mol. Endocrinol.*, 29, 2002, 347-360.

12. D'Alessio, D.A. Restoration of an acute insulin response to glucose (AIRg) in drug-na?ve patients with type 2 diabetes (T2DM) by 3-month treatment with vildagliptin. *Poster 454-P, presented at ADA 2006.*

13. Deacon, C.F. Circulation and degradation of GIP and GLP-1. *Horm. Metab. Res.*, 36, 2004, 761-765.

14. Doyle, M.E., J.M. Egan. Mechanisms of action of glucagons-like peptide 1 in the pancreas. *Pharmacol. Ther.*, 113, 2007, 5, 546-593.

15. Drucker, D.J. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition and the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 30, 2007, 1335-1343.

16. Drucker, D.J., M.A. Nauck. The incretin system: Glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*, 368, 2006, 9548, 1696-1705.

17. Farilla, L., A. Bulotta, B. Hirshberg, S. Li Calzi, N. Khoury, H. Noushmehr, C. Bertolotto, U. Di Mario, D.M. Harlan, R. Perfetti. Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. *Endocrinology*, 144, 2003, 5149-5158.

18. Fonseca, V., A. Schweizer, D. Albrecht, M.A. Baron, I. Chang, S. Dejager. Addition of vildagliptin to insulin improves glycemic control in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 50, 2007, 1148-1155.

19. Gautier, J.F., S. Fetita, E. Songwi, C. Salaun-Martin. Biological actions of the incretins GIP and GLP-1 and therapeutic perspectives in patients with type 2 diabetes. *Diabet. Metab.*, 31, 2005, 233-242.

20. Holst, J.J., C.F. Deacon. Inhibition of the activity of dipeptidyl-peptidase IV as a treatment for type 2 diabetes. *Diabetes*, 47, 1998, 1663-1670.

21. Levien, T.L., D.E. Baker. New drugs in development

for the treatment of diabetes. *Diabetes Spectrum*, 22, 2009, 2, 92-106.

22. Mari, A., W.M. Sallas, Y.L. He, C. Watson, M. Ligueros-Saylan, B.E. Dunning, C.F. Deacon, J.J. Holst, J.E. Foley. Vildagliptin, a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor, improves model-assessed β -cell function in patients with type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 90, 2005, 4888-4894.

23. Matikainen, N., S. Mänttari, A. Schweizer, A. Ulvestad, D. Mills, B.E. Dunning, J.E. Foley, M. R. Taskinen. Vildagliptin therapy reduces postprandial intestinal triglyceride-rich lipoprotein particles in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 49, 2006, 2049-2057.

24. Mathieu, C. The scientific evidence: vildagliptin and the benefits of islet enhancement. *Diabet. Obes. Metab.*, 11, 2009, Suppl.2, 9-17.

25. Mu, J., J. Woods, Y.P. Zhou, R.S. Roy, Z. Li, E. Zycband, Y. Feng, L. Zhu, A.D. Howard, D.E. Moller, N.A. Thornberry, B.B. Zhang. Chronic inhibition of dipeptidyl peptidase-4 with a sitagliptin analog preserves pancreatic β -cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. *Diabetes*, 55, 2006, 1695-1704.

26. Nathan, D.M., J.B. Buse, M.B. Davidson, R.J. Heine, R.R. Holman, R. Sherwin, B. Zinman; Professional Practice Committee, American Diabetes Association; European Association for the Study of Diabetes. Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy. A consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia*, 49, 2006, 8, 1711-1721.

27. Nathan, D.M., J.B. Buse, M.B. Davidson, E. Ferranini, R.R. Holman, R. Sherwin, B. Zinman. Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: a Consensus Algorithm for the Initiation and Adjustment of Therapy. Update regarding thiazolidinediones: a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*, 31, 2008, 1, 173-175.

28. Nathan, D.M., J.B. Buse, M.B. Davidson, E. Ferranini, R.R. Holman, R. Sherwin, B. Zinman; American Diabetes Association; European Association for the Study of Diabetes. Medical management of hyperglycaemia in type 2 diabetes mellitus: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia*, 52, 2009, 1, 17-30.

29. Nauck, M., F. Stockmann, R. Ebert, W. Creutzfeldt. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*, 29, 1986, 1, 46-52.

30. Pratley, R.E., S. Jauffret-Kamel, E. Galbreath, D. Holmes. Twelve-week monotherapy with the DPP-4 inhibitor vildagliptin improves glycemic control in subjects with type 2 diabetes. *Horm. Metab. Res.*, 387, 2006, 423-438.

31. Marfella, R., M. Barbieri, R. Grella, M.R. Rizzo, G.F. Nicoletti, G. Paolisso. Effects of vildagliptin twice daily vs. sitagliptin once daily on 24-hour acute glucose fluctuations. *J. Diab. Complicat.*, 2009, in press.

32. Raz, I., M. Hanefeld, L. Xu, C. Caria, D. Williams-Herman, H. Khatami. Efficacy and safety of the dipeptidyl

peptidase-4 inhibitor sitagliptin as monotherapy in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia*, 49, 2006, 2564-2571.

33. Rosenstock, J., S.W. Kim, M.A. Baron, R.P. Camisaca, F. Cressier, A. Couturier, S. Dejager. Efficacy and tolerability of initial combination therapy with vildagliptin and pioglitazone compared with component monotherapy in patients with type 2 diabetes. *Diabet. Obes. Metab.*, 9, 2007, 175-185.

34. Scherbaum, W.A., A. Schweizer, A. Mari, P.M. Nilsson, G. Lalanne, Y. Wang, B.E. Dunning, J.E. Foley. Evidence that vildagliptin attenuates deterioration of glycemic control during 2-year treatment of patients with type 2 diabetes and mild hyperglycemia. *Diabet. Obes. Metab.*, 10, 2008, 675-682.

35. Schweizer, A., A. Couturier, J.E. Foley, S. Dejager. Comparison between vildagliptin and metformin to sustain reductions in HbA(1c) over 1 year in drug-naïve patients with Type 2 diabetes. *Diabet. Med.*, 24, 2007, 955-961.

36. Toft-Nielsen, M.B., M.B. Damholt, S. Madsbad, L.M. Hilsted, T.E. Hughes, B.K. Michelsen, J.J. Holst. Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86, 2001, 8, 3717-3723.

37. Vella, A., G. Bock, P.D. Giesler, D.B. Burton, R.A. Rizza, M. Camilleri. The effect of the dipeptidyl peptidase IV inhibitor LAF 237 on gastrointestinal function and glucose metabolism in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 49, 2006, Suppl. 1, 26-27.

38. Vilsböll, T., T. Krarup, S. Madsbad, J.J. Holst. Both GLP-1 and GIP are insulinotropic at basal and postprandial glucose levels and contribute nearly equally to the incretin effect of a meal in healthy subjects. *Regul. Pept.*, 114, 2003, 115-121.

39. Vilsböll, T., T. Krarup, J. Sonne, S. Madsbad, A. V?lund, A.G. Juul, J.J. Holst. Incretin secretion in relation to meal size and body weight in healthy subjects and people with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88, 2003, 2706-2713.

40. Weber AE. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of diabetes. *J. Med. Chem.*, 47, 2004, 17, 4135-4141.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Доц. Д-р Цветалина Танкова
Клиника по Диабетология,
Клиничен Център по Ендокринология
Ул. Здраве № 2, София 1431, България
E mail: tankova@iname.com

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Assoc. Prof. Tsvetalina Tankova
Department of Diabetology,
Clinical Center of Endocrinology
2, Zdrave str., Sofia 1431, Bulgaria
E mail: tankova@iname.com

Плазмен хромогранин А като специфичен маркер за откриване на тумори с невроендокринен произход сред пациентите с надбъбречни инциденталомии

В. Василев, С. Захариева

Клиничен център по Ендокринология и Геронтология, МУ – София

Plasma Chromogranin A as a Specific Marker for Detection of Tumours with Neuroendocrine Origin Among Patients with Adrenal Incidentaloma

V. Vasilev, S. Zacharieva

Clinical centre for Endocrinology and Gerontology, MU – Sofia

Резюме

Надбъбречните инциденталомии представляват тумори, открити случайно при провеждането на визуализиращи изследвания в областта на корема по поводи, които не са свързани с оценка на надбъбречната функция. Широкото приложение и достъпност на визуализиращите изследвания в последните години прави тези инцидентно открити аденоми все по-значим клиничен проблем.

До 20% от пациентите с надбъбречни инциденталомии имат субклинични хормонални нарушения, а от 5 до 11% от инциденталомите са феохромоцитомии – невроендокринни тумори, произлизащи от

Abstract

Adrenal incidentalomas are defined as adrenal tumors that are accidentally found during abdominal imaging procedures performed on indications other than evaluation of adrenal function. The widespread use and accessibility of imaging techniques makes these incidentally detected adrenal adenomas a growing clinical problem.

Up to 20% of patients with adrenal incidentaloma have some type of subclinical hormonal abnormalities and between 5 and 11% of patients with incidentally detected adrenal mass have proven to be pheochromocytoma – neuroendocrine tumor originating from the adrenal medulla. The need for early diagnostics of this condition is determined by the fact that it is asso-

надбъбречната медула. Необходимостта от ранно диагностициране на това заболяване се определя от факта, че то е свързано с повишен сърдечно-съдов риск и смъртност. Това налага разработването на методи с висока чувствителност и специфичност за откриването му.

Плазменият хромогранин А представлява кисел разтворим протеин, който се складира и освобождава заедно с катехоламините в еквимоларни количества от клетките на надбъбречната медула и симпатиковите неврони. Той представлява най-ефективният и сигурният кръвен маркер, който съществува в момента за диагностика и проследяване на невроендокринни тумори. Той е предложен като допълнителен и алтернативен метод на сега използваните изследвания, тъй като нито секрецията му, нито измерването се влияят от медикаментите, използвани при лечението на феохромоцитомите.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: Надбъбречни инциденталомы, феохромоцитом, хромогранин А

Надбъбречни инциденталомы

Все по-широкото приложение на визуализиращите техники прави случайно откритите надбъбречни тумори (инциденталомы) все по-значим проблем в клиничната практика и повдига редица въпроси по отношение на поведението спрямо тях. Терминът инциденталом се отнася за надбъбречни тумори, открити случайно при провеждането на визуализиращи изследвания в областта на корема по повод, които не са свързани с оценка на надбъбречната функция. Туморите, открити при стадиянето на злокачествени заболявания не се смятат за инциденталомы. Честотата на случайно откритите надбъбречни аденомы е около 0,6% при абдоминална компютърна томография (13) и между 1,4 – 8,7%

свързани с повишен кардиоваскуларен риск и смъртност, и изискват разработването на нови методи с висока чувствителност и специфичност за откриването му.

The plasma chromogranin A is an acidic soluble protein which is co-stored and released with catecholamines from adrenal medullary cells and sympathetic neurons in equimolar quantities. It is established as the most efficient and reliable blood marker, existing to date, for diagnosis and follow-up of neuroendocrine tumors. It has been proposed as additional and alternative method to the currently used tests as neither its secretion nor its measurement is influenced by drugs commonly used in the treatment of pheochromocytoma.

KEY WORDS: Adrenal incidentaloma, pheochromocytoma, chromogranin A

при аутопсионни серии (2). При случайното откриване на такава надбъбречна лезия пред лекаря се поставят два основни въпроса: дали тази формация е злокачествена и дали е хормонално активна. От отговора на тези въпроси зависи и цялостното терапевтично поведение. Злокачествените и хормонопродуциращите тумори подлежат на хирургично лечение, докато при останалите е достатъчно динамично наблюдение.

Невроендокринните тумори са неоплазми, които се характеризират с нисък пролиферативен индекс и в много случаи благоприятна прогноза. Тези тумори често произвеждат и секретират биологично активни субстанции, чрез които предизвикват тежки симптоми.

Последни проучвания показват, че до 20 % от пациентите с надбъбречни инциденталомии имат субклинични хормонални нарушения, което може да доведе до по-висок риск за метаболитно или сърдечно-съдово заболяване. (23) Смята се, че от 5 до 11 % от надбъбречните инциденталомии са феохромоцитомии – невроендокринни тумори, които произхождат от хромафинните клетки на надбъбречната медула. (23) В едно проучване, 19 от 33 феохромоцитомии (58 %) първоначално са диагностицирани като надбъбречни инциденталомии, а само 10 от 19 пациенти са имали хипертония (21). Следователно, изследването за феохромоцитом е задължително във всички случаи на случайно открити надбъбречни аденоми, поради голямата честота на усложненията и високата смъртност при това заболяване, както и поради непредсказуемия му ход. До 15 % от всички случаи на феохромоцитомии са напълно безсимптомни (4), но дори клинично непроявеното заболяване може да бъде фатално (28).

Биохимична диагностика на феохромоцитомите

Наличието на голям брой хормонални изследвания и нуждата да се изключи със сигурност едно потенциално летално заболяване с непредсказуем ход са довели до разработването на множество подходи за биохимичното диагностициране на феохромоцитомите. Тъй като те представляват хетерогенна група невроендокринни тумори, няма едно единствено изследване, което да се отличава със 100 % точност. Най-често използваните тестове включват определянето на 24-часови уринни метанефрини (норметанефрин и метанефрин), 24-часови уринни катехоламини (адреналин, норадреналин и допамин) и плазмените концентрации на адреналин и норадреналин чрез течна хроматография (HPLC). Спектрофотометричното изследване на общи метанефрини и ванилилманделова киселина в урината също се използва в клиничната практика. Обещаващ нов метод

за диагностициране на феохромоцитом представлява електрохимичното определяне на свободни метанефрини в плазма (17).

Плазмени катехоламини. Повечето пациенти с феохромоцитом имат повишени стойности на норадреналин в плазмата. Нивата на адреналина са по-малко показателни, тъй като до 30% от пациентите могат да имат нормални стойности (5). Поради краткия плазмен полуживот на катехоламините и епизодичната секреция и влиянието от редица фактори (стрес, медикаменти и т.н.) случайното плазмено изследване е свързано с висок процент фалшиво негативни и фалшиво позитивни резултати. Регистрирането на нормални стойности на плазмените катехоламини при нормотоничен и безсимптомнен пациент с надбъбречен инциденталом не може да изключи наличието на феохромоцитом.

24-часови уринни катехоламини и метанефрини. Определянето на свободните адреналин и норадреналин, както и техните метаболити – метанефрин и норметанефрин в 24-часова урина са едни от най-разпространените изследвания за доказване на феохромоцитом. В много случаи диагнозата може да бъде потвърдена или изключена само на базата на правилно взети проби от 24-часова урина.

Плазмени метанефрини. Тъй като някои тумори не секретират катехоламини, а ги метаболизират до метанефрини, изследването на плазмената им концентрация представлява по-добър маркер за наличие на феохромоцитом отколкото определянето само на катехоламини (10). В различни проучвания чувствителността на този метод варира от около 96 % (9) до почти 100 % (18).

Съществуват клинични състояния, при които стойностите на плазмените и уринните катехоламини могат да се повишат до нива, типични за феохромоцитомите. (Таблица 1).

Таблица 1. Фактори, които водят до фалшиво-положителни резултати при изследването на катехоламини и метанефрини.

Table 1. Factors leading to false-positive results when measuring catecholamines and metanephrines.

Рязко спиране на лечение с клонидин/Acute withdrawal of clonidine treatment
Остра алкохолна абстиненция/Acute alcohol abstinence
Остра мозъчна исхемия/Acute cerebral ischemia
Остър миокарден инфаркт/Acute myocardial infarction
Злоупотреба с кокаин/Cocaine abuse
Конгестивна сърдечна недостатъчност/Congestive heart failure
Остра хипогликемия/Acute hypoglycemia
Фентоламин/Phentolamine
Празозин/Prazosin
Лабеталол/Labetalol
Буспирон/Buspirone
Ацетаминофен/Acetaminophen

Определяне на плазмен хромогранин А като метод за диагностициране на невроендокринни тумори

Най-често за доказване на невроендокринните тумори в клиничната практика в момента се използва определянето на субстанциите, които се отделят от тях в големи количества. Необходими обаче са и молекули, които да бъдат използвани като маркери на несекретиращите и „биохимично тихите“ невроендокринни тумори. Хромогранин А представлява най-ефективният и сигурният кръвен маркер, който съществува в момента. Той може да бъде използван както при поставяне на диагноза, така и като прогностичен маркер при проследяването на невроендокринните тумори.

Плазменият хромогранин А представлява кисел разтворим протеин, който се складира и освобождава заедно с катехоламините в еквимоларни количества от

клетките на надбъбречната медула и симпатиковите неврони (26). Той е предложен като специфичен диагностичен метод в диференциалната диагноза на феохромоцитомата (25) и се препоръчва като алтернатива на катехоламините, тъй като нито секрецията му, нито измерването се влияят от медикаментите, използвани при лечението на феохромоцитомите.

Генът, който кодира хромогранин А, се намира върху 14 хромозома (22) и се състои от 8 интрона и 7 екзона, обхващащи около 11 килобази (30). Те кодират протеин, съставен от 439 аминокиселинни остатъка, предхождан от сигнален пептид от 16 остатъка. Хромогранин А играе ключова роля при образуването на секреторните гранули в невроендокринните клетки. При ниски стойности на рН и високи нива на калций той взаимодейства с хормоните, образувани в апарата на Голджи, и образува стабилни комплекси, които се отделят чрез екзоцитоза при съответна стимулация (14). Хромогранин А, подобно на ос-

маналите пептиди от групата на гранините, действа и като прохормон, от който под въздействието на протеолитични ензими се образуват множество биологично активни пептиди с автокринни, паракринни и ендокринни функции. Един такъв пептид е панкреастатинът, който повишава кръвната захар, като потиска отделянето на инсулин от бета-клетките на панкреаса и активира гликогенолизата в черния дроб (27). Хромогранин А представлява и прекурсор за образуването на аминотерминални фрагменти – вазостатин I и II, които потискат съдовата вазоконстрикция и модулират фибробластната адхезия (1). Катестатинът е друг фрагмент от молекулата на хромогранин А, който инхибира отделянето на катехоламини от симпатoadреналните клетки като блокира никотиновите холинергични рецептори. Той предпазва тези клетки от десенсibiliзиране при повтаряща се стимулация и предствалва елемент от отрицателна обратна връзка, която модулира катехоламиновата секреция от симпатoadреналната система (20). Хромогранин А е широко разпространен в ендокринната, централната и периферна нервна система. Той се открива и в невроните на малкия мозък, мозъчната кора, септума, амигдалата и астроглиалните клетки. Чрез имунохистохимични изследвания той е открит и в голям брой ендокринни, невроендокринни и невронални тумори, произхождащи от клетки, които нормално го експресират – феохромоцитом, кортикотропином, соматотропином, карциноми на белия дроб, яйчниците, простатата, панкреаса, тимуса, карциноидни тумори – гастрином, глюкагоном, инсулином, тумори на аортните и каротидните телца, както и при паратироидни аденоми и карциноми, невробластом, медулобластом и параганглиом, и медуларен тиреоиден карцином.

Най-високите стойности на хромогранин А са установени при карциноидни тумори (наг 1000 пъти над горна граница на

нормата). При тях той се използва за диагностика и проследяване на лечението (24). При пациенти с ендокринни тумори на панкреаса, секретиратци глюкагон, инсулин или соматостатин, стойностите на хромогранин А също са повишени и могат да служат като туморни маркери при проследяването на пациентите (16). При мъже с карцином на простатата изследването му може да бъде полезно за определяне на прогнозата. Високи стойности могат да се регистрират дори при нормален простат-специфичен антиген. Високият хромогранин А обикновено подсказва резистентност към хормоналната терапия и е свързан с лоша прогноза (29).

Няколко изследователски екипа са изследвали нивата на хромогранин А при пациенти с феохромоцитом. Cotesta и сътр. (8) изследват 21 пациента с феохромоцитом, 43 здрави контроли и 26 пациенти с нефункциониращи надбъбречни аденоми. При 11 от пациентите с феохромоцитом стойностите на хромогранин А са изследвани и 4 седмици след оперативното отстраняване на тумора. Резултатите от това проучване показват, че средната плазмена концентрация при пациентите с феохромоцитом ($204 \pm 147,9$ нг/мл) е значително по-висока ($P < 0,001$) отколкото при здравите контроли ($41,6 \pm 10,7$ нг/мл) и при пациентите с нефункциониращи надбъбречни аденоми ($47,3 \pm 17,6$ нг/мл). При оперираните пациенти стойностите на хромогранин А значително се понижават след отстраняването на тумора. Чувствителността и специфичността на изследването на плазмения хромогранин А били съответно 76,2 % и 97,7 %. По време на поставянето на диагнозата нивата на хромогранин А корелират с нивата на плазмените метанефрини. Авторите правят извода, че изследването на хромогранин А предствалва допълнителен биохимичен маркер за клиничното проследяване на пациентите с феохромоцитом.

В друго проучване Giovanella(12) изпол-

зва определянето на хромогранин А за откриване на невроендокринни тумори, в частност феохромоцитом, сред 104 пациенти с надбъбречни инциденталомии и 100 здрави пациенти като контроли. Определянето на плазмения хромогранин А става по имунорадиометричен метод (IRMA). При всички случаи на феохромоцитом е поставена и цитологична и хистологична диагноза. Стойностите на хромограни А са били повишени при 12 от 12 пациенти с феохромоцитом и в рамките на референтните граници при 92 от 92 пациенти с надбъбречни аденоми без невроендокринен произход. Изводът, който е направен е, че плазменият хромогранин А е ефективен за доказване на невроендокринни тумори сред пациентите с надбъбречни инциденталомии.

Плазмения хромогранин А е многообещаващ потвърдителен тест при пациенти с леко повишени плазмени или уринни метанефрини. Изследването му в тези случаи повишава положителната предиктивна стойност на плазмените метанефрини, като запазва диагностичната им чувствителност. Отрицателните плазмени метанефрини с голяма сигурност изключват наличието на феохромоцитом, затова при такива стойности няма единен консенсус за допълнително изследване на хромогранин А. При леко до умерено повишение, обаче, това изследване може да спести доста разходи за излишни по-нататъшни визуализиращи изследвания. (3)

Съществува висока конкурентност между нивата на хромогранин А и резултатите от сцинтиграфия с ^{131}I – MIBG – високо чувствителна и специфична методика за визуализиране на хромафинни тъкани, но и доста скъпа, отнемаща време и сложна за изпълнение (15). Повишените нива на хромогранин А корелират силно с туморната маса, а изследването му може да се използва много ефективно и за постоперативно проследяване на пациентите с феохромоцитом.

Изследването на хромогранин А има и някои недостатъци. Един от тях представлява фактът, че бъбреците играят важна роля в метаболизирането на хромогранин А и дори малки нарушения на бъбречната функция могат да доведат до значително повишение на серумната му концентрация. Според едно проучване (6) общата чувствителност на серумния хромогранин А за диагнозата на феохромоцитом е 74 % при пациенти с креатининов клирънс под 80 мл/мин. При комбинацията му с повишени плазмени катехоламини при пациенти с креатининов клирънс поне 80 мл/мин чувствителността му се повишава до 98 %. Следователно при използването на хромогранин А като маркер за невроендокринни тумори трябва внимателно да бъде оценена бъбречната функция чрез определянето на креатининовия клирънс. Ако влияещите фактори стриктно се изключат, плазменият хромогранин А би могъл да бъде много точен показател за потвърждаване или отхвърляне на диагнозата феохромоцитом сред пациентите с надбъбречни инциденталомии, по-големи от 20 мм. (11) Диагностичната стойност на хромогранин А за диагностициране на феохромоцитом е представена в таблица 2.

Практически интерес от определянето на хромогранин А

Изследването на плазмения хромогранин А може да има редица приложения в клиничната практика:

- За откриване и доказване на невроендокринни тумори
- За потвърждаване на диагнозата при феохромоцитом като допълнителен метод наред с изследването на плазмените или уринни катехоламини и метанефрини
- Като алтернативен метод на сцинтиграфията с ^{131}I – MIBG, спестявайки по този начин време и ресурси.

Таблица 2. Диагностична стойност на хромогранин А и плазмени метанефрини за диагнозата на феохромоцитом (Giovanela et al., 2006).

Table 2. Diagnostic value of chromogranin A and plasma metanephrines for the diagnosis of pheochromocytoma (Giovanela et al., 2006).

	Чувствителност Sensitivity	Специфичност Specificity
Хромогранин А Chromogranin A	95 %	96 %
Метанефрини Metanephrines	95 %	94 %
Хромогранин А + Метанефрини Chromogranin A + Metanephrines	91 %	94 %
Хромогранин А или Метанефрини Chromogranin A or Metanephrines	100 %	93 %

- Степента на повишението на хромогранин А при доказани невроендокринни тумори може да се използва за разграничаване на доброкачествени от злокачествени процеси.

- Камо надежден маркер в постоперативното проследяване при пациенти с феохромоцитом.

Практическата полза от търсенето и ранното откриване на субклиничните хормонални отклонения при пациентите с надбъбречни ициденталомии се обуславя от факта, че поведението при хормонално неактивните и хормонопродуциращите тумори е съвсем различно. При първите е достатъчно само периодично наблюдение, докато при вторите метод на избор е хирургичното отстраняване. Идентифицирането на феохромоцитомите има изключително голямо клинично значение. При тях е задължителна предоперативната подготовка с α -блокери и обемно заместване, чрез

която значително се намалява оперативната смъртност, както и постоперативните усложнения. Ето защо при всяко инцидентно открита надбъбречна маса е задължително изключването на катехоламин-продуциращ хромоафинен тумор. Именно в това направление изследването на хромогранин А би намерило голямо приложение в клиничната практика.

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Aardal S, K. B. Helle, S. Elsayed, R. K. Reed, G. Serck-Hanssen. Vasostatin, comprising the N-terminal domain of chromogranin A, suppress tension in isolated human blood vessel segments. *J Neuroendocrinol* 1993; 5:405-12.
2. Abecassis M, M. J. McLoughlin, B. Langer, J. E. Kudlow. Serendipitous adrenal masses: prevalence, significance and management. *Am J Surg*. 1985; 149:783-788.
3. Algeciras-Schimmich Alicia, Carol M. Preissner, William F. Young, Jr., Ravinder J. Singh, Stefan K. G. Grebe. Plasma Chromogranin A or Urine Fractionated Metanephrines Follow-Up Testing Improves the Diagnostic Accuracy of Plasma Fractionated Metanephrines for Pheochromocytoma *J Clin Endocrinol Metab*, January 2008, 93(1):91-95
4. Bravo E. L. Pheochromocytoma: current perspectives in the pathogenesis, diagnosis, and management. *Arg Bras Endocrinol Metabol* 2004; 48:746-50.
5. Bravo E. L., R. Tagle. Pheochromocytoma: State-of-the-Art and Future Prospects. *Endocrine Reviews*, August 2003, 24(4):539-553
6. Canale M. P., E. L. Bravo. Diagnostic specificity of serum chromogranin A for pheochromocytoma in patients with renal dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78:1139-1144
7. Cook F. J., D. W. Chandler, D. K. Snyder. Effect of buspirone on urinary catecholamine assays. *N Engl J Med* 1995; 332:401
8. Cotesta D., C. Caliumi, P. Alo, L. Petramala, M. G. Reale, R. Masciangelo, A. Signore, R. Cianci, E. D'Erasmio, C. Letizia. High plasma levels of human chromogranin A and adrenomedullin in patients with pheochromocytoma. *Tumori*. 2005 Jan-Feb; 91(1):53-8.
9. Eisenhofer G., J. W. Lenders, W. M. Linehan, M. M. Walther, D. S. Goldstein, H. R. Keiser. Plasma normetanephrine and metanephrine for detecting pheochromocytoma in von Hippel-Lindau disease and multiple endocrine neoplasia type 2. *N Engl J Med* 1999; 340: 1872-1879
10. Eisenhofer G., M. Walther, H. R. Keiser, J. W. Lenders, P. Friberg, K. Pacak. Plasma metanephrines: a novel and cost-effective test for pheochromocytoma. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33:1157-1169
11. Giovannella L., L. Ceriani, M. Balerna, F. Keller, M. Taborelli, C. Marone, D. Ferone. Diagnostic value of serum chromogranin-A combined with MIBG scintigraphy in patients with adrenal incidentalomas. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2008 Mar;52(1):84-88
12. Giovannella L. Serum chromogranin A assay in differential diagnosis of incidentally discovered adrenal masses. *Anticancer Res*. 2005 May-Jun;25(3A):1547-50
13. Glazer H. S., P. J. Weyman, S. S. Sagel, R. G. Levitt, B. L. McClennan. Nonfunctioning adrenal masses: incidental discovery on computed tomography. *Am J Roentgenol*. 1982; 139:81-85.
14. Gorr S. U., J. Shioi, D. V. Cohn. Interaction of calcium with porcine adrenal chromogranin A (secretory protein-I) and chromogranin B (secretogranin I). *Am J Physiol* 1989; 257:E247-E254.
15. d'Herbomez Michele, Valerie Gouze, Damien Huglo, Marie Nocaudie, Francois Pattou, Charles Proye, Jean-Louis Wemeau, Xavier Marchandise. Chromogranin A Assay and 131I-MIBG Scintigraphy for Diagnosis and Follow-Up of Pheochromocytoma; *The Journal Of Nuclear Medicine*; 2001 July Vol. 42 ; No. 7
16. Lamberts S. W., L. J. Hofland, F. R. Nobels. Neuroendocrine tumor markers. *Front Neuroendocrinol* 2001;22:309-39
17. Lenders J. W., G. Eisenhofer, I. Armando, H. R. Keiser, D. S. Goldstein, I. J. Kopin. Determination of metanephrines in plasma by liquid chromatography with electrochemical detection. *Clin Chem* 1993; 39:97-103
18. Lenders J. W., H. R. Keiser, D.S. Goldstein, J. J. Willemsen, P. Friberg, M.C. Jacobs, P. N. Kloppeborg, T. Thien, G. Eisenhofer. Plasma metanephrines in the diagnosis of pheochromocytoma. *Ann Intern Med* 1995; 123:101-109
19. Lenders J. W., K. Pacak, M. M. Walther, W. M. Linehan, M. Mannelli, P. Friberg, H. R. Keiser, D. S. Goldstein, G. Eisenhofer. Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: which test is best? *JAMA* 2002; 287: 1427-1434
20. Mahata S. K., D. T. O'Connor, M. Mahata, et al. Novel autocrine feedback control of catecholamine release: a discrete chromogranin A fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist. *J Clin Invest* 1997;100:1623-33.
21. Motta-Ramirez G. A., E. M. Remer, B. R. Herts, I. S. Gill, A. H. Hamrahian. Comparison of CT findings in symptomatic and incidentally discovered pheochromocytomas. *AJR Am J Roentgenol* 2005; 185:684-8.
22. Murray, S. S.; L. L. Deaven; D. W. Burton; D. T. O'Connor; P. L. Mellon; L. J. Deftos. The gene for human chromogranin A (CgA) is located on chromosome 14. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142: 141-146, 1987.
23. National Institutes of Health state-of-the-science conference statement. Management of the clinically inapparent adrenal mass (incidentaloma). February 4-6, 2002. http://consensus.nih.gov/ta/021/021_statement.htm.
24. O'Connor D. T., L. J. Deftos. Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms. *N Engl J Med* 1986;314:1145-51.

25. O'Connor D. T., K. N. Bernstein. Radioimmunoassay of chromogranin A in plasma as a measure of exocytotic sympathoadrenal activity in normal subjects and patients with pheochromocytoma. *N Engl J Med* 1984; 311: 764-770

26. O'Connor D. T., R. P. Frigon. Chromogranin A, the major catecholamine storage vesicle soluble protein: multiple size forms, subcellular storage, and regional distribution in chromaffin and nervous tissue elucidated by radioimmunoassay. *J Biol Chem* 1984

27. Sanchez-Margalet V, C. Gonzalez-Yanes, J. Santos-Alvarez, S. Najib. Pancreastatin: biological effects and mechanisms of action. *Adv Exp Med Biol* 2000;482:247-62

28. Sutton M. G., Sheps S. G., Lie J. T. Prevalence of clinically unsuspected pheochromocytoma: review of a 50-year autopsy series. *Mayo Clin. Proc.* 1981; 56:354-60.

29. Wu J. T., A. J. Erickson, K. C. Tsao, T. L. Wu, C. F. Sun. Elevated serum chromogranin A is detectable in patients with carcinomas at advanced disease stages. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30:175-8.

30. Wu H. J.; D. J. Rozansky; R. J. Parmer; Gill, B. M.; O'Connor, D. T. Structure and function of the chromogranin A gene: clues to evolution and tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* 266: 13130-13134, 1991

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Д-р Владимир Василев

Клиничен Център по Ендокринология
УСБАЛЕ „Акад.Иван Пенчев“, ул. Здраве №2
1431 София, България
e-mail: drvvv@mail.bg

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Vladimir Vasilev MD

Clinical Centre of Endocrinology, USHATE
„Acad.Ivan Penchev“, 2 Zdrave“ Str.
1431 Sofia, Bulgaria
e-mail: drvvv@mail.bg

Списание
ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ISSN 1310-8131
Българското дружество по
ендокринология (БДЕ)

Journal
ENDOCRINOLOGIA ISSN 1310-8131
Bulgarian Society
of Endocrinology (BSE)

Адрес на редакционната колегия:

Клиничен център – МБАЛ по ендокринология, „Акад. Иван Пенчев“ ул. „Здраве“ №2, 1431 София;
Проф. Б. Лозанов
тел. (02) 985 6001; факс (02) 987 4145; Мобилен: 0888/680 343 (проф. Лозанов),
E-mail: bojann_lozanov@hotmail.com

Editorial Board Address for Correspondence:

Clinical Center of Endocrinology,
2, Zdrave Str., 1431 Sofia, Bulgaria;
Prof. B. Lozanov, Editor in Chief
Tel (+0359) 2-895 6001; Fax C 2-987 4145;
Mobil (+0359) 888 680 343 Lozanov,
E-mail: bojann_lozanov@hotmail.com

Списание „Ендокринология“, издание на Българското научно дружество по ендокринология, излиза в четири книжки годишно. В него се отпечатват оригинални научни статии, казуистични съобщения, обзори, рецензии и съобщения за проведени или предстоящи научни конгреси, симпозиуми и други материали в сферата на клиничната ендокринология. Списанието излиза на български език с подробни резюмета на български и английски. Заглавията, авторските колективи, а също надписите и означенията на илюстрациите и в таблиците се отпечатват и на двата езика. Материалите, предоставени от чужди автори се поместват на английски с цялостен или подбран превод на български.

Материалите трябва да се предоставят в два еднакви екземпляра, напечатани на пишещата машина или на компютър, на хартия формат А4 (21 x 30 см), 60 знака на 30 реда при двоен интервал между редовете (една стандартна машинописна страница).

Обемът на представените работи не трябва да превишава 10 стандартни страници за оригиналните статии, 12 страници – за обзорните статии, 3-4 страници за казуистичните съобщения, 4 страници за информации относно научни прояви в България и в чужбина, както и за научни дискусии, 2 страници за рецензии на книги (монографии и учебници). В посочения обем се включват книгописът и всички илюстрации и таблици. В същия не се включват резюметата на български и английски, чийто обем трябва да бъде около 200 думи за всяко (25-30 машинописни реда).

The journal of the Bulgarian Society of Endocrinology “Endocrinologia” is published in 4 issues per year. It accepts for publication original research articles, case reports, short communications, reviews, opinions on new medical books, correspondence and announcements for scientific events (congresses, symposia, etc) in all fields of clinical Endocrinology. The journal is published in Bulgarian. The detailed abstracts and the titles of the articles, the names of the authors and institutions as well as the legends of the illustrations (figures and tables) are printed in Bulgarian and English. The papers from abroad are published in “in extenso” in English, with complete or selected translation in Bulgarian, provided by the Editorial board.

The manuscripts should be submitted in two printed copies, on standard A4 sheets (21/30 cm), double spaced, 60 characters per line, 30 lines per standard page.

The size of each paper should not exceed 10 pages for original research articles, 12 pages for reviews, 3 pages for case reports, 2 pages for short communications, 4 pages for discussions or correspondence on scientific events on medical books or chronicles. The references or illustrations are included in this size (two 9x13 cm figures, photographs, tables or diagrams are considered as one standard page).

The abstracts are not included in the size of the paper and should be submitted on a separate page with 3 to 5 key words at the end of the abstract. They should reflect the most essential topics of the article, including the objectives and hypothesis of the research work, the procedures, the main findings and

Резюметата се представят на отделни страници. Те трябва да отразяват конкретно работната хипотеза и целта на разработката, използваните методи, най-важните резултати и заключения. Ключовите думи (до 5), съобразени с „Medline“, трябва да се посочат в края на всяко резюме.

Структурата на статиите трябва да отговаря на следните изисквания:

Титулна страница

а) заглавие, имена на авторите (собствено име и фамилия), название на научната организация или лечебното заведение, в което те работят. При повече от едно за ведение имената на същите и на съответните автори се маркират с цифри или звездички;

б) същите данни на английски език се изписват под българския текст.

Забележка: при статии от чужди автори българският текст следва английския. Точният превод от английски на български се осигурява от редакцията. Това се отнася и за останалите текстове, включително резюметата на български.

Основен текст на статията

Оригиналните статии задължително трябва да имат следната структура: увод, материал и методи, собствени резултати, обсъждане, заключение или извод.

Методиките следва да бъдат подробно описани (включително видът и фирмата производител на използваните реактиви и апаратура). Същото се отнася и за статистическите методи.

Тези изисквания не важат за обзорите и другите видове публикации. В текста се допускат само официално приетите международни съкращения; при използване на други съкращения те трябва да бъдат изрично посочени в текста. За мерните единици е задължителна международната система SI. Цитатите вътре в текста е препоръчително да бъдат отбелязвани само с номерата им в книгописа.

Илюстрации и таблици

Илюстрациите към текста (фигури, графики, диаграми, схеми и др. – черно-бели копия с необходимия добър контраст и качество) се представят на отделни листове (без обяснителен текст), в оригинал и две копия за всяка от тях. Текстът към фигурите със съответната им номерация (на български и на английски език) се прилага на отделен лист с описание. На гърба на всяка фигура се надписват с молив съответният номер (с арабски цифри), заглавието на статията и името на водещия автор, като се посочва и мястото (горе, долу). Таблиците се представят с готово написани обяснителни текстове на български и на английски, които са

the principal conclusions. The abstracts should not exceed one standard typewritten page of 200 words.

The basic structure of the manuscripts should meet the following requirements:

Title page

The title of the article, forename, middle initials (if any) and family name of each author; institutional affiliation; name of department(s) and institutions to which the work should be attributed, address and fax number of the corresponding author.

Text of the article

The original research reports should have the following structure: introduction (states the aim, summarizes the rationale for the study), subjects and materials, methods (procedure and apparatus in sufficient detail, statistical methods), results, discussion, conclusions (should be linked with the aims of the study, but unqualified statements not completely supported by research data should be avoided). This requirements are not valid for the other types of manuscripts. Only officially recognized abbreviations should be used, all others should be explained in the text. Units should be used according to the International System of Units (S. I. units). Numbers to bibliographical references should be used according to their enumeration in the reference list.

Illustrations

The figures, diagrams, schemes, photos should be submitted separately from the text (one original and two copies) in size 9 x 13 cm, all of them described on the back side with: consecutive number (in Arabic figures); titles of the article and name of the first author. These should be listed together with the corresponding and informative text in the legend (title, keys to symbols, etc.) on a separate sheet in consecutive order. The tables should be presented on separate sheets with Arabic numbers and informative text above each table. Please do not leave any empty space in the text for illustrations. Show with an arrow in the left margin of the respective page the recommended space for them.

References

The references should be presented on a separate page at the end of the manuscript. It is recommended that the number of references should not exceed 15-20 titles for the original articles and 30-35 titles for the reviews; 2/3 of them should be published in the last 5 years. References in Cyrillic should be listed first, followed by the Latin ones in the respective alphabetic order. The number of the reference should be followed by the family name of the first author and then his/her initials, names of the second and other authors should start with the initials

разположени над тях; номерацията им е отделна (също с арабски цифри). Посочените в таблицата данни не трябва да се дублират с тези във фигурите. В текста не се оставя място за илюстрациите; същото се посочва със стрелка и съответния номер в лявото бяло поле на листа.

Книгопис

Книгописът се представя на отделен лист. Броят на цитираните източници е препоръчително да не надхвърля 15 (за обзорите до 30), като 2/3 от тях да бъдат от последните 5 години. Подреждането става по азбучен ред (първо на кирилица, после на латиница), като след поредния номер се отбелязва фамилията на първия автор, след това инициалите му; всички останали автори се посочват с инициалите, последва ни от фамилията на автора (в обратен ред). Следва цялото заглавие на цитираната статия, след него – названието на списанието (или общоприетото му съкращение), том, година, брой на книгата, началната и крайната страница. Глави (раздели) от книги се изписват по аналогичен начин, като след автора и заглавието на главата (раздела) се отбелязват пълното заглавие на книгата, имената на редакторите (в скоби), издателството, градът и годината на издаване, началната и крайната страница.

Примери:

Статия от списание:

1. McLachlan, S., M. F. Prumel, B. Rapoport. Cell Mediated or Humoral Immunity in Graves' Ophthalmopathy? *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 78, 1994, 5, 1070-1074.

Глава (раздел) от книга:

2. Delange, F. Endemic Cretenism. In: The Thyroid (Eds. L. Braveman and R. Utiger). Lippincott Co, Philadelphia, 1991, 942-955.

Адрес за кореспонденция с авторите

Той се дава в края на всяка статия и съдържа всички необходими данни (вкл. пощенски код) на български език за един от авторите, който отговаря за кореспонденцията.

Всички ръкописи трябва да се изпращат с придружително писмо, подписани от авторите, с което потвърждават съгласието си за отпечатване в сп. „Ендокринология“. В писмото трябва да бъде отбелязано, че материалът не е бил отпечатван в други научни списания у нас и в чужбина. Ръкописи не се връщат.

Всички материали за списанието се изпращат на посочения адрес на редакцията.

followed by the family names. The full title of the cited article should be written, followed by the name of the journal where it has been published (or its generally accepted abbreviation), volume, year, issue, first and last page. Chapters of books should be cited in the same way, the full name of the chapter first, followed by "In:", full title of the book, editors, publisher, town, year, first and final page number of the cited chapter.

Examples

Reference to a journal article:

1. McLachlan, S., M. F. Prumel, B. Rapoport. Cell Mediated or Humoral Immunity in Graves' Ophthalmopathy? *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 78, 1994, 5, 1070-1074.

Reference to a book chapter:

2. Delange, F. Endemic Cretenism. In: The Thyroid (Eds. L. Braveman and R. Utiger). Lippincott Co, Philadelphia, 1991, 942-955.

Submission of manuscripts

The original and one copy of the complete manuscript are submitted together with a covering letter granting the consent of all authors for the publication of the article as well as a statement that it has not been published previously elsewhere and signed by the first author. The editors will not be responsible for damages or loss of the papers submitted. Papers returned to the authors for revisions and not received back in 60 days it shall be treated as newly submitted manuscripts. Manuscripts of articles accepted for publication will not be returned to the authors.

Address for sending of manuscripts and other editorial correspondence

Clinical Center of Endocrinology,
2, Zdrave Str., 1431 Sofia, Bulgaria;
Prof. B. Lozanov, Editor in Chief
Tel (+0359) 2-895 6001; Fax C 2-987 4145;
Mobil (+0359) 888 680 343 Lozanov,
E-mail: bojann_lozanov@hotmail.com

ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ENDOCRINOLOGIA



Списание
на Българското дружество
по ендокринология
към СМД в България

Journal
of the Bulgarian Society
of Endocrinology
(BSE)

Главен редактор
Проф. Боян ЛОЗАНОВ
Зам. главен редактор
Вл. ХРИСТОВ
Научен секретар
Р. КОВАЧЕВА

Редактор на английски
Д-р Александър ШИНКОВ
Отговорен редактор
Румен НИНОВ
© *Първа корица и графичен дизайн*
Румен НИНОВ

Editor-in-chief
Prof. Bojan LOZANOV
Associate-Editor-in Chief
VI. CHRISTOV

Scientific secretary
R. KOVATCEVA

English editor
Alexander SHINKOV, MD
Art director Rumen NINOV
© *Cover&Design* Rumen NINOV

Институции-партньори, получаващи сп. Ендокринология Institution/Partners Receiving „Endocrinologia“

- Elsevier Bibliographic Databases, Netherlands
- National Library of Medicine, Bethesda
- The Librarian Royal Society of Medicine, London
- British Diabetic Association, London
- Who Regional Office for Europe, Copenhagen
- Who Health Organization Library (periodicals), Geneva
- Academic National de medicine Bibliotheque, Paris
- Canadian Institute for Scientific and Technical Information, Ottawa
- Library, National Institute of Infectious Diseases, Tokio
- Nagasaki University Medical Library, Nagasaki
- ВИНТИ/РАН-МИННАУКЕ РОССИИ, Москва
- ДЕРЖАВНА НАУКОВА МЕДИЧНА БИБЛИОТЕКА, Киев