ISSN 1310-8131 *(Print)* ISSN 2683-0787 *(Online)*

ЕНДОКРИНОЛОГИЯ
ENDOCRINOLOGIA

Списанието се индексира от/The journal is indexed by:
- ***Elsevier Bibliographic Databases, (SCOPUS) Netherlands***
- ***EMBASE***
- ***EBSCO***
- ***Bulgarian Citation Index***

Том XXVI / Volume XXVI

Българско дружество по ендокринология

Bulgarian Society of Endocrinology 1/2021

ISSN 1310-8131(Print) ISSN 2683-0787(Online)

списание **Ендокринология** том XXVI, книжка 1/2021

Съдържание

Journal **Endocrinologia** volume XXVI, number 1/2021

Contents

Българско дружество по ендокринология

Bulgarian Society of Endocrinology

Саркопения – едно ново предизвикателство

Тошева, Гергана М.[1], Сидерова, Мира В.[1, 2]
[1] Втора Катедра по Вътрешни болести, УНС по Ендокринология и болести на обмяната, Медицински университет, Варна
[2] Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, Университетска Болница „Св. Марина", Варна

Постъпване: 01.10. 2019 г./ *Ревизиране:* 14. 01. 2020 г. /*Приемане:* 04. 02. 2020 г.

Sarcopenia – a New Challenge

Tosheva, Gergana M.[1], Siderova, Mira V. [1, 2]
[1] Second department of Internal diseases, ES Endocrinology and metabolic diseases, Medical university - Varna
[2] Clinic of Endocrinology and metabolic diseases, University Hospital „St. Marina", Varna

Submitted: 01.10. 2019 / *Revised:* 14. 01. 2020 /*Accepted:* 04. 02. 2020

Резюме

Напредъкът в медицината през последните десетилетия ни изправя пред нови територии – болестите свързани с напредването на възрастта. Застаряването на населението е тенденция в световен мащаб, което налага подробно запознаване с патологията, характерна за тази възрастова група, както и предприемането на своевременни мерки за запазване качеството на живот на възрастните хора. Подобно, но не достатъчно изучено предизвикателство представлява саркопенията – синдром, характеризиращ се с прогресивна и генерализирана загуба на скелетно-мускулна маса и сила, водещи до неблагоприятни последствия като обездвижване, лошо качество на живот и смърт.

Целта на този обзор е да предостави информация относно таргетната популация, сред която се среща по-често, както и основните аспекти в диагностиката, патогенезата и методите за превенция. Насочването на вниманието към този синдром, своевременното му диагностициране и предприемането на адекватни мерки биха предотвратили влошаването на качеството на живот сред голям брой възрастни хора.

През 2010 г. Европейската Работна Група за Саркопения при Възрастните Хора публикува дефиниция на понятието, а 8 години по-късно го актуализира. Дефиницията се основава на три

Abstract

Advances in medicine in recent decades confront us with new challenges, in particular, diseases of ageing. Population ageing is a global trend, which requires a detailed knowledge of the pathology characteristics of this age group, as well as taking timely measures to preserve the quality of life of the elderly. A similar challenge is sarcopenia – a syndrome of progressive and generalised loss of skeletal muscle mass and strength that occurs with advancing age and is associated with an increased likelihood of adverse outcomes including falls, physical disability and mortality.

The aim of this survey is to provide information on the target population, amongst which sarcopenia is more common, as well as pointing out the main aspects in the diagnosis, pathogenesis and methods of it's prevention.

In 2010, the European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP) published a sarcopenia definition and eight years later updated this definition. It is based on three criteria: low muscle strength, low muscle quantity or quality and low physical performance. Scientists are paying more attention to the problem because the syndrome worsens the performance of daily activities, increases the risk of falls, fractures, immobilization, and mortality.

критерия: намалена мускулна сила, намалено мускулно качество и количество и слабо физическо представяне.

Саркопенията е важен гериатричен синдром, посочван като един от основните рискови фактори за болестност и смъртност сред възрастните над 65 години. Учените обръщат все по-голямо внимание на проблема, защото синдромът влошава изпълнението на ежедневните дейности, увеличава риска от падания, фрактури, обездвижване, както и смъртността.

Ageing along with increasing life expectancy represent new challenges for modern medicine. Sarcopenia is a new and important geriatric syndrome, identified as one of the major risk factors for morbidity and mortality in adults over 65 years of age.

Ключови думи:

саркопения; мускулна сила; мускулна маса; физическо представяне; застаряване

Key words:

sarcopenia, muscle strength, muscle mass, physical performance, ageing

Въведение

Напредъкът в медицината последните десетилетия ни изправя пред нови територии – болестите свързани, с напредването на възрастта. Застаряването на населението е тенденция в световен мащаб, което налага подробно запознаване на медицината с патологията, характерна за тази възрастова категория, както и предприемането на своевременни мерки за запазване качеството на живот на възрастните хора.

Подобно, но не достатъчно изучено предизвикателство представлява саркопенията – синдром, характеризиращ се с прогресивна и генерализирана загуба на скелетно-мускулна маса и сила, водещи до неблагоприятни последствия като обездвижване, лошо качество на живот и смърт (1,2).

Целта на този обзор е да предостави информация относно таргетната група от популацията, сред която саркопенията се среща по-често, както и основните аспекти в диагностиката, патогенезата и методите за превенция. Насочването на вниманието към този синдром, своевременното му диагностициране и предприемането на адекватни мерки биха предодвратили влошаването на качеството на живот сред голям брой възрастни хора.

Дефиниция

За първи път понятието саркопения се появява в медицинската терминология през 1989 г. Irwin Rosenberg предлага то да се използва засвързаното с напредване на възрастта намаление в мускулната маса. Произхожда от гръцките корени „sarx“ – плът, месо и „penia“ – загуба (3, 4). Саркопенията се определя като гериатричен синдром и като такъв се нарежда до делириума, инконтиненцията, паданията и т.н. (5). Проучванията сред засегнатите индивиди еднозначно докладват, че този синдром е сред основните фактори за немощ и обездвижване на възрастните.

През 2010 г. Европейската Работна Група за Саркопения при Възрастните Хора (European Working Group on Sarcopenia in Older People – EWGSOP) публикува дефиниция на понятието с цел да насърчи напредъка в идентифицирането и грижата за засегнатите. Осем години по-късно EWGSOP2 актуализира определението като за този период множество работни групи са изучавали въпроса, но въпреки това, към момента това е слабо и недостатъчно проучена територия. Основна промяна за тези години е фактът, че докато първоначално се е смятало, че мускулната маса е определящ фактор за мускулната функция (6), понастоящем като по-силен фактор се определя мускулната сила (7). Дефиницята се основава на три критерия:

1) намалена мускулна сила;
2) ниско мускулно качество и количество;
3) слабо физическо представяне.

Основен критерий е намалената мускулна сила. Ако е налична единствено тя, саркопенията се счита за вероятна. Диагнозата се потвърждава при наличие на критерий 2, а при едновременното откриване и на трите критерия саркопенията се определя като тежка (8).

Учените обръщат все по-голямо внимание на проблема, защото синдромът влошава изпълнението на ежедневните дейности, увеличава риска от падания, фрактури, обездвижване, както и смъртността. Влошаването на качеството на живот поставя индивида пред необходимостта от постоянна грижа и помощ. Икономически е свързана с огромни разходи, дължащи се на увеличен брой хоспитализации, като Antunes и сътр. докладват, че приемът в болница по този повод е вероятно да струва около 5 пъти по-скъпо, от колкото, ако причината за хоспитализацията е друга (9). И докато дълги години се считаше, че този синдром е присъщ единствено за възрастните хора, то с натрупването на повече данни, се установи, че това е процес, започващ значително по-рано в годините. Бонева и сътр. в проучване сред група от българската популация, докладват, че промяната в отношението мастна към нетлъстинна телесна маса започва още към 40-45 годишна възраст (10).

Остаряването на индивида е фактор, върху който не можем да влияем, но допълнителните фактори, увеличаващи риска от развитието на саркопенията са таргет за превенцията ѝ (11,12).

Препоръки за диагностика

Международният консенсус дава насоки при кои индивиди следва да изследваме целенасочено. Откриването на случаите започва, когато пациентът съобщи за признаци и симптоми като падания, слабост и бавно вървене, затруднение при ставането от стол, както и отслабване на тегло. При наличието на някои от гореспоменатите оплаквания се препоръчва провеждане на допълнителни тестове (13). Като подпомагащ скринингов метод се препоръчва въпросникът SARC-F, като сбор от точките ≥4 е предиктор за саркопения (14). Въпросите са свързани с възприятието на пациента за силата му, възможността за ходене, ставане от стол, изкачване на стълби и преживявания, свързани с падания. Той е лесен за изпълнение, въпросите са отворени и се разчита на субективната оценка на пациента. Един недостатък е необходимостта му от валидиране за различни популации (15,16).

Пристъпвайки към обективните измервания, даващи информация за саркопенията, се започва с измерването на ***мускулната сила***. Използват се основно 2 метода – измерване на силата на захват или тестът за ставане от стол. Двата вида изследвания са равнозначни и за диагностицирането е достатъчно провеждането само на един от тях.

За измерване ***силата на захват*** се използва калибриран ръчен дианамометър, като най-често в практиката се използва динамометърът на Jamar. Данните следва да се интерпретират според възрастта и пола на изследваното лице, съпоствени към референтна популация (17). За коректно измерване е важно правилното позициониране на пациента – седнало положение с аддукция на рамото, флексия на предмишницата в лакетната става на 90 градуса, неутрална позиция на предмишницата и китката (18). Изследваният се инструктира да стиска с максимална сила уреда по 3 пъти за всяка ръка с почивка от 30 секунди между опитите. Като показател се взима максималната абсолютна стойност (19, 20). Измерването на силата на захват на ръката е лесно изпълнимо и корелира добре с мускулната сила на краката.

Когато измерването на силата на захват не може да бъде проведено поради различна по степен инвалидизация на ръката (например артрит, травма, инсулт и други), може да се използват изометрични методи на усукване за долни крайници (21).

Много години преди саркопенията да бъде дефинирана като понятие, е установено, че ниската сила на захват е свързана с редица неблагоприятни здравни последствия. Първоначално изследването с динамометър е използвано в хирургията на ръцете, за да се определи мускулният капацитет след травма или оперативна намеса. Освен като ключов компонент за диагностиката на саркопения, то навлиза и като неразделна част от фенотипизирането на слабостта, свързана с възрастта (frailty) (22). Ниските стойности са свързани с по-висока смъртност от всякакви причини (23-25). С натрупването на повече данни се установява, че редуцираната сила на захват е асоциирана с повече падания, нарушена двигателна функция и обездвижване, влошено качество на живот и продължителен болничен престой (26-28). Силно корелира с развитието на постоперативни усложнения и е предиктор за загуба на физически капацитет и кратка преживяемост сред хоспитализираните пациенти (23,29). Използва се и като метод на оценка на терапевтичното поведение при редица заболявания като хроничната обструктивна белодробна болест (30) и ревматоидния артрит (31,32). Lopez-Jaramillo и съавт. публикуват данни за пациенти с предиабет и диабет (33). Luis Carlos Nacul и сътр. в едно свое проучване доказват, че силата на стискане може да бъде използвана като биомаркер за синдрома на хронична умора, свързан с миалгичен енцефаломиелит (34).

Всички натрупани данни в тази насока доказват важността на изследването не само като показател за мускулна сила, а и като цялостен показател за физическото здраве на индивида.

Като критерий за намалена сила на захват за европейците, EWGSOP2 определя стойности по-малки от 16 кг за жени и 27 кг за мъже (8).

Вторият тест препоръчван за измерване на мускулната сила е *тестът за ставане от стол*. Измерва се времето, необходимо за петкратно изправяне от седящо положение без подпиране с ръце. Вариация на теста е броят ставания и сядания на стол за 30 секунди (35-37). Провеждането на изследването изисква, както сила, така и издръжливост. За намалена сила се счита, когато изследването продължава повече от 15 секунди.

Мускулното количество или ***маса*** може да бъде установено чрез различни техники като стойността се съпоставя спрямо индекса на телесна маса или единствено по височината. Използват се различни методи, като златен стандарт представляват *ядрено-магнитният резонанс и компютърната томография*, но липсата на дефинирани прагови стойности за ниска мускулна маса при тях, ги прави рядко използвани за целта техники. Най-широко е приложението на *двойно-енергийната рентгенова абсорбциометрия* (Dual-energy X-ray absorptiometry, DXA). Мускулната маса може да бъде определена като цялостна телесна скелетно-мускулна маса (СММ) или като скелетно-мускулна маса на крайниците (СММК). Поради факта, че мускулната маса корелира с телесния размер, т.е. по-големите индивиди обикновено имат по-висока мускулна маса, то СММ и СММК, трябва да бъдат съпоставяни към височината на квадрат, абсолютната стойност на теглото или индекса на телесна маса (38). Стойностите за ниска мускулна маса са СММК като абсолютна стойност по-малка от 20 кг за мъже и 15 кг за жени (39), а като съотношение към височината на квадрат – по-малка от 7кг/м² за мъже и 6 кг/м² за жени (40).

Анализът чрез *биоелектричен импеданс* може да бъде използван като алтерантива. Той е по-лесен за провеждане, времето за изследване е по-кратко и не е свързан с лъчево натоварване за индивида. Като такъв е по-широко достъпен метод за използване в практиката, но все още не е валидиран за различните популации (41). Подобно на DXA се влияе от водното съдържание в организма.

Третият вид тестове, представляват тези, оценяващи ***физическите възможности***. Съществуват няколко вида изследвания – *краткият тест за физически капацитет, тестът за отмерване на времето за изправяне и вървене и тестът за изминаване на 4 метра,* като най-често използваното в практиката е скоростта на ходене и в частност – изминаването на 4 метра (8). Изчислява се времето за извървяване на 4-метрова дистанция с нормална скорост. Изследването е широко приложимо в практиката поради лесното изпълнение, безопасността му и факта, че за провеждането му не се изисква наличието на апаратура (42). В допълнение, редица проучвания показват, че скоростта на ходене е надежден предиктор за адинамия, падания, необходимостта от асистенция и дори смъртност (43-45). EWGSOP2 посочва като прагова стойност, насочваща към тежка саркопения, скорост по-малка от 0,8 м/сек, независимо от пола (8).

Големи надежди се възлагат и на откриването на ***биомаркери***, които биха улеснили диагностичния процес. Въпреки това, поради комплексната патофизиология на саркопенията, е малко вероятно един единствен биомаркер да идентифицира състоянието сред хетерогенна популация от пациенти (38). По-вероятно е установяването на панел от биомаркери, включващи потенциални серумни и тъканни маркери (46).

Патогенеза

Процесът на формиране на саркопения е дълъг и много фактори по време на живота могат да се намесят във възникването му. Мускулната маса и сила не са константни величини, като през годините се променят. През периода на растеж те се увеличават, достигат своя пик около 40 годишна възраст, а след 50 годишна възраст започват да намаляват. Пиковите нива са по-високи при мъжете, отколкото при жените. Аналогия може да бъде направена с натрупването и загубата на костна тъкан. Докато генетични и други фактори, свързани с начина на живот, могат да ускорят развитието на процеса, то промяната в начина на хранене и редовните тренировки могат да го забавят и дори предотвратят (47). Следователно, превантивните мерки следва да са насочени към оптимално мускулно развитие в млада възраст, поддържане мускулатурата на средна възраст и минимизиране на загубите с напредване на годините (48).

И докато саркопенията е синдром, свързан с остаряването на индивида, то допълнителни фактори като бедно на протеини хранене и някои хронични болести могат да допринесат за по-ранното и по-тежко протичане на процеса. Поради тази причина е предложено класифицирането на саркопенията на *първична* – когато тя е в следствие на възрастово-обусловените промени в организма и *вторична* – когато причината е болестен процес. Разграничаването между двата вида често е трудно осъществимо в практиката, поради факта, че с напредване на възрастта коморбидността се среща често. Но независимо от това, едно 3 годишно обсервационно проучване показа, че всяка загуба на мускулна маса и сила е свързана с трикратно увеличение на смъртността, в сравнение с пациентите без саркопения (49).

Гореспоменатите диагностични критерии са формулирани първоначално единствено за възрастово-обусловена саркопения, но поради липсата на специфични препоръки, приложими при хронични заболявания, те често се използват за установяване и на вторична такава. Поради този факт е необходимо откриване на рисковите популации за вторична саркопения и изготвянето на специфични за нея препоръки

Основните патогенетични механизми за развитието на процеса са сходни, независимо за кой от двата вида става въпрос. Най-често описваните са липсата на физическа активност и ниска способност за ремоделиране на двигателните единици; диспропорция между протеиновите синтез и регенерация; дисбаланс на хормоните и цитокините, включително полови хормони (тестостерон, дехидроепиандростерон), витамин Д, растежен хормон и кортизол; наличие на миостатин и провъзпалителни цитокини (фактор на туморна некроза (TNF) и интерлевкин 6 (IL-6)); оксидативен стрес и митохондриална дисфункция и последващото натрупване на реактивни кислородни радикали (6,50).

Саркопенията е често срещана сред пациентите, страдащи от някои ендокринни заболявания като хипогонадизъм, хиперкортизолизъм, хипертиреоидизъм, захарен диабет тип 2, дефицит на растежен хормон, затлъстяване и като следствие от бариатрична хирургия.

Превенция и лечение

Терапевтичните стратегии не се различават съществено, независимо дали саркопенията е възрастово-обусловена или не, въпреки че идентифицирането на конкретна причина е от основно значение за определяне на подходящо лечение.

Като превантивни и терапевтични насоки се посочват физическите упражнения и богатото на протеини и витамин Д хранене , както и добавянето им като суплементи, заедно с креатин, който е популярна хранителна добавка сред атлетите.

Тренировките за издръжливост срещу съпротивление увеличават мускулната маса и сила. Те са ефективни за превенция и лечение на саркопения, благодарение на способността им да стимулират протеиновия анаболизъм, което води до специфични метаболитни и морфологични мускулни адаптационни промени (51). Zaleski и съавт. препоръчват в свой труд умерено до високо интензивните тренировки срещу съпротивление като терапевтична възможност при саркопения (52). Подобна физическа активност увеличава синтеза на мускулни протеини, водещо до хипертрофия на мускулните фибри тип II. Протеиновите добавки могат да увеличат мускулната хипертрофия, предизвикана от упражненията.

Недостигът на витамин Д е регулируем рисков фактор, *т.е суплементацията с витамин Д* може да се използва в терапевтичната стратегия. Множество рандомизирани проучвания доказват, че нормалното ниво на витамин Д е свързано с подобряване на мускулната функция и баланс. Един мета-анализ посочва намаляване на паданията с 14-34%, като ефектът е бил най-силно изразен сред индивидите с най-ниски изходни нива на витамин Д (53). Съществуват и анализи, които не демонстрират подобни позитивни ефекти, като вероятно това се дължи на включването на индивиди без дефицит на витамин Д, както и добавянето му в сравнително ниски дози (545).

Богатото на протеини хранене е важно за превенцията и лечението на сракопенията. Препоръчителният дневен прием е много различен в зависимост от характеристиките на индивида. Средният дневен прием при хората на средна възраст е под 0,8 г/кг, поради което препоръчителният прием е до 1-1,2 г/кг/дневно за здрави индивиди и 1,2-1,5 г/кг/дневно за гериатрични пациенти, страдащи от остри или хронични заболявания (55). В трудовете, изучаващи протеиновата суплиментация при пациенти със саркопения, са използвани дози, вариращи от 7,5 до 45 г/дневно (56). Прилагането на дози над 40 г/дневно съвместно с физически упражнения имат адитивен ефект върху мускулната функция при възрастни хора и слаби индивиди (57).

Комбинацията от гореспоменатите мерки има положителен ефект при пациентите със саркопения. Едно рандомизирано, двойно-сляпо, плацебо- контролирано проучване с продължителност 12 седмици изучава суплементацията сред 130 възрастни пациенти със саркопения на средна възраст 80,3 г. Добавянето на суроватъчен протеин, аминокиселини и витамин Д, съвместно с физически упражнения е увеличило нетлъстинната маса и сила, а 68% от изследваните са излекувани от саркопенията (58).

Позитивен ефект се наблюдава и при приемането на добавки с креатин. В дози 5г/дневно, приемани от пациенти над 65 г., се описва благоприятен ефект върху мускулната маса и сила (59). Смята се, че суплементацията с креатин увеличава нетлъстинната маса, както чрез увеличаване на тренировъчния обем, така и чрез активиране на сателитни клетки и специфични мускулни растежни фактори (IGF-1, 4EBP-1) (60). Резултатите от мета анализа подкрепят ролята на добавката му по време на тренировките за резистентност като фактор, като резултатът е повишаване на мускулната маса, сила и функционални показатели (61).

В процес на изучаване е и *ефектът на анти-миостатиновата терапия*. Миостатинът като член на TGF-β фамилията се експресира във високи нива в скелетните миоцити. Той се свързва с активирания рецептор IIb8 като задейства AKT-mTOR пътя, което води до инхибиране на протеиновия синтез (55). Терапевтичните стратегии за намаляване на неговите ефекти включват лечение с дефектни миостатинови рецептори, антимиостатинови антитела и антитела към миостатиновия рецептор, ActRIIB. 36-седмично проучване с анти-миостатинови антитела, включващо над 200 възрастни пациента със саркопения, е показало увеличение на нетлъстинната маса, както и подобряване на физическия капацитет при изкачването по стълби и ставането от стол, както и по-бърз ход на вървене (56).

Друга използвана терапевтична възможност е *приложението на тестостерон*. Заместителната терапия с тестостерон сред здрави възрастни хора, както и при мъже с хипогонадизъм, води до подобрение в нетлъстинната маса и сила. Освен това, подобренията в работата на скелетните мускули след заместващата терапия с тестостерон са зависими от типа фибри и се ограничават до увеличаване на размера на клетката, пиковата сила и пиковата мощност (61). Наскоро, нестероиден селективен андроген-рецепторен модулатор (САРМ) е използван в проучвания, целящи лечение на функционални ограничения. САРМ се свързва с андрогенния рецептор и действа като мощен андрогенен агонист в селективните прицелни тъкани, представени от мускулите и костите. Рандомизирано проучване, включващо възрастни хора със саркопения, изследвайки ефекта на САРМ (МК-0773), не установява благоприятни ефекти върху мускулната функция. Други представители на САРМ (като LGD-4033, BMS-564929, енобосарм) са също изучавани сред подобни групи от пациенти, но не са показали преимущество пред тестостерона (62).

Заключение

Честотата на саркопенията в големи популации от хора на възраст 60-70 г. е между 5-13%, като достига до 11-50% над 80-годишна възраст (63). Застаряването на населението в световен мащаб и увеличаващата се продължителност на живот поставят нови предизвикателства пред съвременната медицина. Саркопенията е нов и важен гериатричен синдром, посочван като един от основните рискови фактора за болестност и смъртност сред възрастните над 65 години. Проучванията в тази насока дават надежда, че своевременно предприети мерки могат да превантират развитието му, както и да подобрят качеството на живот сред засегнатите.

References

1. **Delmonico MJ, Harris TB, Lee JS, Visser M, Nevitt M, Kritchevsky SB, et al.** Alternative definitions of sarcopenia, lower extremity performance, and functional impairment with aging in older men and women. *J Am Geriatr Soc 2007;* 55(5): 769-774.
2. **Goodpaster BH, Park SW, Harris TB, Kritchevsky SB, Nevitt M, Schwartz AV, et al.** The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: The health, aging and body composition study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2006;* 61(10): 1059-1064.
3. **Rosenberg I.** Summary comments: epidemiological and methodological problems in determining nutritional status of older persons. *Am J Clin Nutr 1989;* 50: 1231–1233.
4. **Rosenberg IH.** Sarcopenia: origins and clinical relevance. *Nutr 1997;* 127: 990S–991S.
5. **Inouye SK, Studenski S, Tinetti ME, Cuchel GA.** Geriatric syndromes: clinical, research, and policy implications of a core geriatric concept. *J Am Geriatr Soc 2007;* 55(5): 780–791.
6. **Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, et al.** Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: report of the European working group on sarcopenia in older people. *Age Ageing 2010;* 39(4): 412-423.
7. **Schaap LA, van Schoor NM, Lips P, Visser M.** Associations of sarcopenia definitions, and their components, with the incidence of recurrent falling and fractures: the longitudinal aging study Amsterdam. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2018* 10; 73(9):1199-1204.
8. **Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, Boirie Y, Bruyère O, Cederholm T, et al.** Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing 2019* 1; 48(1):16-31.
9. **Antunes AC, Araújo DA, Veríssimo MT, Amaral TF.** Sarcopenia and hospitalisation costs in older adults: a cross-sectional study. *Nutr Diet 2017; 74(1)*: 46-50.
10. **Boneva Zh, Boyanov M, Christov V.** Assessment of Body Composition Changes in a Group of Adult Bulgarians by Bio-electrical

Impedance. *Endocrinologia 2007; 12(4)*: 218-225. (In Bulgarian) (**Бонева Ж, Боянов М, Христов В.** Оценка на измененията в телесния състав на група от възрастната българска популация с помощта на биоелектрически импеданс. *Ендокринология 2007;* 12(4): 218-225).

11. **Dodds RM, Syddall HE, Cooper R, Benzeval M, Deary IJ, Dennison EM, et al.** Grip strength across the life course: normative data from twelve British studies. *PLoS One 2014 4;* 9(12):e113637. doi:10.1371/journal.pone.0113637.

12. **Sayer AA, Syddall HE, Gilbody HJ, Dennison EM, Cooper C.** Does sarcopenia originate in early life? Findings from the Hertfordshire cohort study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2004;* 59(9):M930-934.

13. **Morley JE, Abbatecola AM, Argiles JM, Baracos V, Bauer J, Bhasin S, et al.** Sarcopenia with limited mobility: an international consensus. *J Am Med Dir Assoc 2011;* 12(6): 403-409.

14. **Malmstrom TK, Miller DK, Simonsick EM, Ferrucci L, Morley JE.** SARC-F: a symptom score to predict persons with sarcopenia at risk for poor functional outcomes. *J Cachexia Sarcopenia Muscle 2016;* 7(1): 28-36.

15. **Bahat G, Yilmazi O, Kilic C, Oren MM, Karan MA.** Performance of SARC-F in regard to sarcopenia definitions, muscle mass and functional measures. *J Nutr Health Aging 2018.* doi:10.1007/s12603- 018-1067-8.

16. **Bahat G, Yilmaz O, Oren M, Karan MA, Reginster JY, Olivier B, Beaudart C.** Cross-cultural adaptation and validation of the SARC-F to assess sarcopenia: methodological report from European Union Geriatric Medicine Society Sarcopenia Special Interest Group. *Eur Geriatr Med 2018;* 9: 23–28.

17. **Roberts HC, Denison HJ, Martin HJ, Patel HP, Syddall H, Cooper C, Sayer AA.** A review of the measurement of grip strength in clinical and epidemiological studies: towards a standardised approach. *Age Ageing 2011;* 40(4): 423-429.

18. **Fess E, Moran C.** Clinical assessment recommendations. 1st ed. Indianapolis: *American Society of Hand Therapists; 1981.*

19. **Fess EE.** Grip strength. In: Casanova JS, editor. Clinical assessment recommendations. 2nd ed. Chicago: *American Society of Hand Therapists; 1992. p. 41e5.*

20. **Massy-Westropp NM, Gill TK, Taylor AW, Bohannon RW, Hill CL.** Hand grip strength: age and gender stratified normative data in a population-based study. *BMC Res Notes 2011;* 14; 4:127. doi: 10.1186/1756-0500-4-127.

21. **Francis P, Toomey C, Mc Cormack W, Lyons M, Jakeman P.** Measurement of maximal isometric torque and muscle quality of the knee extensors and flexors in healthy 50- to 70-year-old women. *Clin Physiol Funct Imaging 2017;* 37(4): 448-455.

22. **Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J, et al.** Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2001;*56(3): M146-156.

23. **Sayer AA, Kirkwood TBL.** Grip strength and mortality: a biomarker of ageing? *Lancet 2015 18;* 386(9990): 226-227.

24. **Leong DP, Teo KK, Rangarajan S, Lopez-Jaramillo P, Avezum A Jr, et al.** Prognostic value of grip strength: findings from the Prospective Urban Rural Epidemiology (PURE) study. *Lancet 2015;* 386(9990): 266-273.

25. **Cooper R, Kuh D, Hardy R, Mortality Review Group.** Objectively measured physical capability levels and mortality: systematic review and meta-analysis. *BMJ 2010;* 341: c4467.

26. **Norman K, Stobäus N, Smoliner C, Zocher D, Scheufele R, Valentini L, et al.** Determinants of hand grip strength, knee extension strength and functional status in cancer patients. *Clin Nutr 2010;* 29: 586–591.

27. **Norman K, Stobäus N, Gonzalez MC, Schulzke JD, Pirlich M.** Hand grip strength: outcome predictor and marker of nutritional status. *Clin Nutr 2011;* 30:135–142.

28. **Postorino MC, Torti C, Carè I, Pisani V, Strazzulla A, Vaccaro V, et al.** Is handgrip another culprit for the risk of fractures in HIV-positive patients? *New Microbiologica 2016;* 39(1): 61-64.

29. **Angst F, Drerup S, Werle S, Herren DB, Simmen BR, Goldhahn J.** Prediction of grip and key pinch strength in 978 healthy subjects. *BMC Musculoskel Dis 2010;* 11: 2–7.

30. **Swallow EB, Reyes D, Hopkinson NS, Man WDC, Porcher R, Cetti EJ, et al.** Quadriceps strength predicts mortality in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax 2007;* 62: 115–120.

31. **Fraser A, Vallow J, Preston A, Cooper RG.** Predicting „normal" grip strength for rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology 1999;* 38: 521–528.

32. **Oken O, Batur G, Gunduz R, Yorhanzioglu R.** Factors associated with functional disability in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int 2008;* 29:163–166.

33. **Lopez-Jaramillo P, Cohen DD, Gómez-Arbeláez D, Bosch J, Dyal L, Yusuf S, et al.** Association of handgrip strength to cardiovascular mortality in prediabetic and diabetic patients: a subanalysis of the ORIGIN trial. *Int J Cardiol 2014;* 174: 458–461.

34. **Nacul LC, Mudie K, Kingdon CC, Clark TG, Lacerda EM.** Hand Grip Strength as a Clinical Biomarker for ME/CFS and Disease Severity. *Front Neurol 2018;* 9:992. doi: 10.3389/fneur. 2018.00992.

35. **Beaudart C, McCloskey E, Bruyere O, Reginster JY, Biver E.** Sarcopenia in daily practice: assessment and management. *BMC Geriatr 2016;* 16: 170. doi: 10.1186/s12877-016-0349-4.

36. **Cesari M, Kritchevsky SB, Newman AB, Simonsick EM, Harris TB, Penninx BW, et al.** Added value of physical performance measures in predicting adverse healthrelated events: results from the Health, Aging And Body Composition Study. *J Am Geriatr Soc 2009;* 57(2):251-259.

37. **Jones CJ, Rikli RE, Beam WC.** A 30-s chair-stand test as a measure of lower body strength in community-residing older adults. *Res Q Exerc Sport 1999;* 70(2): 113-119.

38. **Tosato M, Marzetti E, Cesari M, Savera G, Miller RR, Bernabei R, et al.** Measurement of muscle mass in sarcopenia: from imaging to biochemical markers. *Aging Clin Exp Res 2017;* 29: 19–27.

39. **Studenski SA, Peters KW, Alley DE, Cawthon PM, McLean RR, Harris TB, et al.** The FNIH sarcopenia project: rationale, study description, conference recommendations, and final estimates. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2014;* 69(5): 547-558.

40. **Gould H, Brennan SL, Kotowicz MA, Nicholson GC, Pasco JA.** Total and appendicular lean mass reference ranges for Australian men and women: the Geelong osteoporosis study. *Calcif Tissue Int 2014;* 94(4): 363-372.

41. **Sergi G, De Rui M, Veronese N, Bolzetta F, Berton L, Carraro S, et al.** Assessing appendicular skeletal muscle mass with bioelectrical impedance analysis in free-living Caucasian older adults. *Clin Nutr 2015;* 34(4): 667-673.

42. **Bruyere O, Beaudart C, Reginster J-V, Buckinx F, Schoene D, Hirani V, et al.** Assessment of muscle mass, muscle strength and physical performance in clinical practice: an international survey. *Eur Geriatr Med 2016;* 7: 243–246.

43. **Abellan van Kan G, Rolland Y, Andrieu S, Bauer J, Beauchet O, Bonnefoy M, et al.** Gait speed at usual pace as a predictor of adverse outcomes in communitydwelling older people an International Academy on Nutrition and Aging (IANA) Task Force. *J Nutr Health Aging 2009;*13(10): 881-889.

44. **Peel NM, Kuys SS, Klein K.** Gait speed as a measure in geriatric assessment in clinical settings: a systematic review. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2013;* 68(1): 39-46.

45. **Studenski S, Perera S, Patel K, Rosano C, Faulkner K, Inzitari M, et al.** Gait speed and survival in older adults. *JAMA 2011;* 305(1): 50-58.

References

46. **Curcio F, Ferro G, Basile C, Liguori I, Parrella P, Pirozzi F, et al.** Biomarkers in sarcopenia: a multifactorial approach. *Exp Gerontol 2016;*85:1-8.

47. **Bloom I, Shand C, Cooper C, Robinson S, Baird J.** Diet quality and sarcopenia in older adults: a systematic review. *Nutrients 2018;* 10(3):308. doi: 10.3390/nu10030308.

48. **Sayer AA, Syddall H, Martin H, Patel H, Baylis D, Cooper C.** The developmental origins of sarcopenia. *J Nutr Health Aging 2008;* 1 2(7): 427-432.

49. **Locquet M, Beaudart C, Hajaoui M, Petermans J, Reginster J-Y, Bruyere O.** Three-year adverse health consequences of sarcopenia in community-dwelling older adults according to 5 diagnosis definitions. *J Am Med Direct Assoc 2019;* 20: 43–46.

50. **Tournadre A, Vial G, Capel F, Soubrier M, Boirie Y.** Sarcopenia. *Joint Bone Spine 2018;* 86: 39–45.

51. **Landi F, Marzetti E, Martone AM, Bernabei R, Onder G.** Exercise as a remedy for sarcopenia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2014;* 17(1): 25-31.

52. **Zaleski AL, Taylor BA, Panza GA, Wu Y, Pescatello LS, Thompson PD, Fernandez AB.** Coming of age: considerations in the prescription of exercise for older adults. *Methodist DeBakey Cardiovasc J 2016;* 12: 98–104.

53. **Murad MH, Elamin KB, Abu Elnour NO, MB Elamin, AA Alkatib, MM Fatourechi, et al.** Clinical review: the effect of vitamin D on falls: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab 2011;* 96: 2997–3006.

54. **Hansen KE, Johnson RE, Chambers KR, Johnson MG, Lemon CC, Vo TNT, Marvdashti S.** Treatment of vitamin D insufficiency in postmenopausal women: a randomized clinical trial. *JAMA Intern Med 2015;* 175(10): 1612-1621.

55. **Deutz NEPP, Bauer JM, Barazzoni R, Biolo G, Boirie Y, Bosy-Westphal A, et al.** Protein intake and exercise for optimal muscle function with aging: recommendations from the ESPEN *Expert Group. Clin Nutr 2014;* 33(6): 929-936.

56. **Borba VZC, Costa TL, Moreira CA, Boguszewski CL.** Mechanisms of endocrine disease: Sarcopenia in endocrine and non-endocrine disorders. *Eur J Endocrinol 2019;* 180(5): R185-R199. doi: 10.1530/EJE-18-0937.

57. **Chalé A, Cloutier GJ, Hau C, Phillips EM, Dallal GE, Fielding RA.** Efficacy of whey protein supplementation on resistance exerciseinduced changes in lean mass, muscle strength, and physical function in mobility-limited older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2013;* 68(6): 682-690.

58. **Beaudart C, Dawson A, Shaw SC, Harvey NC, Kanis JA, Binkley N, et al.** Nutrition and physical activity in the prevention and treatment of sarcopenia: systematic review. *Osteoporos Int 2017;* 28(6):1817-1833.

59. **Bauer JM, Verlaan S, Bautmans I, Brandt K, Donini LM, Maggio M, et al.** Effects of a vitamin D and leucine-enriched whey protein nutritional supplement on measures of sarcopenia in older adults, the PROVIDE Study: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Med Dir Assoc 2015;* 16(9): 740-747.

60. **Kreider RB, Kalman DS, Antonio J, Ziegenfuss TN, Wildman R, Collins R, et al.** International Society of Sports Nutrition position stand: safety and efficacy of creatine supplementation in exercise, sport, and medicine. *J Int Soc Sports Nutr 2017;* 14:18. doi:10.1186/s12970-017-0173-z.

61. **Dalton JT, Barnette KG, Bohl CE, Hancock ML, Rodriguez D, Dodson ST, et al.** The selective androgen receptor modulator GTx-024 (enobosarm) improves lean body mass and physical function in healthy elderly men and postmenopausal women: results of a double-blind, placebo-controlled phase II trial. *J Cachexia, Sarcopenia Muscle 2001;* 2(3): 153-161.

62. **Ferrando AA, Sheffield-Moore M, Paddon-Jones D, Wolfe RR, Urban RJ.** Differential anabolic effects of testosterone and amino acid feeding in older men. *J Clin Endocrinol Metab 2003;* 88(1): 358–362.

63. **van Kan GA.** Epidemiology and consequences of sarcopenia. *J Nutr Health Aging 2009;* 13(8): 708-712.

Address for correspondence:

Д-р Гергана Тошева Маринова
Клиника по Ендокринология УМБАЛ „Св. Марина“, Варна
9010 Варна, бул. „Хр. Смирненски“ 1,
e-mail: gergana_tosheva@abv.bg

Gergana Tosheva Marinova, MD
Clinic of Endocrinology University Hospital „St. Marina“, Varna
9010 Varna, 1 „Hr. Smirnenski„ Blvd
Tel. 0035952/978361
e-mail: gergana_tosheva@abv.bg

Зонулин, повишена чревна пропускливост и тиреоидит на Хашимото – систематичен преглед

Томов, Десислав Г.[1], Левтерова, Боряна А.[2], Михайлова, Валентина Н.[3], Троев, Димитър М.[4], Орбецова, Мария М.[4]

[1] Катедра Биоорганична химия, Фармацевтичен факултет,
[2] Катедра Здравен мениджмънт и Икономика на здравеопазването, Факултет по Обществено здраве,
[3] Катедра Медицинска Биология, Медицински факултет,
[4] Катедра Ендокринология, Медицински факултет,
Медицински университет – Пловдив

Постъпване: 16. 12. 2020 /Приемане: 22. 02. 2021

Zonulin, Increased Intestinal Permeability and Hashimoto's Thyroiditis – Systematic Review

Tomov, Desislav G.[1], Levterova, Boryana A.[2], Mikhailova, Valentina N.[3], Troev, Dimitar M.[4], Orbetzova, Maria M.[4]

[1] Department of Bioorganic chemistry, Faculty of Pharmacy,
[2] Department of Health Management and Health Economics, Faculty of Public Health,
[3] Department of Medical Biology, Faculty of Medicine,
[4] Department of Endocrinology, Faculty of Medicine,
Medical University of Plovdiv

Submitted:16. 12. 2020 /Accepted: 22. 02. 2021

Резюме

Епителът е основно място на взаимодействие на организма с околната среда. Зонулинът е 47 kDa протеин, регулиращ плътните връзки между клетките в различни тъкани и органи на човешкия организъм. В червата по-високата му концентрация се свързва с отваряне на плътните връзки между ентероцитите и повишаване на чревната пропускливост. Това дава възможност на бактерии, части от бактерии и токсини да навлизат в организма и да осъществяват контакт с имунната му система. Тиреоидитът на Хашимото е едно от най-честите автоимунни заболявания, чието разпространение се увеличава в световен мащаб. Има данни, че нивата на зонулин са повишени при тиреоидит на Хашимото.

Abstract

The epithelium is the main site of interaction of the organism with the environment. Zonulin is a 47 kDa protein that regulates the tight connections between cells in various tissues and organs in the human body. In the intestine, its increased concentration is associated with the opening of the tight connections between enterocytes and an increase of the intestinal permeability. The latter makes it possible for some bacteria, parts of bacteria and toxins to enter the body and to come into contact with the immune system. Hashimoto's thyroiditis is one of the most common autoimmune diseases, the prevalence of which is increasing worldwide. Zonulin levels have been reported to be elevated in Hashimoto's thyroiditis.

Целта на този обзор е да представи данни от проведени до момента проучвания върху възможните връзки между наличието на повишена чревна пропускливост и автоимунния тиреоидит на Хашимото.

The aim of this review is to summarize the data from studies conducted to date on the possible link between the presence of increased intestinal permeability and Hashimoto's autoimmune thyroiditis.

Ключови думи:

зонулин, чревна пропускливост, автоимунни заболявания, тиреоидит на Хашимото

Key words:

zonulin, intestinal permeability, autoimmune diseases, Hashimoto's thyroiditis

Въведение

Човешкият организъм взаимодейства с микроорганизмите във външната среда чрез епителната тъкан. Епителните клетки са плътно долепени една до друга, като по този начин формират плътна стена, отделяща вътрешната среда на организма. Това определя основните им функции – да защитават организма от външни влияния (токсини, патогени, алергени и др.), и да не допускат загуба на важни вещества от вътрешната среда на организма. Заедно с това епителът има и входни врати, през които селективно да пропуска навътре важни за организма хранителни вещества, електролити и вода. От критична важност за бариерната функция е създаването на много здрави връзки между епителните клетки. Клетките се свързват по между си с множество различни типове връзки – десмозоми, плътни връзки, прикрепващи връзки и комуникативни връзки. Кадхерините са голяма група белтъци (над 100), участваща в изграждането на десмозомите и прикрепващите връзки, и основен елемент на клетъчната сигнализация (1). Плътните връзки се изграждат от оклудини, клаудини, адхезионни молекули и периферни мембранни протеини, като основна роля играят клаудините. Промените в експресията на тази група протеини (24 известни до момента) определят трайно ефективността на плътните връзки (2, 3). Функцията на различните връзки е свързана с тяхното местоположение – в апикалната си част клетките се свързват помежду си плътно чрез т.нар. плътни връзки (tight junctions, TJ), а в останалата част – чрез десмозоми, прикрепващи и комуникативни връзки.

Епителният слой има различна пропускливост в зависимост от неговото разположе-ние в организма и функциите, които трябва да изпълнява. В сравнение с епитела на кожата, пикочния мехур и стомаха чревният епител е с най-голяма пропускливост, което е обусловено от основната му функция да пропуска хранителни вещества и течности от чревния лумен към кръвното русло (4). Традиционно, за главна функция на епитела на стомашно-чревния тракт се приема усвояването на хранителни вещества и електролити. По-задълбочено разглеждане на анатомичните и функционални му особености показват и важна способност за регулация на транспорта на макромолекули между околната среда и вътрешната среда на организма чрез бариерен механизъм (5).

Основен регулатор на този транспорт са плътните връзки между епителните клетки. Единственият физиологичен модулатор на плътните връзки между клетките, който може да бъде изследван като маркер за повишена чревна пропускливост е зонулинът (6, 7). Той представлява протеин с маса 47 kDa, структурно идентичен с предшественика на хаптоглобин-2, известен и като прехаптоглобин-2 (pre-HP2) (8) *(Фиг.1)*. Зонулинът се явява естествен регулатор, отговорен за транспорта на течности, макромолекули и левкоцити между кръвоносната система на организма и чревния лумен, и по този начин контролира механизма на колонизацията с микроорганизми.

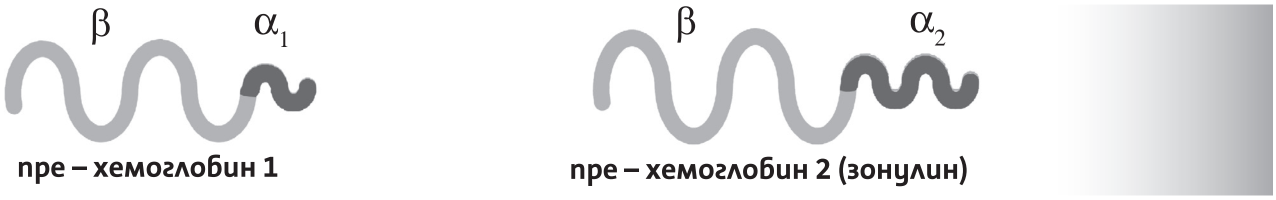
Целта на настоящото проучване е да се анализират данните в литературата за зонулин като маркер за повишена чревна пропускливост и връзката му с едно от най-честите автоимунни заболявания – тиреоидита на Хашимото.

Материали и методи

Проведено е систематично търсене в достъпните пълно текстови и електронни бази данни. Прегледът е ограничен до статии, които изследват:

1) ролята на зонулина като маркер за повишена чревна пропускливост;

2) връзката му с автоимунните тиреоиди-



Фигура 1. Прехаптоглобинът е изграден от 1 α- и 1 β-верига. Двата прекурсора се различават единствено по дължината на α-веригата.

ти – тиреоидит на Хашимото.
От обзора са изключени: 1) други автоимунни заболявания.

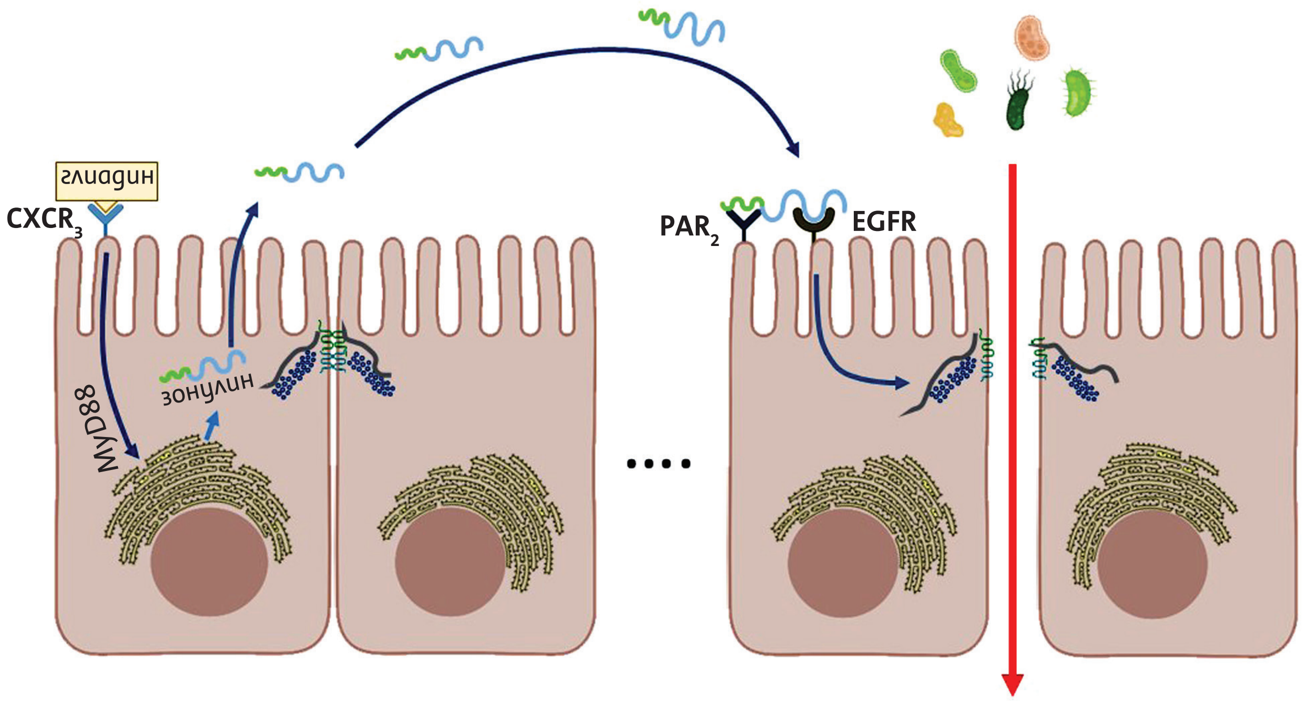
Извършен е преглед на бази данни Scopus, Web of Science и PubMed за публикувани статии на английски език за периода от 2010 до 2021 г. Анализирани са 306 оригинални статии и 47 обзорни публикации. Използвани са следните термини за търсене: „зонулин", „автоимунни заболявания", „ендокринни заболявания", „тиреоидит на Хашимото" От тях в настоящия обзор са включени 34 статии, които отговарят на включващите и изключващите критерии.

Резултат и обсъждане

Тиреоидит на Хашимото – епидемиология и етиология

Автоимунните заболявания бележат чувствителен ръст в последните години в западното общество (9). В световен мащаб тиреоидитът на Хашимото е едно от най-често срещаните автоимунни заболявания на щитовидната жлеза. Честотата му е около 5% и в по-голяма степен засяга лицата от женски пол (10). Тиреоидитът на Хашимото се характеризира с наличие на циркулиращи антитела – тиреоглобулинови (ТАТ) микрозомални или антипероксидазни (ТПО) и ТСХ-рецепторни блокиращи антитела. ТПО се откриват при 95-100% от болните, инхибирайки ензимната активност те се явяват един от факторите, обуславящи намалена функция на жлезата. ТАТ оказват индиректен цитотоксичен ефект. В малка част от болните се откриват и стимулиращи ТСХ-рецепторни антитела, които водят до хиперфункция, както при Базедова болест (Хашитоксикоза). Характерът на протичането зависи от преобладаващите антитела – стимулиращи, блокиращи или деструктивни, като е възможен преход от един към друг тип, което се отразява на клиничното протичане. Обикновено клетъчния имунен отговор, включващ Th1, Th17, най-често води до атакуване на тироцитите и клетъчна смърт, докато този включващ Th2, се свързва със секреция на TSH-рецепторни антитела, растеж на тироцитите и развитие на хипертиреоидизъм (11). Определящи за расовата, фамилната и индивидуалната предиспозиция са генетичните фактори (12). Резултатите от проведените изследвания показват наличие на фамилна обремененост при развитие на това заболяване, като вероятността за появата му при братя и сестри е в интервала 20%-30%, а при еднояйчни близнаци дори по-висока – между 29% и 55% (13). Данните не са еднозначни – друго проучване проведено в Дания с еднояйчни и разнояйчни близнаци показва, че при 55% от еднояйчните близнаци се развива заболяването, но при 0% от разнояйчните, което показва основното влияние, което имат факторите на външната среда. Асоциацията с HLA системата е документирана при кавказката популация. Алелът DR_5 от $HLAB_8/DR_5$ е свързан с продукция на стимулиращи растежа антитела, и носителите му са склонни към развитие на хипертрофичната форма на заболяването. Атрофичната форма на заболяването се свързва с алела DR_3 от $HLAB_8/DR_3$.

Изглежда че за етиологията на заболяването генетичните фактори допринасят само отчасти. Aydin и сътр. установяват при деца по-високи нива на зонулин (59,1±22,9 ng/mL) в групата с тиреоидит на Хашимото, в сравнение с групата с вроден хипотиреоидизъм (43,3±32,9 ng/mL) (14). В друго проучване, отново с деца с тиреоидит на Хашимото, Küçükemre и сътр. също намират повишени нива на зонулин, които освен това корелират с тежестта на заместителната терапия (15). В наше пилотно проучване по проект на МУ, Пловдив върху 61 лица с доказан тиреоидит на Хашимото, от които 52 (85,2%) жени и 9 (14,8%) мъже установяваме, че нивата на серумния зонулин са значително по-високи (97,7±46,9 ng/mL), в сравнение с референтни стойности при здрава популация (34±14 ng/mL), $p<0{,}05$. Най-високи са стойностите на зонулина при пациентите с тиреоидит на Хашимото, протичащ с хипотиреоидизъм (105,5±47,6 ng/mL). Нивата на зонулин положително корелират с теглото и индекса на телесна маса ($r = 0{,}392$, $p = 0{,}04$) *(непубликувани данни)*.



Фигура 2.

Активация на зонулиновата секреция от глиадиновите фрагменти на глутена през CXCR3 рецепторите. Зонулинът отваря плътните връзки и повишава чревната пропускливост чрез активиране на фосфорилирането на белтъците, участващи в изграждането им, осигурявайки контакт на антигените с имунните клетки, разположени в мукозата на епитела.

Автоимунни заболявания и повишена чревна пропускливост

Заболяванията на щитовидната жлеза често са свързани с нарушена функция на гастроинтестиналния тракт – *цьолиакия* или *глутенова чувствителност*. Цьолиакията е широко разпространено заболяване обхващащо около 1% от световното население, често протичаща с неспецифични оплаквания или дори безсимптомно (16). При това заболяване глиадинът се свързва със специфичния хемокинов рецептор CXCR3 и стимулира повишената секреция на зонулин (17) *(Фиг. 2)*. Наличието на генетична предиспозиция, по-специално HLA-DQ_2 и HLA-DQ_8 е доказана при почти всички пациенти с цьолиакия, но не е достатъчен фактор за развитие на заболяването – HLA-DQ_2 се среща при повече от 1/3 от здравите (18). От друга страна, наличието на генетична предиспозиция може да се докаже и чрез измененията в плътните връзки между ентероцитите при родственици на пациенти с цьолиакия, които не са развили клиничната картина на заболяването (19). *Глутеновата чувствителност* е състояние различно от цьолиакията, при което освен глутенът и други съставки на храната могат да предизвикат подобна клинична картина, като зърнените амилаза-трипсин инхибитори или късо верижните въглехидрати с трудна резорбция (20). Цьолиакията, както и глутеновата чувствителност, често остават недиагностицирани за дълъг период от време (21, 22).

Възможната връзка между автоимунния тиреоидит и цьолиакията или глутеновата чувствителност е именно нарушената регулация на плътните връзки в тънките черва, позволяваща контакт на алергени от околната среда с имунната система на организма, 70% от която е съсредоточена в свързаната с червата лимфна тъкан (23, 24).

Микробиот и щитовидна жлеза

Съществува двупосочна връзка между микробиота и човешкия организъм. От една страна са секретираният от клетките мукусен слой, секреторни имуноглобулини, дефензини и левкоцитите в лумена, а от друга – влиянието на микробиота върху имунната система на организма чрез взаимодействието ѝ с лимфоидната тъкан в червата (25, 26). Хормоните на щитовидната жлеза влияят пряко върху развитието и диференциацията на чревните епителни клетки, и така – върху непрекъснатата регенерация на епителния слой, през който се извършват тези взаимодействия. Намалените нива на тиреоидни хормони се свързват и с намалена перисталтика, констипация и дори илеус (27). Допълнително, промяната в перисталтиката води до изменения в чревната микробиота и прави възможно колонизиране на крайните отдели на тънкото черво. Съставът на микробиота също влияе до голяма степен върху дейността на щитовидната жлеза чрез промени в обмяната на екзогенни и ендогенни йодтиронини, селен и йод (28). Елементът йод е есенциален за нормалното функциониране на щитовидната жлеза, и нормално се включва в тирозиновите остатъци на тиреоглобулина. Повишеният прием на йод се свързва от една страна с повишаване на съдържанието на йод в тиреоглобулина, той става по-имуногенен и може да доведе до активация на Т-клетките, а от друга - с директна активация на макрофаги, дендритни клетки и повишаване на циркулиращите В- и Т-клетки и стимулация на синтеза на имуноглобулини (29). Селенът участва в състава на редица ензими (глутатион перокисидази, тиоредоксин редуктази), предпазващи тиреоцитите от действието на кислородните радикали, като неговият недостиг се свързва с висок риск от развитие на автоимунен тиреоидит (13).

Голямото видово многообразие на микробиота обикновено се свързва с ниски нива на зонулин, и обратно (30). Дисбиозата често се наблюдава при пациенти с тиреоидит на Хашимото – съставът на микробиота установен с помощта на 16s рибозомно секвениране показва чувствително намалено видово разнообразие, с относително намаляване на представителите на *Bifidobacterium, Fecalibacterium, Lachnospira* и *Roseburia* (31). Като потвърждение на това - приемът на пробиотик достоверно намалява секрецията на зонулин и намалява вероятността от бактериално проникване (32). Бивайки основна бариера пред навлизането във вътрешната среда на организма, плътните връзки между клетките и модификацията им се явяват основна цел за микроорганизмите (33). Зонулинът получава своето име поради сходство с Zonula occludens – токсинът, отделян от Vibrio cholerae. Възможно е, обаче, и други микроорганизми да притежават гени за синтез на протеини с подобно на зонулина действие. В проучване върху Campylobacter concisus Zhang и сътр. са установили, че някои щамове на тази нормално обитаваща устната кухина бактерия са придобили гена за синтез на свързващия домейн на zonula occludens toxin, а освен това съдържат и данни за свързващия домейн на човешкия зонулин (34). Този ген може да бъде предаден чрез хоризонтален генен трансфер, което да осигури повишена чревна пропускливост дори при хора без наличие на ген за синтез на прехаптоглобин-2. Проучванията върху микробиота и връзката с тиреоидита на Хашимото са ограничени, вероятно и поради все още високата цена на 16s рибозомното секвениране.

Заключение

Повишената чревна пропускливост, идентифицирана чрез повишените нива на зонулин в циркулацията, се проучва като важен фактор за развитие на автоимунен тиреоидит на Хашимото. Проведените до момента малък брой проучвания, включително и нашето, показват асоциация на този хроничен автоимунен тиреоидит с повишени нива на зонулина, както и корелация на последния с тежестта на засягане на функцията на щитовидната жлеза. При прегледа на литературата не се откриват експериментални данни за налична пряка причинно-следствена връзка между промените в чревния микробиот и възникването на автоимунния тиреоидит на Хашимото. С оглед нарастващата честота на заболяването и търсенето на нови методи за превенция и лечение са необходими целенасочени бъдещи проучвания за изясняване асоциацията му с повишената чревна пропускливост.

Благодарности

Проучването се осъществява с финансовата подкрепа на Медицински Университет – Пловдив (Проект № ДПДП-15/2019).

References

1. **Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C published by WHF.** Molecular Cell Biology Ed.W. H. Freeman; Fifth edition (August 1, 2003); 2003. 973 p. Available from: https://www.amazon.com/Molecular-Cell-Biology-Harvey-Lodish/dp/0716743663

2. **Khan N, Asif AR.** Transcriptional regulators of claudins in epithelial tight junctions. *Mediators Inflamm 2015;*2015:219843.

3. **Sapone A, de Magistris L, Pietzak M, Clemente MG, Tripathi A, Cucca F, et al.** Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes 2006;* 55(5):1443–1449.

4. **Kosińska A, Andlauer W.** Modulation of tight junction integrity by food components. *Food Res Int 2013;* 54(1): 951–960.

5. **Marchiando AM, Graham WV, Turner JR.** Epithelial barriers in homeostasis and disease. *Annu Rev Pathol 2010;* 5:119–144.

6. **Wang W, Uzzau S, Goldblum SE, Fasano A.** Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J Cell Sci 2000;*113 Pt 24:4435–4440.

7. **Lammers KM, Fasano A, Tripathi A, Buzza MS, Vogel SN, Yang S, et al.** Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2. *Proc Natl Acad Sci 2009;*106(39):16799–16804.

8. **Fasano A.** Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: The biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev 2011;*91(1):151–175.

9. **Lerner A, Jeremias P, Matthias T.** The world incidence and prevalence of autoimmune diseases is increasing. *Int J Celiac Dis 2015;*3(4):151–155.

10. **Antonelli A, Ferrari SM, Corrado A, Di Domenicantonio A, Fallahi P.** Autoimmune thyroid disorders. *Autoimmun Rev 2015;*14(2):174–180.

11. **Zaíe T, Skuja S, Lejnieks A, Groma V, Konrâde I.** Immunological mechanisms of autoimmune thyroid diseases : a shift in the traditional Th1/Th2 paradigm. 2019;73(2):67–77.

12. **Orbetzova M.** Diseases of thyroid gland. Section *„Endocrinology" pp. 529-687*. In „Internal Diseases" Ed. F. Nikolov. *Publisher „Laks Book", Plovdiv,* 2020; ISBN 978-619-189-145-0 (in Bulgarian)[**Орбецова М.** Заболявания на щитовидната жлеза. Раздел „Ендокринология" В *„Вътрешни болести"* стр.529-687. Ред. Ф. Николов. *Издателство „Лаксбук", 2020;* ISBN 978-619-189-145-0].

13. **Ragusa F, Fallahi P, Elia G, Gonnella D, Paparo SR, Giusti C, et al.** Hashimotos' thyroiditis: Epidemiology, pathogenesis, clinic and therapy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2019;* 33(6):101367. Available from: https://doi.org/10.1016/j.beem.2019.101367

14. **Aydın BK, Yıldız M, Akgün A, Topal N, Adal E, Önal H.** Children with hashimoto's thyroiditis have increased intestinal permeability: Results of a pilot study. *J Clin Res Pediatr Endocrinol 2020;* 12(3):303–307.

15. **Küçükemre Aydın B, Yıldız M, Akgün A, Topal N, Adal E, Önal H.** Children with Hashimoto's Thyroiditis Have Increased Intestinal Permeability: Results of a Pilot Study. *J Clin Res Pediatr Endocrinol 2020;*12(3):303–307.

16. **Rallabhandi P.** Gluten and celiac disease-an immunological perspective. *J AOAC Int 2012;* 95(2): 349–355.

17. **Lammers KM, Khandelwal S, Chaudhry F, Kryszak D, Puppa EL, Casolaro V, et al.** Identification of a novel immunomodulatory gliadin peptide that causes interleukin-8 release in a chemokine receptor CXCR3-dependent manner only in patients with coeliac disease. *Immunology 2011;* 132(3): 432–440.

18. **Denham JM, Hill ID.** Celiac disease and autoimmunity: review and controversies. *Curr Allergy Asthma Rep 2013;*13(4):347–353.

19. **Mishra A, Prakash S, Sreenivas V, Das TK, Ahuja V, Gupta SD, et al.** Structural and Functional Changes in the Tight Junctions of Asymptomatic and Serology-negative First-degree Relatives of Patients with Celiac Disease. *J Clin Gastroenterol 2016;*50(7):551–560.

20. **Catassi C, Bai JC, Bonaz B, Bouma G, Calabrò A, Carroccio A, et al.** Non-celiac gluten sensitivity: The new frontier of gluten related disorders. *Nutrients 2013;*5(10):3839–3853.

21. **Catassi C.** Gluten sensitivity. *Ann Nutr Metab 2015;*67):16–26.

22. **Fasano A, Sapone A, Zevallos V, Schuppan D.** Nonceliac gluten sensitivity. *Gastroenterology 2015;*148(6):1195–1204. Available from: http://dx.doi.org/10.1053/ j.gastro.2014.12.049

23. **Fasano A.** Intestinal zonulin : open sesame ! *Gut 2001;*49: 159–162.

24. **Knezevic J, Starchl C, Berisha AT, Amrein K.** Thyroid-gut-axis: How does the microbiota influence thyroid function? *Nutrients 2020;*12(6):1–16.

25. **Hooper L V, Littman DR, Macpherson AJ.** Interactions between the microbiota and the immune system. *Science. 2012;*336(6086):1268–1273.

26. **Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, et al.** Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science 2012;*336(6086):1262–1267.

27. **Caturegli P, De Remigis A, Rose NR.** Hashimoto thyroiditis: clinical and diagnostic criteria. *Autoimmun Rev 2014;*13(4–5):391–397.

28. **Virili C, Centanni M.** Does microbiota composition affect thyroid homeostasis? *Endocrine 2015;*49(3):583–587.

29. **Rose NR, Bonita R, Burek CL.** Iodine: An environmental trigger of thyroiditis. *Autoimmun Rev 2002;*1(1–2):97–103.

30. **Mokkala K, Röytiö H, Munukka E, Pietilä S, Ekblad U, Rönnemaa T, et al.** Gut microbiota richness and composition and dietary intake of overweight pregnant women are related to serum zonulin concentration, A marker for intestinal permeability. *J Nutr 2016;* 146(9): 1694–1700.

31. **Leiva-Gea I, Sánchez-Alcoholado L, Martín-Tejedor B, Castellano-Castillo D, Moreno-Indias I, Urda-Cardona A, et al.** Gut microbiota differs in composition and functionality between children with type 1 diabetes and MODY2 and healthy control subjects: A case-control study. *Diabetes Care 2018;*41(11):2385–2395.

32. **Liu Z-H, Huang M-J, Zhang X-W, Wang L, Huang N-Q, Peng H, et al.** The effects of perioperative probiotic treatment on serum zonulin concentration and subsequent postoperative infectious complications after colorectal cancer surgery: A double-center and double-blind randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr 2013;*97(1):117–126.

33. **Guttman JA, Finlay BB.** Tight junctions as targets of infectious agents. *Biochim Biophys Acta 2009;*1788(4):832–841.

34. **Zhang L, Lee H, Grimm MC, Riordan SM, Day AS, Lemberg DA.** Campylobacter concisus and inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol 2014;*20(5):1259–1267.

Address for correspondence:

Десислав Г. Томов,

ул. Братя Бъкстон 120, сграда НИМУ, МУ,
Пловдив 4004, България,
e-mai:desislavtomov@gmail.com

Desislav G. Tomov,

120 Bratya Bukston str.,
Medical University of Plovdiv,
Plovdiv 4004, Bulgaria,
e-mai:desislavtomov@gmail.com

Антимюлеров хормон при жени със захарен диабет тип 1

Илиева, Мария И., Орбецова, Мария М.
Клиника по Ендокринология и болести на обмяната,
УМБАЛ „Св. Георги“, Катедра по Ендокринология, МФ, МУ, Пловдив

Постъпване: 10. 02. 2021 / *Приемане:20. 02. 2021*

Anti-Müllerian Hormone in Women with Diabetes Mellitus Type 1

Ilieva, Maria I., Orbetzova, Maria M.
Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases,
„Sv. Georgy“, University Hospital, Department of Endocrinology, MF, MU, Plovdiv

Submitted: 10. 02. 2021 / *Accepted: 20. 02. 2021*

Резюме

Анти Мюлеровият хормон (АМХ) е хомодимерен гликопротеин, който произхожда от пре-антралните и малките антрални фоликули на гранулоза клетките при жени в репродуктивно активна възраст. В клиничната практика АМХ е най-широко използваният биомаркер за овариален резерв, предиктор за възрастта на настъпване на менопауза, показател за придружаваща овариална дисфункция.

Захарен диабет (ЗД) тип 1 е хронично метаболитно заболяване, характеризиращо се с нарушена продукция на инсулин от панкреаса в резултат на β-клетъчна деструкция. За разлика от диабетната микроангиопатия, макроангиопатия и невропатия, които са подробно изучени хронични усложнения на заболяването, репродуктивните отклонения са сред слабо изследвните нарушения при ЗД тип 1. Спектърът на ендокринна патология при жени със заболяването варира от забавено менархе и пубертет, през менструални нарушения и повишена честота на синдрома на поликистозни яйчници (PCOS), до потенциално ранна менопауза.

Ролята на АМХ в патогенезата на жени със ЗД тип 2 и PCOS е по-подробно проучена в световната литература, за разлика от изследванията за влиянието на хормона при ЗД тип 1, които са ограничени по брой и противоречиви като резултати. Повишаващата се честота на млади жени със ЗД тип 1, търсещи ендокринна помощ за своите репродуктивни проблеми, е предизвикателство за практикуващия ендокринолог.

Ключови думи:

антимюлеров хормон, захарен диабет тип 1, репродуктивни нарушения, синдром на поликистозни яйчници.

Abstract

Anti-Müllerian hormone (AMH) is a homodimeric glycoprotein, reflecting the number of ovarian preantral and small antral follicles, expressed by granulosa cells in fertile women. In clinical practice AMH serves as a molecular biomarker for the ovarian reserve, can be used to predict the timing of menopause as well as having potential as a marker for ovarian dysfunction. Diabetes mellitus type 1 (DMt1) is a chronic metabolic disease, which is characterized by a lack of insulin production from the beta cells of the pancreas as a result of b-cell destruction. Diabetic microangiopathy, macroangiopathy and neuropathy are well known chronic complications of the disease, unlike the reproductive disturbances.

The spectrum of reproductive health issues in DMt1 encompasses delayed puberty and menarche, menstrual cycle abnormalities and polycystic ovary syndrome (PCOS) like phenotype, as well as potentially early menopause. There is a well known association between AMH and the pathogenesis of DMt2 and PCOS. The results concerning DMt1 and AMH are few and contradictory. Because of the growing number of young women with DMt1, endocrinologists have to be aware of their reproductive disorders.

Key words:

AMH, diabetes mellitus type 1, reproductive disorders, polycystic ovary syndrome.

Въведение

Антимюлеровият хормон (АМХ) е хомодимерен гликопротеин, първоначално известен като вещество, инхибиращо Мюлеровите канали във връзка с разработките на френския ендокринолог Алфред Джост за влиянието на хормона върху ранното ембрионално развитие и половото диференциране през 40-те и 50-те години на миналия век (1). Продукцията на АМХ от Сертолиевите клетки стартира от 7 г. с. и предизвиква регресия на Мюлеровите канали, позволявайки на Волфовите под влияние на тестостерона да се развият в мъжка репродуктивна система. Представата, че АМХ има не само строго специфична мъжка полова роля, а активно участва в яйчниковата функция и, особено, в растежа на фоликулите, е ключов момент за насоченото му изследване и интерпретиране и при жени през 90-те години на ХХ век (2).

АМХ принадлежи към семейството на трансформиращ растежен фактор β (TGF-β), заедно с активините, инхибините, костни морфогенетични протеини (BMPs), както и фактори на растежа и диференциацията (GDFs) (3). Генът му, открит преди около 32 г., се намира на късото рамо на 19 хромозома. Крайният резултат от генната експресия е прекурсорен протеин – прохормон, който чрез протеолитично разцепване формира биологично активната форма на хормона – АМХ (NC). N-терминалният участък е отговорен за секрецията на АМХ, а С-терминалният край – за биологичната активност и афинитета за свързване със специфичния рецептор (4). Рецепторът за АМХ (AMHR) е трансмембранен протеин със серин–треонин киназна активност. Известни са 2 вида рецептори за хормона – AMHRI и AMHR II. Свободният АМХ се свързва с AMHRII с висок афинитет, което води до фосфорилиране на AMHRI (5). Експресията на AMHRII започва от яйчника веднага след раждане и продължава през целия живот. Свързването на АМХ с рецептора води до активиране на вътреклетъчна сигнална система с участието на Smad протеини, бета-катенин (β-catenin) и нуклеарен фактор кB (NFkB). При активирането на Smad протеини и последващата транслокация в ядрото се стимулира или потиска транскрипцията на специфични гени, което води до реализиране биологичните ефекти на АМХ (6). AMHRI принадлежи към костен морфогенетичен рецепторен протеин (BMPR) и е по-малко проученият от двата рецептора, но се подразделя на няколко подтипа. Три активин-рецепторни протеинкинази (Alk) са особено добре известни – Alk2, Alk3 и Alk6. Alk3 медиира действието на АМХ върху Мюлеровите канали, а 2 и 6 върху останалите мезенхимни клетки (7).

Рецепторът за АМХ се открива в Сертолиевите и Лайдиговите клетки в тестисите, тека и гранулоза клетките в яйчника, в ендометриума, простатната жлеза, дукталния епител в млечните жлези. Нещо повече, има доказателства за наличието му в туморни клетъчни линии от ендометриален, овариален и цервикален епител. Известните над 38 мутации на гена за АМХ, които водят до синдрома на персистиращите мюлерови канали (4). По-доброто познаване и активното търсене на аномалии на рецептора или гена за АМХ, би подобрило диагностиката и лечението на пациенти с репродуктивни проблеми.

Освен известната роля в полово-специфичната функция, редица нови проучвания разкриват участието на АМХ в хипофизарно-секреторните молекулни механизми и невроендокринното развитие. Действайки на централно ниво, хормонът повишава активността на гонадотропин рилийзинг хормон (ГнРХ) невроните и модулира гонадотропиновата секреция. Подпомага фоликуло-стимулиращ хормон (ФСХ) синтезата и увеличава пулсовата честота на лутеинизиращ хормон (ЛХ). Поставя се под въпрос и действието му върху неврони, участващи в контрола на ГнРХ пулсовия генератор, а именно – киспептин невроните, гама аминобутирова киселина (ГАБА) неврони (GABAergic) и агути – свързания пептид неврони (AgRP) (5). Дали повишените нива на АМХ в серума имат връзка с централни патофизиологични механизми на поликистозно – овариалния синдром и други репродуктивни нарушения, е въпрос на бъдещи разработки.

АМХ при здрави жени

АМХ се продуцира от овариалните гранулоза клетки от 36 г.с. по време на бременността до менопаузата. В неонаталния период нивата на хормона са ниски, отбелязват леко покачване няколко седмици след раждане и достигат пик около 25 годишна възраст, след което прогресивно намаляват до настъпване на менопауза (8) *(Фиг.1)*. Преантралните и малките антрални фоликули 2-8 мм са с най-висока експресия на хормона. С навлизането в ФСХ – зависимите фази на развитие (8-10 мм), синтезата се преустановява и в големите антрални и преовулаторни фоликули нивата на АМХ са недоловими (2). В атретичните фоликули и корпус лутеум липсва ексресия на АМХ. *In vivo* АМХ потиска чувствителността на фоликулите към ФСХ и има роля в селекцията на доминантен фоликул. На молекулярно нива АМХ потиска ФСХ индуцираната ароматазна активност на гранулоза клетките, намалявайки конверсията на тестостерона (Т) в естрадиол (Е2), което резултира в потискане на АМХ. В до-пълнение към стимулиращия ефект на ЛХ върху тека-клетките за производство на тестостерон, върху гранулоза-клетките ЛХ директно намалява експресията на AMHRII.

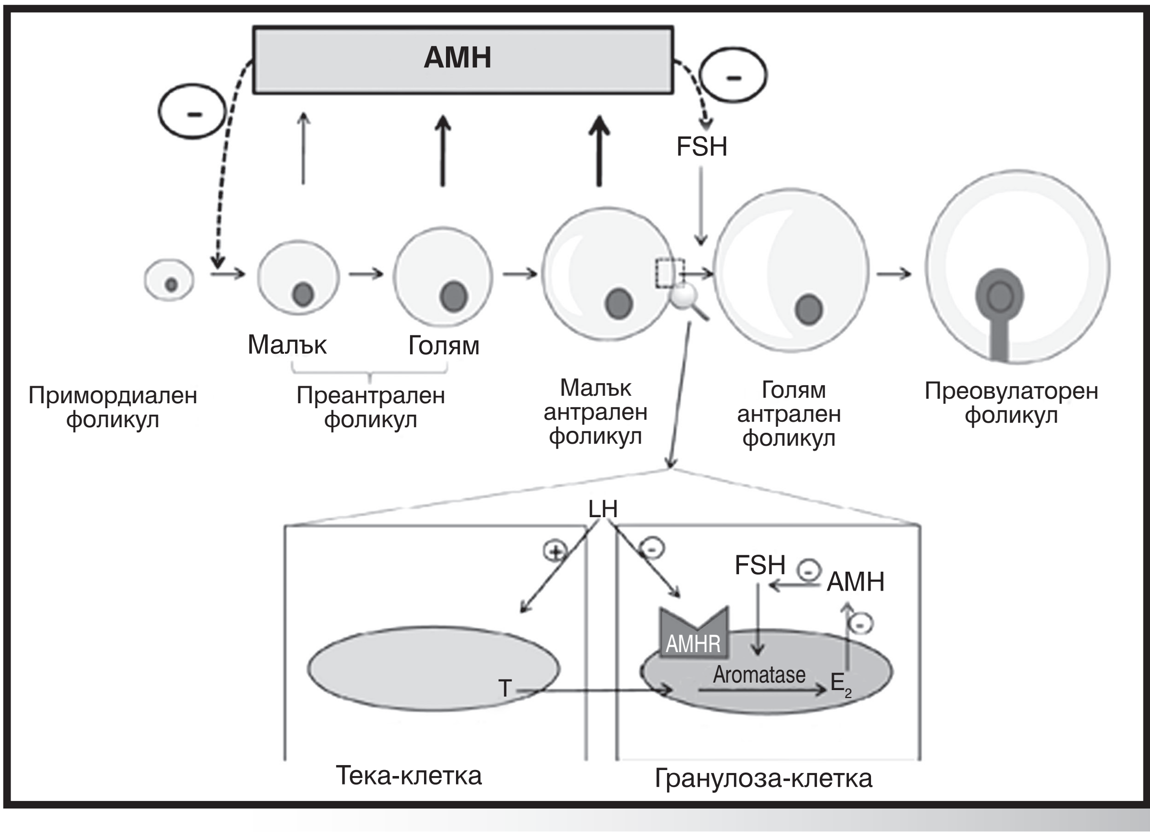
Основната роля на АМХ е участието му в регулацията на растежа и развитието на фоликулите – инхибиране на ранния фоликуларен подбор, по този начин предпазване от преждевременно изчерпване на овариалния резерв (9). АМХ, заедно с антралния фоликуларен брой (AFC), ФСХ, Инхибин В и овариалния обем, са основни биомаркери на овариалния резерв (ОР). ОР отразява количествената и качествена оценка на примордиалните фоликули, които намаляват с напредване на възрастта. При липсата на серумен маркер, който директно да установи броя на примордиалните фоликули, АМХ, отразявайки моментния пул на растящите фоликули се явява най-добрият количествен показател на ОР (10).

Подобно на останалите хормонални маркери за овариална функция – ФСХ, Е2, Инхибин Б, нивата серумен АМХ се изследват по време на ранна фоликуларна фаза. Докато първоначалните проучвания са единодушни по отношение стабилността на този показател в хода на менструалния цикъл на нормо-овулаторни жени, по-нови трудове разкриват значителни флуктуации в нивата на хормона в рамките на цикъла, вариращи до 20,7%. Интраиндивидуалните вариации предполагат, че еднократното измерване на хормона понякога би могло да даде грешна оценка на овариален резерв, което да има своите клинични последствия, особено когато стойностите се използват в протоколите за овариална стимулация (10).

Редица фактори и състояния оказват влияние върху серумните нива на АМХ, с най-голямо значение сред които са синдром на поликистозни яйчници (PCOS), оперативна интервенция на яйчниците, орални хормонални контрацептиви, затлъстяване, дефицит на Витамин D, BRCA-мутации, полиморфизъм на АМХ рецептора, бременност. Широки са клиничните показания за проследяване нивата на АМХ – при контролираната овариална стимулация, за предвиждане възрастта за настъпване на менопауза, за диференциране на нарушенията в половото развитие, при хипогонадотропен хипогонадизъм, гранулозо – клетъчни тумори, преждевременна овариална недостатъчност и пр. Към някои от по-новите индикации се отнасят жени с автоимунни заболявания (ревматоиден артрит), носителки на BRCA-мутации, и не на последно място – жени със ЗД тип 1 (2).

АМХ при синдром на поликистозни яйчници ((PCOS)

PCOS е най-често срещаното ендокринно нарушение при пременопаузални жени, с подчертано хетерогененна фенотипна изява, но с 3 основни характеристики – излишък на андрогени, овулаторна дисфункция и поликистозни яйчници. Типичната морфологична особеност на поликис-



Фигура 1.

Продукция на АМХ от яйчниковите фоликули тозните яйчници е голямото количество на антрални фоликули с размери под 8 мм. При PCOS растежът на фоликулите е прекратен междувременно и фоликуларното развитие е нарушено, супресиран е ФСХ и е невъзможна селекцията на доминантен фоликул (11).

Каква, обаче, е ролята на АМХ? Във връзка с повишения брой на преантралните и малките антрални фоликули, които са основните произвеждащи АМХ, нивата му са 2 до 4 пъти по-високи при тези жени в сравнение със здравата популация. Нещо повече – АМХ е не само маркер за фоликуларен брой, а пряк участник в патогенезата на PCOS (12). Изказана е и хипотеза, че бременните жени с PCOS и повишени нива на АМХ са с повишен риск за предаване предиспозиция за развитие на заболяването и в потомството.

В малките антрални фоликули ФСХ стимулира АМХ секреция при липса на експресия на ароматаза. При по-големите фоликули с увеличаване нивата на естрадиол и предстоящата селекция на доминантен фоликул, се потиска експресията на АМХ чрез Erβ – индиректен инхибиращ ефект на ФХ. При големите фоликули в поликистозните яйчници липсата на ФСХ индуцирана естрадиолова продукция, както и високите нива на АМХ водят до фоликуларен арест (9) *(Фиг. 2)*.

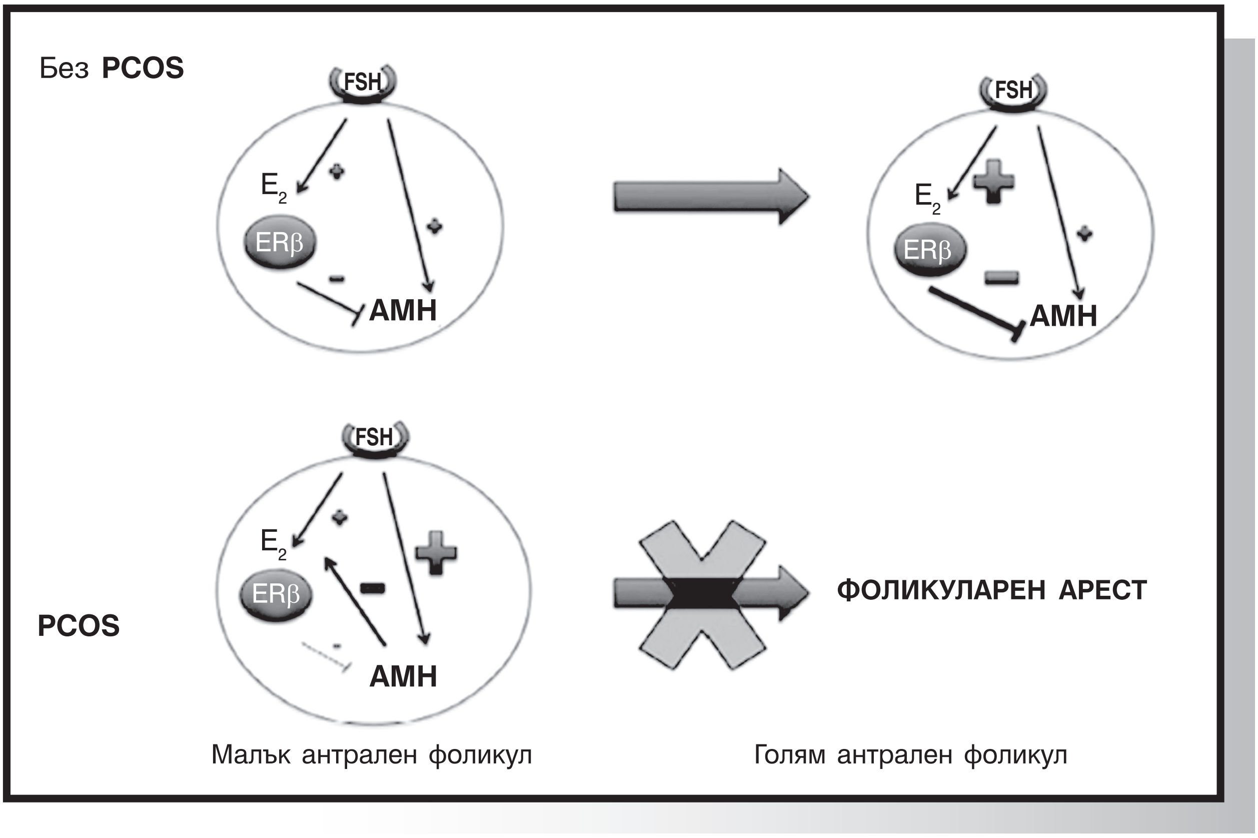
Диагностичната надеждност на АМХ при PCOS изследват Парахулева и сътр. (13) като авторите проследяват нивата на хормона при 120 жени с PCOS и 99 здрави контроли. Установяват ниво на АМХ при случаите с PCOS три пъти по-високо от това при здравите контроли. Повишени са още ЛХ, тестостерон и андростендион. Доказани са прави корелации между АМХ и ЛХ, АМХ и отношението ЛХ/ФСХ, АМХ и HOMA индекс, АМХ и хирзутизъм (оценен по скалата на Ferriman-Gallwey), АМХ и броя фоликули, АМХ и ИТМ. Случаите с PCOS, инсулинова резистентност и наднормено тегло са с изразено по-високо ниво на АМХ, отколкото жените с нормално телесно тегло. В резултат на монотерапията с метформинов препарат при инсулинорезистентни случаи с PCOS е отчетено значимо понижение в серумното ниво на АМХ спрямо първоначалното (13).

АМХ и захарен диабет

Докато връзката между АМХ и с PCOS, както и ЗД тип 2, е по-подробно описана в световната литература, не толкова еднопосочни и изчерпателни са трудовете за нивата на АМХ при жени със ЗД тип 1.

ЗД тип 1 е автоимунно хронично метаболитно заболяване, характеризиращо се с хипер-

Фигура 2. Роля на АМХ при PCOS *(адаптирано по 9)*



гликемия, която е резултат от нарушения в инсулиновата секреция поради бета-клетъчна деструкция. Инсулинопенията оказва редица системни ефекти върху целия организъм – белтъчна, мастна и въглехидратна обмяна, не на последно място и върху репродуктивната система.

Различни трудове още от края на миналия век отправят поглед към възможните репродуктивни нарушения при жени със ЗД тип 1, а именно: по-късно менархе и по-ранна менопауза; хипоталамична ановулация/аменорея; менструални нарушения (олигоменорея /аменорея, полименорея); автоимунни нарушения – повишена честота на овариални антитела в сравнение със здрави контроли; PCOS фенотип – хиперандрогенизъм и ановулация в хода на лечение с инсулин (14).

В годините, с интензифициране на инсулинолечението, подобряване на метаболитния контрол, възможностите за продължително глюкозно мониториране, много от тези нарушения се преодоляват, макар че персистират различни смущения в гонадната функция, свързани със субоптималните нива на кръвна захар и нефизиологичното инсулиново заместване. Екзогенната хиперинсулинемия, лошият гликемичен контрол, съпътстващите хронични усложнения, вторичната инсулинова резистентност – всички те са сочени за допринасящи или предизвикващи хиперандрогенията при жени със ЗД тип 1.

През 2000 г. Escobar-Morreale и сътр. (15) установяват в 38,8% хиперандрогенизъм при жени със ЗД тип 1 – 18,8% от които отговарят на критериите за PCOS, а 20% се презентират с хирзутизъм при нормо-овулаторна цикличност. При липса на съществени различия в нивата на ЛХ, ФСХ, естрадиол, дехидроепиандростерон сулфат (ДХЕА-С), сексхормон-свързващ глобулин (СХСГ) и 17 хидроксипрогестерон (17ОНПГ), жените със ЗД тип 1 и PCOS имат значително повишени свободен тестостерон и андростендион спрямо здравите контроли и нормо андрогенните диабетички. Възрастта на откриване на заболяването, гликемичният контрол, средната инсулинова доза и продължителността на заболяването не повлияват статистически резултатите.

Нормалните нива на ДХЕА-С насочват към яйчника като основния източник на андрогенен ексцес. Стремежът за стриктен гликемичен контрол би могъл да резултира в супрафизиологични инсулинови дози и така създадената екзогенна хиперинсулинемия да стимулира ЛХ андрогенната продукция в яйчника (15).

Допускайки, че пациентките със ЗД тип 1 и с PCOS имат повишен брой фоликули и, респективно повишени нива на АМХ, Codner и сътр. (16) ги сравняват с жени с доказан PCOS – клинично, хормонално и ултразвуково. При повишени нива на общ тестостерон, свободен андрогенен индекс, 17ОНПГ и овариален обем в двете групи, високите нива на АМХ при жени с PCOS не се потвърждават при жените със ЗД тип 1, въпреки поликистозната морфология. Нивата на андростендион, ЛХ/ФСХ и броят фоликули са по-високи, а СХСГ по-нисък при жените с PCOS спрямо диабетичките със синдрома. Авторите приемат за възможен различен патофизиологичен механизъм при едно и също заболяване. Инсулинът, действайки като ко-гонадотропин, стимулира стероидната продукция от яйчниците и води до хиперандрогенизъм, както и до повишен брой фоликули с големи размери, които имат съответно по-ниска секреция на АМХ. Това обяснява и нормалните нива на хормона при таргетната група (16).

Позовавайки се на това проучване, през 2016 г. Łebkowska и сътр. (17) сравняват нивата на АМХ при 37 диабетички (съответно с и без PCOS), 36 жени с доказан PCOS и 16 здрави контроли. Резултатите показват значително повишени нива на АМХ при жените със ЗД тип 1 и с PCOS спрямо тези без синдрома ($p<0,001$). Липсват съществени различия в овариалния обем и фоликуларния брой между жените с PCOS – диабетички или не, но и двата показателя са сигнификантно по-високи спрямо здравите контроли. Докладвана е позитивна корелация на АМХ с ЛХ, тестостерона и броя антрални фоликули. Авторите заключават, че жените със ЗД тип 1 и PCOS имат хормонален профил, подобен на класическия синдром (17).

Отново Codner и сътр. (18), разширявайки възрастовите граници и търсейки причина за хиперандрогенизма, установяват повишени нива на АМХ, инхибин В и ДХЕА-С при момичета със ЗД тип 1 в предпубертетна възраст, в сравнение със здравите им връстнички. Овариалната фоликулогенеза протича в две ясно различими фази. В първата, предпубертетна фаза на фоликулогенезата, растежът на фоликулите е гонадотропин-независим, стимулира се от локални фактори, които действат пара- и автокринно. Ето защо, авторите обясняват завишените нива на АМХ в тази възраст с екзогенното приложение на инсулин. Последният действа като локален фактор и спомага растежа на малките фоликули (първични, вторични и малки преантрални). Втората фаза на фоликулогенезата, след началото на пубертета, е гонадотропин–зависима. Момичетата със ЗД тип 1 в стадий 4-5 по Танер, обаче, са с по-ниски нива на АМХ. Инсулинът, действайки като ко-гонадотропин, стимулира растежа на по-големите фоликули, които секретират по–малко или никакво количество АМХ (18).

Сравнявайки нивата на АМХ при жени със ЗД тип 1 и здрави контроли в репродуктивно активна възраст през 2017 г. Al Khafaji и сътр. (19) установяват значително по-ниски нива на АМХ при диабетичките с относително незадоволителен метаболитен контрол и регистрирана по-късна възраст на настъпване на менархе. Други хормонални показатели не са изследвани. В таргетната група е по-висока честотата на менструалните нарушения и репродуктивните неуспехи (19). С подобни резултати е и проучването на Kadiroğulları и сътр. (20) от 2019 г. Нивата на АМХ и AFC са по-ниски при жени със ЗД тип 1 (p=0,001) като гликемичният контрол оказва сигнификатно влияние върху овариалния резерв (20).

Естествената менопауза, определена като последния менструален цикъл след 12 последователни месеца аменорея и без патологична причина за това, е събитие с изключително голяма важност за качеството на живот и риска от развитие на бъдещи заболявания при всяка една жена. Възрастта на настъпване на спонтанната менопауза зависи от редица генетични, демографски, социално-икономически, културни и битови фактори. Различни хронични заболявания (в това число и ЗД) могат да ускорят процеса на репродуктивно стареене и да доведат до преждевременна менопауза. Нещо повече – веднъж настъпила, менопаузата води до увеличен риск от сърдечно-съдови, бъбречни и метаболитни нарушения. АМХ, бидейки показател на овариалния резерв, се е доказал като надежден маркер за оценка времето на настъпване на менопауза (21). Оказва ли влияние наличието на автоимунно метаболитно заболяване влияние върху естествените процеси на стареене, имат ли значение възрастта му на откриване, метаболитния контрол, инсулиновите нужди и хроничните усложнения. Повечето от тези въпроси все още чакат своя отговор.

Едно от ранните проучвания, търсещо по-ранната възраст на настъпване на менопаузата при жени със ЗД тип 1, датира от 2001 г. Dorman и сътр. (22) установяват 6 години скъсяване на репродуктивния период при пациентки със ЗД тип 1, причинено от по-късното менархе и по-ранната менопауза. ЗД тип 1, наред с менструалните нарушения до 30 г.в. и едностранната овариектомия, авторите извеждат като независим рисков фактор за развитие на ранна менопауза (22).

В проучване от Чили на Soto и сътр. (23) от 2009 г. жените със ЗД тип 1 се презентират с по-чести нарушения в МЦ, по-високи нива на тестостерон и андростендион и по-ниски стойности на АМХ във възрастта над 33 години спрямо здравите контроли. Регресионен анализ показва и ниски нива на инхибин В, но в групата под 33 г., без корелация с метаболитен контрол, дневна инсулинова доза, възраст на откриване на ЗД. При здрави жени основният механизъм на намаляване на овариалния фоликуларен пул е апоптозата. Неензимно гликиране на протеини, хипергликемията и променената микроциркулация, повишените нива на васкуларен растежен фактор са сред обсъжданите предпоставки, допринасящи за по-ранното изчерпване на овариалния резерв при ЗД тип 1 (23).

В крос-секционно проучване на Kim и сътр. (24) изследват нивата на АМХ сред 321 пациентки със ЗД тип 1 и 376 контроли във възрастта 30-45 години, при които не е извършвана хистеректомия, овариектомия, и не е настъпила ранна менопуаза към периода на изследване. Установени са нива на АМХ, сигнификантно по-ниски при жените със ЗД тип 1 във възрастта до 35 години, но не е открита статистическа значимост за по-късните репродуктивни години (24).

Две проучвания от Холандия и Финландия, които се базират на анамнестични данни на жени със ЗД тип1 и тяхната менопуза, не регистрират статистически значима разлика във възрастта спрямо здравата популация. Нива на АМХ не са изследвани (25, 26).

Интересно проучване за връзката между микроваскуларните съдови усложнения при ЗД тип 1 и менопаузалния преход, посочва, че ако микроалбуминурия е диагностицирана преди 30 годишна възраст, менопауза настъпва по-рано в сравнение с наличие на нормоалбуминурия в тази възраст (27). Дали съдовата дисфункция влияе на стареенето на яйчника е въпрос на по-задълбочени проучвания.

В заключение, АМХ е важен биомаркер в помощ на клиницистите за оценка на овариалния резерв като все повече нараства броят на състоянията, при които се открива, че играе важна роля и е показан за изследване. Противоречивите резултати за нивата му при жени със ЗД тип 1 – като маркер за наличие на PCOS или предиктор за възрастта на настъпване на менопауза, а защо не и като пряк участник в овулаторната дисрегулация, е основание за задълбочени проучвания и продължителна изследователска работа. Навременното откриване на отклоненията в нивата на хормона би спомогнало за изясняване естеството на репродуктивните нарушения при жените със ЗД тип 1, а изграденият на тяхна база терапевтичен подход би спомогнал за подобряване качеството на живот.

References

1. **Broer SL, Broekmans FJ, Laven JS, Fauser BC.** Anti-Müllerian hormone: ovarian reserve testing and its potential clinical implications. *Hum Reprod Update 2014;* 20(5):688-701.

2. **Jamil Z, Fatima SS, Ahmed K and Malik R.** Anti-Mullerian Hormone: Above and Beyond Conventional Ovarian Reserve Markers. *Disease Markers 2016;* 2016:5246217.

3. **Kushnir VA, Seifer DB, Barad DH, Sen A, Gleicher N.** Potential therapeutic applications of human anti-Müllerian hormone (AMH) analogues in reproductive medicine. *J Assist Reprod Genet 2017;* 34:1105–1113.

4. **Bedenk J, Vrtačnik-Bokal E, Virant-Klun I.** The role of anti-Müllerian hormone (AMH) in ovarian disease and infertility. *J Assist Reprod Genet 2020;* 37(1): 89-100.

5. **Silva MSB, Giacobini P.** New insights into anti-Müllerian hormone role in the hypothalamic–pituitary–gonadal axis and neuroendocrine development. *Cell Mol Life Sci 2021м 78:* 1–16.

6. **Josso N, di Clemente N.** Transduction pathway of anti-Mullerian hormone, a sex-specific member of the TGF-beta family. *Trends Endocrinol Metab 2003;* 14: 91–97.

7. **Visser JA, Olaso R, Verhoef-Post M, Kramer P, Themmen APN, Ingraham HA.** The serine/threonine transmembrane receptor ALK2 mediates Müllerian inhibiting substance signaling. *Mol Endocrinol 2001;* 15: 936–945.

8. **Oh SR, Choe SY, Cho YJ.** Clinical application of serum anti-Müllerian hormone in women. *Clin Exp Reprod Med 2019;* 46(2): 50-59.

9. **Dumont A, Robin G, Catteau-Jonard S, Dewailly D.** Role of Anti-Müllerian Hormone in pathophysiology, diagnosis and treatment of Polycystic Ovary Syndrome: a review. *Reprod Biol Endocrinol 2015;* 13: 137.

10. **Moolhuijsen LME, Visser JA.** Anti-Müllerian Hormone and Ovarian Reserve: Update on Assessing Ovarian Function. *J Clin Endocrinol Metab 2020;* 105(11): 3361–3373.

11. **Kamenov Z, Orbetzova M, Gateva A.** Polycystic ovary syndrome. *Sofia 2010; „ZIP" Publishing House;* 2010 ISBN 978-954-9369-17-5. (In Bulgarian) [**Каменов З, Орбецова М., Гатева А.** Синдром на поликистозните яйчници. *София 2010; ИК „ЗИП" ЕООД, 2010* ISBN 978-954-9369-17-5].

12. **Abbara A, Eng PC, Phylactou M, Clarke SA, Hunjan T, Roberts R et al.** Anti-Müllerian hormone (AMH) in the Diagnosis of Menstrual Disturbance Due to Polycystic Ovarian Syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne) 2019;*10: 656.

13. **Parakhuleva N.** Diagnostic Reliability of Anti-Müllerian Hormone in Polycistic Ovary Syndrome, PhD thesis; *MU, Plovdiv 2014 (In Bulgarian)* [**Парахулева Н.** Диагностична надеждност на анти-мюлеров хормон при синдрома на поликистозни яйчници, *Дисертация за придобиване на образователна и научна степен „доктор"; МУ, Пловдив 2014*].

14. **Codner E, Cassorla F.** Puberty and ovarian function in girls with type 1 diabetes mellitus. *Horm Res 2009;* 71(1): 12-21.

15. **Escobar-Morreale HF, Roldán B, Barrio R, Alonso M, Sancho J, de la Calle H, García-Robles R.** High prevalence of the polycystic ovary syndrome and hirsutism in women with type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab 2000;* 85(11): 4182-4187.

16. **Codner E, Iñíguez G, Villarroel C, Lopez P, Soto N, Sir-Petermann T, et al.** Hormonal profile in women with polycystic ovarian syndrome with or without type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab 2007;* 92(12): 4742-4746.

17. **Łebkowska A, Adamska A, Karczewska-Kupczewska M, Nikołajuk A, Odziomek E, Milewski R, et al.** Serum anti-Müllerian hormone concentration in women with polycystic ovary syndrome and type 1 diabetes mellitus. *Metabolism 2016;* 65(5): 804-811.

18. **Codner E, Iñíguez G, Hernández IM, Lopez P, Rhumie HK, Villarroel C, Rey RA.** Elevated anti-Müllerian hormone (AMH) and inhibin B levels in prepubertal girls with type 1 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf) 2011;* 74(1): 73-78.

19. **Al Khafaji MM, Al-Taee HA, Al-Shaikh SF.** Assessment of anti-Mullerian hormone level in reproductive age group women with diabetes mellitus type one. *Middle East Fertil Soc J 2017;* 22(4): 269-272.

20. **Kadiroğulları P, Demir E, Bahat PY, Kıyak H, Seckin KD.** Evaluation of relationship between HbA1c levels and ovarian reserve in patients with type 1 diabetes mellitus. *Gynecol Endocrinol 2020;* 36(5): 426-430.

21. **Yazdkhasti M, Tourzani ZM, Roozbeh N, Hasanpour V, Saeieh SE, Abdi F.** The association between diabetes and age at the onset of menopause: a systematic review protocol. *Syst Rev 2019;* 8: 80.

22. **Dorman JS, Steenkiste AR, Foley TP, Strotmeyer ES, Burke JP, Kuller LH, Kwoh CK;** Familial Autoimmune and Diabetes (FAD) Study. Menopause in type 1 diabetic women: is it premature? *Diabetes 2001;* 50(8): 1857-1862.

23. **Soto N, Iñiguez G, López P, Larenas G, Mujica V, Rey RA, Codner E.** Anti-Mullerian hormone and inhibin B levels as markers of premature ovarian aging and transition to menopause in type 1 diabetes mellitus. *Hum Reprod 2009;* 24(11): 2838-2844 .

24. **Kim C, Karvonen-Gutierrez C, Kong S, Arends V, Steffes M, McConnell DS, et al.** Antimüllerian hormone among women with and without type 1 diabetes: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study and the Michigan Bone Health and Metabolism Study. *Fertil Steril 2016;* 106(6): 1446-1452.

25. **Sjöberg L, Pitkäniemi J, Harjutsalo V, Haapala L, Tiitinen A, Tuomilehto J, Kaaja R.** Menopause in women with type 1 diabetes. *Menopause 2011;* 18(2): 158-163.

26. **Yarde F, van der Schouw YT, de Valk HW, Franx A, Eijkemans MJ, Spiering W, Broekmans FJ; OVADIA study group.** Age at menopause in women with type 1 diabetes mellitus: the OVADIA study. *Hum Reprod 2015;* 30(2): 441-446.

27. **Yi Y, El Khoudary SR, Buchanich JM, Miller RG, Rubinstein D, Orchard TJ, Costacou T.** Association of age at diabetes complication diagnosis with age at natural menopause in women with type 1 diabetes: The Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications (EDC) Study. *J Diab Compl 2021;* 35(3): 107832.

Address for correspondence:

Д-р Мария Илиева,
Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Св. Георги", МУ, Пловдив
Бул. „Васил Априлов" 15А
Пловдив – 4000,
e-mail: mimilieva@yahoo.com

Dr. Maria Ilieva,
Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases, „Sv. Georgy" University Hospital, MU, Plovdiv
15A „Vasil Aprilov" Blvd, Plovdiv - 4000
e-mail: mimilieva@yahoo.com

Роля на имунохистохимичната експресия на соматостатинови рецептори 2 и 5 при гастроентеропанкреасните невроендокринни тумори, *диагностицирани в УМБАЛ „Д-р Г. Странски“ - Плевен за 7-годишен период*

Владова, Паулина Т.[1], Илиев, Сергей Д.[1], Иванов, Иван Н.[2], Динева, Тереза Б.[3], Поповска, Савелина Л.[2]

[1] Катедра Пропедевтика на хирургическите болести; [2] Катедра Патоанатомия,
[3] Сектор Молекулярна патология при Научно-изследователски център,
Медицински Университет, Плевен,

Адрес за кореспонденция:

Паулина Трифонова Владова,
Катедра Пропедевтика на хирургическите болести,
Медицински Университет, Плевен, ул. „Климент Охридски“ №1,
e-mail: p.t.vladova@abv.bg

Постъпване: 10. 05. 2020
Ревизиране: 16. 10. 2020
Приемане: 27. 10. 2020

Резюме

Въведение: Невроендокринните тумори (НЕТ-и) са спектър от редки и хетерогенни неоплазми с различно функционално и биологично поведение. В продължение на много години аналозите на соматостатина (SSA) са били използвани като форма на целенасочена терапия за контрол на симптомите в резултат на хормонална хиперсекреция от функционалните НЕТ-и. През последните години соматостатиновите рецептори (SSRs) са активно изследвани като важни цели за диагностициране и лечение на НЕТ-и.

Материал и методи: Ретроспективно проучване, включващо невроендокринните тумори на гастроинтестиналния тракт за периода 2011-2018 г. Изследвана е имунохистохимичната експресия на сомастостатинови рецептори 2 и 5 при пациенти с гастроинтестинални невроендокринни тумори, диагностицирани в УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ – Плевен за 7-годишен период.

Резултати и обсъждане: Позитивната експресия при соматостатинов рецептор 2 е 22%, а при соматостатинов рецептор 5 – 20%. Съотношението дифузна/фокална експресия на рецептор 2 е приблизително 1,2 / 1 (17,1:14,6), докато при рецептор 5 е 1 / 3 (4,9:14,6). Експресията на соматостатиновите рецептори зависи от диференциацията, локализацията, хистологичния тип и функционалността на тумора. SSTR 2а показва експресия в 100% от гастриномите, 58% от инсулиномите и 86% от гастроинтестиналните НЕТ-и, докато SSTR5 имунореактивността е открита при 76% от гастриномите, 78% от инсулиномите и 83% от гастроентеропанкреасните (ГЕП)-НЕТ-и.

Заключение: Соматостатиновите рецептори 2 и 5 са специфични и чувствителни в тераностиката на ГЕП-НЕТ-и, но все още не са валидирани в съвременната медицина.

Ключови думи: *соматостатинови рецептори 2 и 5, невроендокринни тумори, гастроентеропанкреасни тумори, гастриноми, инсулиноми*

Въведение

Биомаркерът е „характеристика", която е обективно измерима и оценена като индикатор за нормални биологични процеси, патогенни процеси или фармакологични реакции към терапевтични средства или интервенции (1).

Биомаркерите при гастроентеропанкреасните (ГЕП) невроендокринни тумори (НЕТ-и) могат да се разделят в 4 категории според Y Jiao и сътр. (2).

1. Маркери за ранна диагностика
2. Прогностични маркери
3. Маркери за мониториране на лечение
4. Маркери за избор на лечение.

В продължение на много години аналозите на соматостатина (SSA) са били използвани като форма на целенасочена терапия за контрол на симптомите в резултат на хормонална хиперсекреция от функционалните невроендокринни тумори (НЕТ-и). През последните 30 години соматостатиновите рецептори (SSRs) са активно изследвани като важни цели за диагностициране и лечение на НЕТ-и. През 1982 г. бяха синтезирани първите аналози на саматостатина, като първият синтезиран аналог, одобрен за клинична употреба е октреотид (3). В началото на 90-те години на миналия век, 5 подтипа на соматостатинови рецептори (SSTs), отбелязвани SST1 до SST5 бяха клонирани при мишки, плъхове и хора (4-12).

SST2 представлява най-често срещаният подтип, открит в ГЕП тумори и е идентифициран в 70% от случаите с НЕТ (13-22). SST2 е по-чест при гастриноми (100%), отколкото при инсулиноми (58%). Среща се в по-висок процент при функционално активните тумори в сравнение с функционално неактивните и по-често при стомашно-чревните неоплазми, отколкото при панкреасните (13).

SST5 представлява вторият най-често срещан SST подтип, експресиран в ГЕП невроендокрини неоплазми. SST5 е открит при 62-93% от невроендокринните тумори. Наблюдава се по-рядка експресия в панкреаса в сравнение с интестиналните тумори и по-високи нива на експресия при функционално активните, отколкото при функционално неактивните тумори (23).

Материали и методи

1. Изследван контингент

Проучването е ретроспективно, едноцентрово, обхващащо периода 2010-2018 г. В него са участвали 41 пациента с диагностицирани ГЕП-НЕТ-и в хирургичните звена на УМБАЛ „Д-р Георги Странски", гр. Плевен.

2. Източници на информация

Като основен източник на информация са използвани данни от Регионалния раков регистър в град Плевен. Проучени са историите на заболяванията на 41 пациента, включени в обследването. От тях са селектирани подходящи хистологични материали за имунохистохимично изследване на експресията на соматостатинови рецептори 2 и 5.

3. Имунохистохимичен метод

Профили (3 mm) от туморна тъкан бяха депарафинизирани в ксилен и рехидратирани в алкохолен разтвор. След това срезовете бяха поставени в 0,5% водороден пероксид в метанол в продължение на 10 минути, за да се блокира ендогенната пероксидазна активност. Беше извличен микровълнов антиген в продължение на 20 минути в цитратен буфер. Имунохистохимичното оцветяване беше реализирано с помощта на откриващата система NovoLink полимер (Novocastra, Leica Microsystems, Milton Keynes, UK). Секции от всяка тъканна проба бяха инкубирани със заешко анти-SSTR2 антитяло (UMB1, Abcam; ab9550) и заек анти-SSTR5 антитяло (UMB4, Abcam; ab28618) при разреждане 1: 100 за 1 час при стайна температура. След това пробите бяха подложени на постпървичен блок в продължение на 30 минути, последван от NovoLink полимер в продължение на 30 минути във влажна камера при стайна температура *(Табл.1)*.

Реакционните продукти бяха визуализирани при използване на прясно приготвен разтвор на NovoLink DAB (3,3'-диаминобензидин тетрахидрохлорид) в продължение на 10 минути чрез добавяне на 50 ml DAB хромаген към 1 ml буфер за субстрат на Novolink DAB. Слайдовете бяха оцветени с хематоксилин на Mayer и бяха монтирани. Нормална панкреатична тъкан беше използвана за вътрешна положителна контрола. Полуколичественият анализ на оцветените срезове беше извършен от независим патолог, използвайки DAKO HER2 / neu оценка.

3.1. Хистологична интерпретация

За оценка на SSTR2 и SSTR5 имунопозитивността беше използвана модифицирана система за оценка, стандартизирана и предложена от Volante и сътр. (4) Системата за оценяване е както следва: 0, липса на имунореактивност; 1, чиста цитоплазмена имунореактивност, или фокална, или дифузна; 2, мембранна реактивност при <50% от туморните клетки, независимо от наличието на цитоплазмено оцветяване; и 3, периферна мембранна реактивност при > 50% от туморните клетки, независимо от наличието на цитоплазмено оцветяване. Случаите с резултат от 2-3 се считат за положителни, а 0-1 се считат за отрицателни. За контрола на двата рецептора беше използвана нормална панкреасна тъкан.

4. Статистически методи

Таблица 1. Приложени антитела

Антитела	Код №	Производител	Разреждане	Клоналност	Клон
Anti-Somatostatin Receptor 2 antibody	ab9550	abcam	1:100	Заешко-поли	–
Anti-Somatostatin Receptor 5 antibody	ab28618	abcam	1:100	Заешко-поли	–

Данните са въведени и обработени със статистическия пакет IBM SPSS Statistics 25,0. За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза бе прието p<0,05.

Резултати

В проучването са участвали 41 пациенти със средна възраст 62,54±15,97 г. в диапазона 24-86 г. От тях 12 (29,3%) са мъже и 29 (70,7%) жени. По отношение на локализацията преобладават НЕТ-и на дебело черво (26,8%), следвани от тези на апендикса (24,4%), панкреаса (19,5%) и стомаха (7,3%). При нито един болен не е провеждано лечение със саматостатинови аналози. Провеждано е оперативно лечение в съответния обем и са прилагани общи схеми на химиотерапия.

Позитивната експресия при соматостатинов рецептор 2 е 22%, а при соматостатинов рецептор 5–20% *(Фиг. 1, Фиг. 2)*. Съотношението дифузна/фокална експресия на рецептор 2 е приблизително 1,2/1 (17,1:14,6), докато при рецептор 5 е 1 / 3 (4,9:14,6) *(Фиг. 3, Фиг. 4)*.

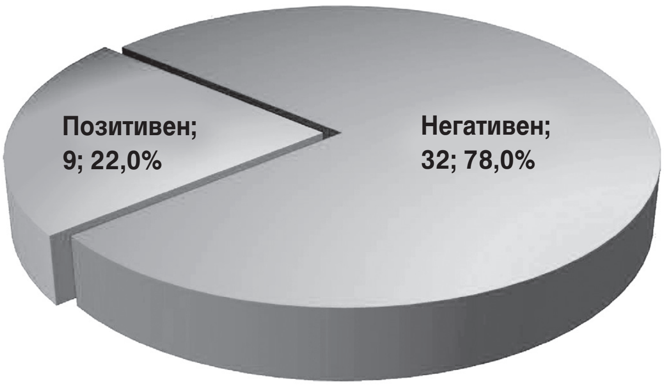
Експресия на соматостатинов рецептор 2

Проведеният анализ по метода на Каплан-Майер показа с около 29 месеца по-ниска преживяемост на пациентите с позитивна експресия на соматостатинов рецептор 2 спрямо тези с негативна, но тестовете Log Rank, Breslow и Tarone-Ware установиха, че разликата няма сигнификантен характер. Вероятната причина за този резултат е малкият брой летални изходи при пациентите с позитивна експресия на соматостатинов рецептор 2. На *Фигура 5* се вижда, че функцията на преживяемостта на имащите позитивна експресия на соматостатинов рецептор 2 завършва значително по-рано и пада до нулата *(Фиг. 5)*.

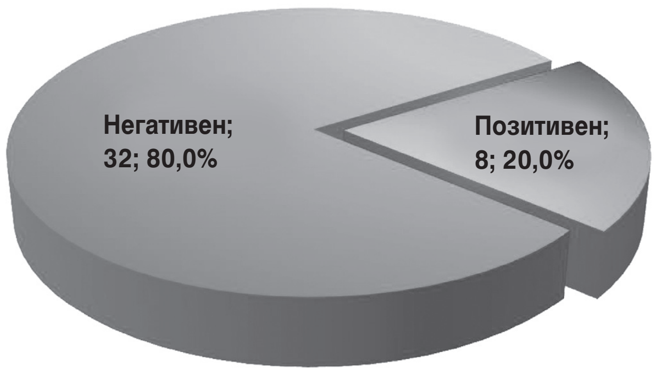
Експресия на соматостатинов рецептор 5

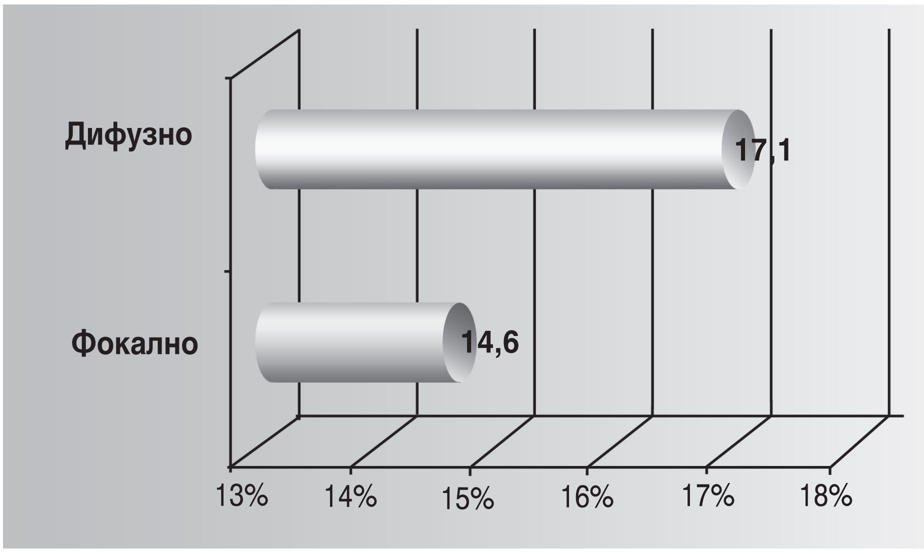
Проведеният анализ по метода на Каплан-Майер показа с около 17 месеца по-ниска преживяемост на пациентите с позитивна експресия на соматостатинов рецептор 5 спрямо тези с негативна, но тестовете Log Rank, Breslow и Tarone-Ware установиха, че разликата няма сигнификантен характер. Вероятната причина за този резултат отново е малкият брой смъртни случаи и при пациентите с позитивна експресия на соматостатинов рецептор 5. На *Фигура 6* се вижда, че функцията на преживяемостта на имащите позитивна експресия на соматостатинов рецептор 5 завършва значително по-рано, но с по-висока стойност *(Фиг. 6)*.

Фигура 1. Честотно разпределение на пациентите по експресия на соматостатинов рецептор 2.



Фигура 2. Честотно разпределение на пациентите по експресия на соматостатинов рецептор 5 (липсват данни за един от пациентите).



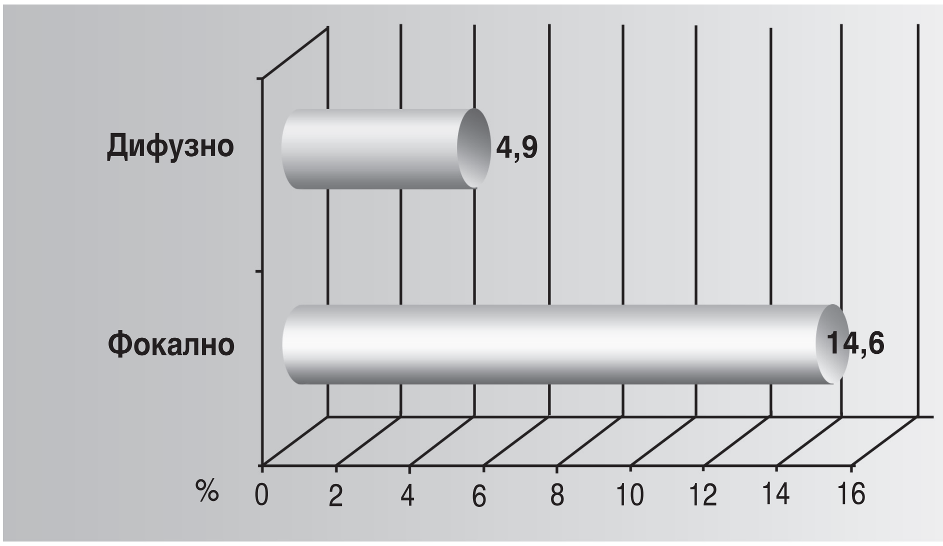


Фигура 3.

Честотно разпределение на пациентите по фокална и дифузна експресия на соматостатинов рецептор 2.

Фигура 4 .

Честотно разпределение на пациентите по фокална и дифузна експресия на соматостатинов рецептор 5.



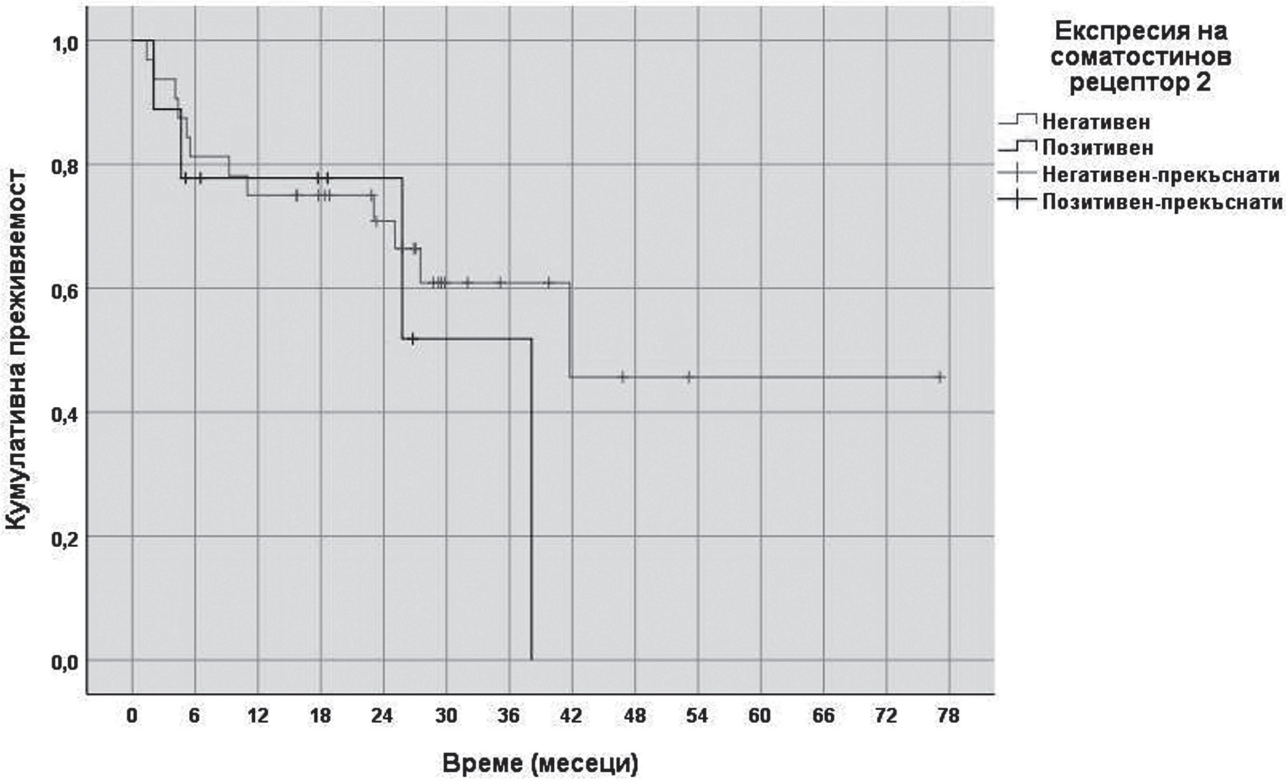
Едновременна експресия на соматостатинови рецептори 2 и 5

Проведеният анализ по метода на Каплан-Майер показа с около 27 месеца по-ниска преживяемост на пациентите с едновременна експресия на соматостатинови рецептори 2 и 5 спрямо останалите, но тестовете Log Rank, Breslow и Tarone-Ware установиха, че разликата няма сигнификантен характер. Аналогично, вероятната причина за този резултат е малкият брой летални изходи при пациентите с позитивна експресия. На *Фигура 7* се вижда, че функцията на преживяемостта на имащите едновременна позитивна експресия на соматостатинови рецептори 2 и 5 завършва значително по-рано, но с по-висока стойност *(Фиг. 7)*. Тъй като експресията на соматостатинов рецептор 2 е дихотомна променлива, приложихме бинарен логистичен анализ. Като евентуални фактори бяха тествани показателите: карциноиден синдром, диференциация на тумора (G), хистологичен вид на тумора, стадий на заболяването, локализация на тумора, възраст и пол. Експресията на соматостатинов рецептор 5 също е дихотомна променлива, поради което приложихме отново бинарен логистичен анализ. Като евентуални фактори бяха тествани същите показатели: карциноиден синдром, диференциация на тумора (G), хистологичен вид на тумора, стадий на заболяването, локализация на тумора, възраст и пол.

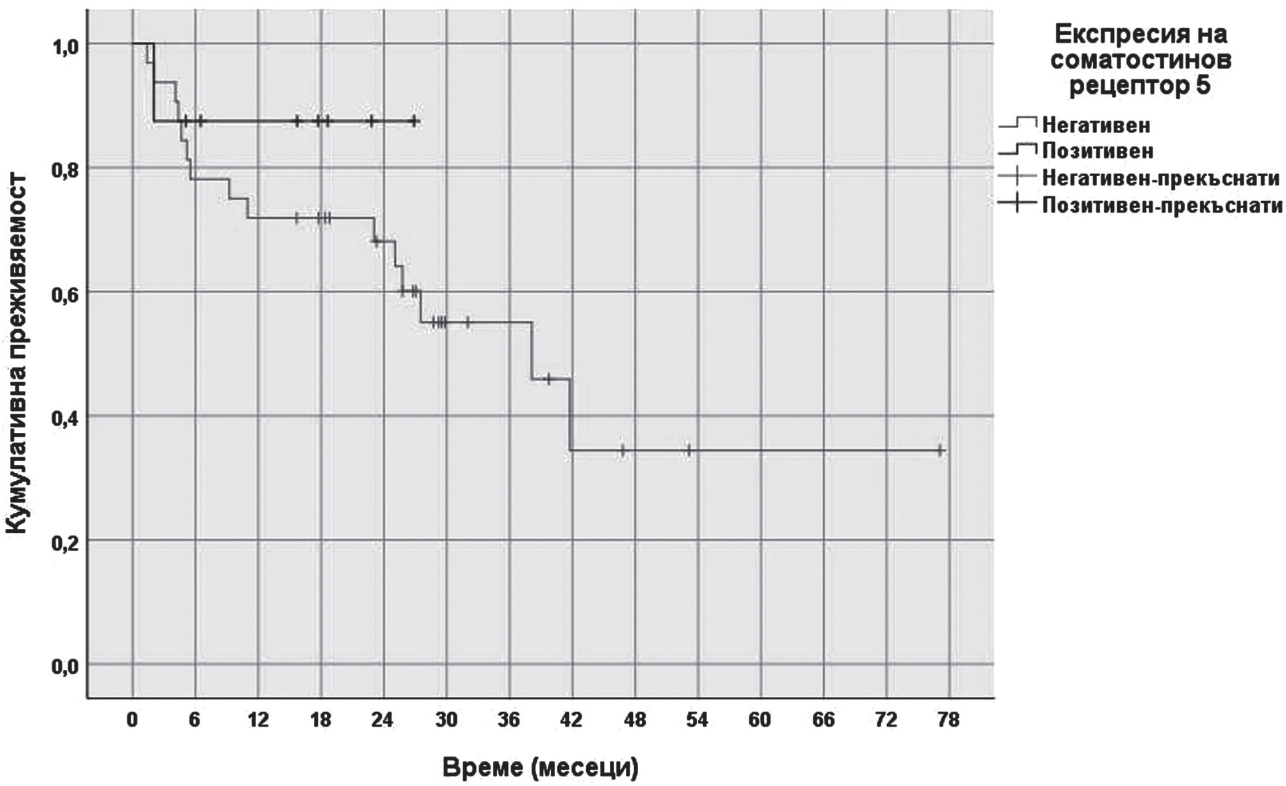
Обсъждане

Поставихме си за цел да проучим експресията на соматостатинови рецептори 2 и 5 в обследваните от нас пациенти. Важна характери-

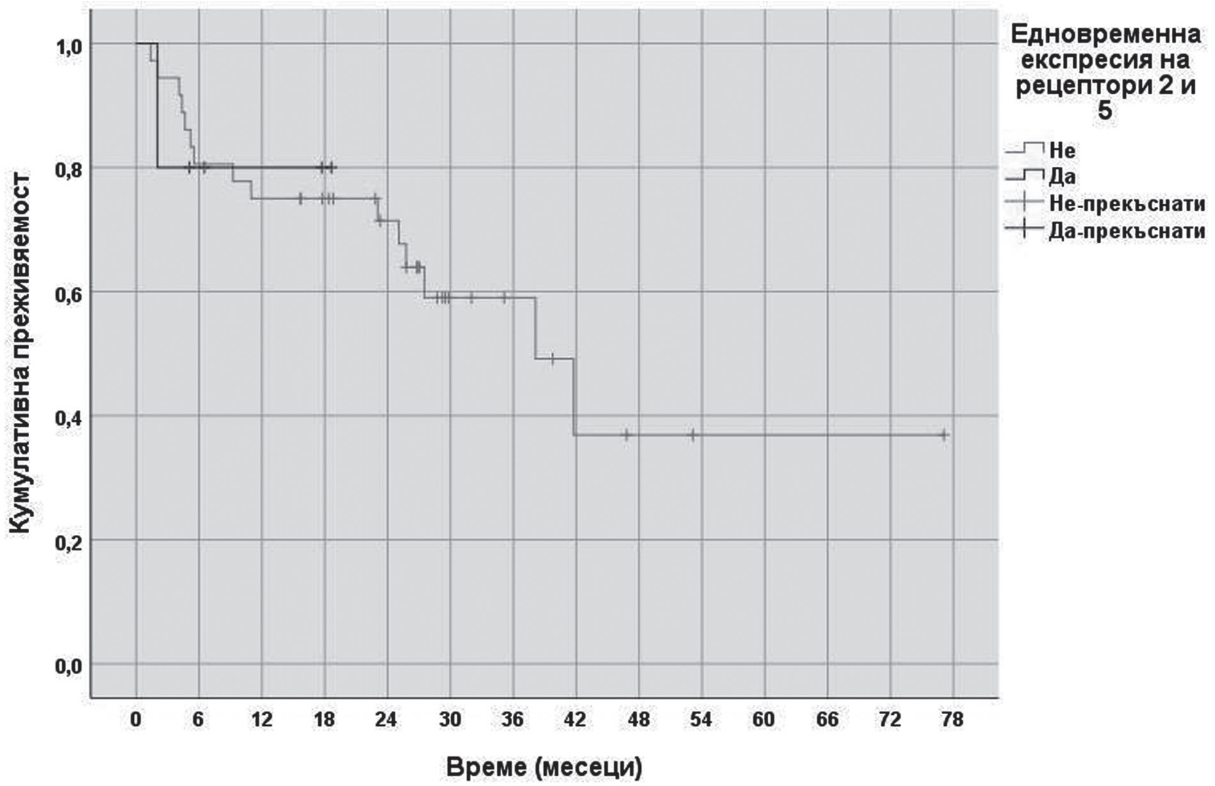
Фигура 5. Функции на общата преживяемост според показателя експресия на соматостатинов рецептор 2.



Фигура 6. Функции на общата преживяемост според показателя експресия на соматостатинов рецептор 5.



Фигура 7. Функции на общата преживяемост според показателя едновременна експресия на соматостатинови рецептори 2 и 5.



стика на невроендокринните тумори е именно свръхекспресията на соматостатинови рецептори, което позволява получаване не само на високоспецифичен образ чрез нуклеарно медицински методи, но така също и на персонализирано радионуклеидно лечение. Соматостатинът се свързва с всички соматостатинови рецептори, за разлика от това първият синтезиран соматостатинов аналог октреотид и следващият синтезиран ланреотид се свързват само със SSTR2 и SSTR5.

Неотдавнашни проучвания доказаха, че голяма част от невроендокринните неоплазми екпресират соматостатинови рецептори SSTR1-SSTR5, като това до голяма степен зависи от диференциацията и вида на тумора (24-28). Имунохистохимични изследвания при гастроентеропанкреасните невроендокринни неоплазми показват, че в най-висок процент се експресират тип SSTR2 (84-100% от случаите с G1-G2), а в по-малък SSTR5 (55-83%) (29, 30). SSTR 2a показва експресия в 100% от гастриномите, 58% от инсулиномите и 86% от гастроинтестиналните НЕТ-и, докато SSTR5 имунореактивността е открита при 76% гастриномите, 78% от инсулиномите и 83% от ГЕП-НЕТ-и (31).

В нашето проучване позитивна експресия на соматостатинов рецептор 2 се наблюдава при 22% от пациентите, а за соматостатинов рецептор 5- при 20%. За позитивна експресия на SSR2 приехме мембранно оцветяване или мембранно и цитоплазмено, докато за SSR5 – всяко оцветяване, както цитоплазмено, така и мембранно. Ниската честота на експресия на двата рецептора може да обясним с високия процент на слабодиференцирани невроендокринни карциноми G3 в изследваната от нас кохорта от пациенти. Поставихме си за задача да изследваме и сравним фокалната и дифузна експресия на двата рецептора. Съотношението дифузна/фокална експресия за рецептор 2 е приблизително 1,2/1, докато за рецептор 5 е 1 / 3. В някои проучвания се подчертава ролята на фокалната експресия като причина за липсата на ефект от лечението със соматостатинови аналози (32).

Zhao и сътр. докладват 86,7% експресия при ГЕП- НЕТ-и за SSR2 и 47,2% за SSR5 (33). Volante и сътр. (4) съобщават за 79% експресия на SSR2 при високо диференцираните тумори, докато за слабодиференцираните тя е 44%. SSR5 се експресира в 71% от добре диференцираните тумори, докато в слабо диференцираните експресията е едва 28% (4). Според степента на диференциация, SSTR 2 се експресират в 91% от G1 туморите, 82,8% в G 2 и 100% в G3. Докато SSTR5 показват експресия в 81,8%, 60% и 0% съответно от степен G1, G2 и G3. По отношение на локализацията на тумора, също се наблюдава хетерогенност в експресията на двата упоменати рецептора. Осемдесет и пет процента от панкреасните, 100% от стомашните, 70% от тънко-чревните, 85,7% от апендикуларните и 100% от ректалните НЕТ-и показват SSTR 2 експресия. SSTR 5 се позитивират в: 61,9% от панкреасните, 37,5% от стомашните, 70% от чревните 71,5% от апендуларните и 66,6% от ректалните невроендокринни тумори (34, 35).

Pisarek и сътр. установяват, че експресията на SSR5 намалява с увеличаване степента на диференциация на тумора (36). Volante и сътр. (4) откриват SSTR2 в 79% от добре диференцираните невроендокринни тумори/карциноми и при 44% от слабо диференцираните невроендокринни карциноми. Слабо диференцираните тумори [G3 тумори и невроендокринен карцином (NEC) + смесен аденоневроендокринен карцином (MANEC)] имат по-ниска SSTR2 експресия в сравнение с добре и умерено диференцирани тумори [G1, G2 тумори и невроендокринен тумор (NET)]. Експресията на SSTR2 при тумори в стадий I и II е 77,5%, което е значително повишено в сравнение с туморите в стадии III и IV (58,3%; p = 0,014) (4). По подобен начин, експресията на SSTR5 е значително по-висока при панкреасни и добре диференцирани тумори в сравнение с гастроинтестиналните и слабо диференцирани тумори (37).

Подобна зависимост в проведеното от нас обследване ние не констатирахме. В нашето проучване се наблюдава по-висок процент на експресия на рецепторите при G2 туморите. В проследената кохорта от пациенти, процентът на тези с диагностициран невроендокринен тумор на панкреаса е много нисък. Не разполагаме с данни за точния хистологичен вариант на тумора. По литературни данни инсулиномите в 90% от случаите са доброкачествени и самостоятелни и при 99% са разположени в панкреаса (38). Те експресират SSTR1 и SSTR2, докато de Sa и сътр. (39) съобщават за SSTR5 положителна експресия, свързана с размера на тумора и агресивността.

Глюкагономът е третият най-често срещан ендокринно-секретиращ тумор на островните клетки, който в 70% от случаите е злокачествен. Глюкагономите показват висока експресия на SSTR2 и по-ниска експресия на SSTR5. Въпреки това, поради много ниската честота на глюкагономите, е трудно да се направи обобщаващо твърдение относно типичния модел на експресия на SSTRs.

Гастриномите (гастрин-произвеждащи тумори) представляват до 20% от панкреатичните ендокринни тумори. SSTR2 (до 100%) и SSTR5 (76-100%) се експресират предимно в гастриноми, което корелира добре с клиничната реакция при лечение с октреотид.

Соматостатиномите (соматостатинови тумори), които са 90% злокачествени и PP-продуциращи тумори са изключително редки. VIP-омите са тумори, произвеждащи вазоактивни чревни полипептиди, които често се намират в ендокринните островчета. SSTR5 изглежда се позитивира предимно в соматостатиномите, докато SSTR2 – предимно във VIP-омите (40), осигурявайки молекулярна основа за диагностично и терапевтично насочване с радиоактивен октреотид.

По-слабата експресия на SSR2 корелира с намаляване на общата преживяемост, докато при по-изразената позитивност на рецептора преживяемостта е по-добра. По-ниската експресия на SSR2 предполага и по-слаб ефект от проведеното лечение. В нашето проучване с 29 месеца е по-ниска преживяемостта при пациентите с позитивна експресия на SSR2 спрямо тези с негативна. Това бихме обяснили с факта, че процентът на пациентите с НЕТ-и на панкреаса е едва 19,5%. По отношение на ролята на експресията на SSR5 като предиктор за преживяемост, проучванията в световен мащаб са ограничени. В нашето обследване със 17 месеца е по-ниска преживяемостта при пациенти с положителна експресия на SSR5. Сравнявайки данните за двата рецептора, може да заключим, че зависимостта между прежимяемост и експресия на соматостатинов рецептор е по-силна за соматостатинов рецептор 2. С около 27 месеца е по-ниска общата преживяемост при пациентите с едновременна експресия на SSR2 и SSR5 резултат, който се доближава до данните в литературата. Високата експресия на рецептори предполага лечение със соматостатинови аналози, а ниската – употреба на общи схеми на химиотерапия (41).

Заключение

Като сериозен недостатък на имунохистохимичния метод се изтъква липсата на стандартизация на метода и неопределената чувствителност на същия. Скала за оценка на експресията на соматостатинов рецептор 2 е предложена от Volante и сътр. (4) и е приета, но не е утвърдена. В бъдеще са необходими още проучвания върху големи популации с цел създаване на стандартизирани процедури за имунохистохимична оценка на експресията на соматостатинови рецептори.

Original article

The Role of Immunohistochemical Expression of Somatostatin Receptors 2 and 5 in Gastroentero-Pancreatic Neuroendocrine Tumors *diagnosed at the University Hospital „Dr. G. Stranski" – Pleven for a 7-year period*

Vladova, Paulina T.[1], Iliev, Sergey D.[1], Ivanov, Ivan N.[2], Dineva, Tereza B.[3], Popovska, Savelina L.[2]

[1] Department of Propedeutics of Surgical Diseases; [2] Department of Pathology;
[3] Department of Molecular Pathology, Scientific Research Center, Medical University, Pleven

Address for correspondence:
Dr. Paulina Trifonova Vladova,
Department of Propedeutics of Surgical Diseases, Medical University, Pleven,
1, Sv. Kliment Ohridski Str., 5800 Pleven, Bulgaria,
e-mail: p.t.vladova@abv.bg

Submitted: 10. 05. 2020
Revised: 16. 10. 2020
Accepted: 27. 10. 2020

Abstract

Introduction: Neuroendocrine tumors (NETs) are a spectrum of rare and heterogeneous neoplasms with different functional and biological behavior. For many years, somatostatin analogues (SSAs) have been used as a form of targeted therapy to control symptoms resulting from hormonal hypersecretion from functional NETs. In recent years, somatostatin receptors (SSRs) have been actively studied as important targets for the diagnosis and treatment of NETs.

Materials: A retrospective study involving neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract for the period of 2011-2018. The immunohistochemical expression of somastostatin receptors 2 and 5 in patients with gastrointestinal neuroendocrine tumors diagnosed at the University Hospital „Dr. Georgi Stranski", Pleven was studied over a 7-year period.

Results and Discussion: The positive expression for somatostatin receptor 2 is 22% and 20% for somatostatin receptor 5. The diffuse / focal expression ratio of receptor 2 is approximately 1,2 / 1 (17,1: 14,6), while at receptor 5 it is 1/3 (4,9: 14,6). The expression of somatostatin receptors depends on the differentiation, localization, histological type and functionality of the tumor. SSTR2a showed expression in 100% of gastrinomas, 58% of insulinomas and 86% of gastrointestinal NETs, while SSTR5 immunoreactivity was found in 76% of gastrinomas, 78% of insulinomas and 83% of gastroenteropancreatic tumors (GEP)-NETs.

Conclusion: Somatostatin receptors 2 and 5 are specific and sensitive in the theranostics of GEP-NETs, but have not yet been validated in modern medicine.

Key words: somatostatin receptors 2 and 5, neuroendocrine tumors, gastroenteropancreatic tumors, gastrinomas, insulinomas

Introduction

A biomarker is a „feature", which is objectively measurable and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes, or pharmacological reactions to therapeutic agents or interventions (1).

Biomarkers in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors can be divided into 4 categories according to Jiao Y, et al. (2).

1. Markers for early diagnosis
2. Prognostic markers
3. Markers for monitoring of treatment
4. Markers for choice of treatment

For many years, somatostatin analogues (SSAs) have been used as a form of targeted therapy to control symptoms resulting from hormonal hypersecretion from functional neuroendocrine tumors (NETs). In recent years, somatostatin receptors (SSRs) have been actively studied as important targets for the diagnosis and treatment of NETs.

In 1982, the first analogues of samatostatin were synthesized. The first synthesized analogue approved for clinical use was octreotide (3). In the early 1990s, five subtypes of somatostatin receptors (SSTs), called SST1 to SST5, were cloned into mice, rats, and humans (4-12).

SST2 is the most common subtype found in gastroenteropancreatic tumors. It was identified in 70% of NET cases (13-22). SST2 is more common in gastrinomas (100%) than in insulinomas (58%). It is found in a higher percentage in functionally active tumors than in functionally inactive, and more often in gastrointestinal neoplasms than in pancreatic (13).

SST5 is the second most common SST subtype expressed in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. SST5 was found in 62% -93% of neuroendocrine tumors. There is less expression in the pancreas compared to intestinal tumors and higher expression levels in functionally active than in functionally inactive tumors (23).

Materials and methods

1. Study group

The study is retrospective and single-center covering the period 2010-2018. It involved 41 patients with diagnosed gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors in the surgical units of UMHAT „Dr. Georgi Stranski" - Pleven.

2. Sources of information

Data from the Regional Cancer Registry in the city of Pleven was used as the main source of information. The medical histories of the 41 patients included in the study were studied. From them, suitable histological materials were selected for immunohistochemical examination of the expression of somatostatin receptors 2 and 5.

3. Immunohistochemical method

Tumor tissue profiles (3 mm) were dewaxed in xylene and rehydrated in alcoholic solution. The sections were then placed in 0,5% hydrogen peroxide in methanol for 10 minutes to block endogenous peroxidase activity. Microwave antigen was extracted for 20 minutes in a citrate buffer. Immunohistochemical staining was performed using the NovoLink polymer detection system (Novocastra, Leica Microsystems, MiltonKeynes, UK). Sections of each tissue sample were incubated with rabbit anti-SSTR2 antibody (UMB1, Abcam; ab9550) and rabbit anti-SSTR5 antibody (UMB4, Abcam; ab28618) at a 1:100 dilution for 1 hour at room temperature. The samples were then subjected to a post-primary block for 30 minutes, followed by NovoLink polymer for 30 minutes in a humid chamber at room temperature.Reaction products were visualized using freshly prepared NovoLink DAB solution (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) for 10 minutes by adding 50 ml of DAB chromagen to 1 ml of Novolink DAB substrate buffer. Slides were stained with Mayer's hematoxylin and mounted. Normal pancreatic tissue was used for internal positive control. Semi-quantitative analysis of the stained sections was performed by an independent pathologist using the DAKO HER2 / neu assessment.

3.1. Histological interpretation

A modified assessment system, standardized and proposed by Volante et al. (4), was used to assess SSTR2 and SSTR5 immunopositivity. The evaluation system is as follows: 0, lack of immunoreactivity; 1, pure cytoplasmic immunoreactivity, either focal or diffuse; 2, membrane reactivity in < 50% of tumor cells, regardless of the presence of cytoplasmic staining; and 3, peripheral membrane reactivity in > 50% of tumor cells, regardless of the presence of cytoplasmic staining. Cases with a score of 2-3 are considered positive and 0-1 are considered negative. Normal pancreatic tissue was used to control both receptors.

4. Statistical methods

The data were entered and processed with the IBM SPSS Statistics 25.0 statistical package. For a significance level at which the null hypothesis is rejected, p <0,05 was assumed.

Results

The study included 41 patients with a mean age of 62,54 ± 15,97 years in the range of 24-86 years. Twelve (29,3%) of them were men and 29 (70,7%) were women. In terms of localization, neuroendocrine tumors of the colon predominate (26,8%), followed by those of the appendix (24,4%), pancreas (19,5%) and stomach (7,3%). No patients were treated with somatostatin analogues. Surgical treatment was performed in the appropriate volume and general chemotherapy regimens were administered. The positive expression of somatostatin receptor 2 was 22% and of somatostatin receptor 5 – 20% *(Fig.1, Fig. 2)*.

The diffuse / focal expression ratio of receptor 2 is approximately 1,2 / 1 (17,1: 14,6), while of receptor 5 it is 1 / 3 (4,9: 14,6) *(Fig. 3, Fig. 4)*.

Somatostatin receptor expression 2

The Kaplan-Meyer analysis showed about 29 months lower survival of patients with positive somatostatin receptor 2 expression than those with negative, but the Log Rank, Breslow and Tarone-Ware tests found that the difference was not significant. The probable reason for this result is the low number of deaths in patients with somatostatin receptor 2 positive expression.

In Figure 5 it is seen that the survival rate of those with positive expression of somatostatin receptor 2 ends significantly earlier and falls to zero *(Fig. 5)*.

Somatostatin receptor expression 5

The Kaplan-Meyer analysis showed about 17 months lower survival rate of patients with positive somatostatin receptor 5 expression than those with negative, but the Log Rank, Breslow and Tarone-Ware tests found that the difference was not significant. The probable reason forthis result is the small number of deaths in patients with somatostatin receptor 5 positive expression.

In *Figure* 6 it is seen that the survival of those with positive expression of somatostatin receptor 5 ends significantly earlier, but with a higher value *(Fig. 6)*.

Table 1. Antibodies administered.

Antibodies	No	Producer	Dilution	Clonality	Ramus
Anti-Somatostatin Receptor 2 antibody	ab9550	abcam	1:100	Rabbit- poly	–
Anti-Somatostatin Receptor 5 antibody	ab28618	abcam	1:100	Rabbit- poly	–

Simultaneous expression of somatostatin receptors 2 and 5

The Kaplan-Meyer analysis showed about 27 months lower survival in patients with concomitant expression of somatostatin receptors 2 and 5 than the others, but the Log Rank, Breslow and Tarone-Ware tests found that the difference was not significant. The probable reason for this result is the small number of deaths in patients with positive expression.

In *Figure 7,* it can be seen that the survival function of positive co-expression of somatostatin receptors 2 and 5 ends significantly earlier, but with a higher value *(Fig 7)*. Since somatostatin receptor 2 expression is a dichotomous variable, we applied binary logistic analysis. Indicators such as carcinoid syndrome, tumor differentiation (G), histological type of tumor, disease stage, tumor location, age and sex were tested as possible factors. Somatostatin receptor 5 expression is alsoa dichotomous variable. We re-applied binary logistic analysis. The same parameters were tested as possible factors: carcinoid syndrome, tumor differentiation (G), histological type of tumor, stage of the disease, tumor location, age and sex.

Figure 1. Frequency distribution of patients by somatostatin receptor expression 2.

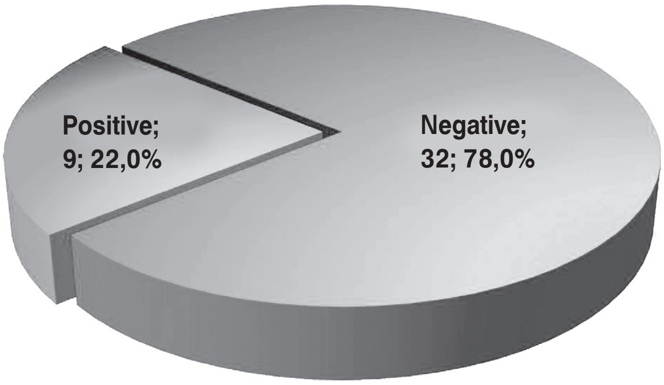
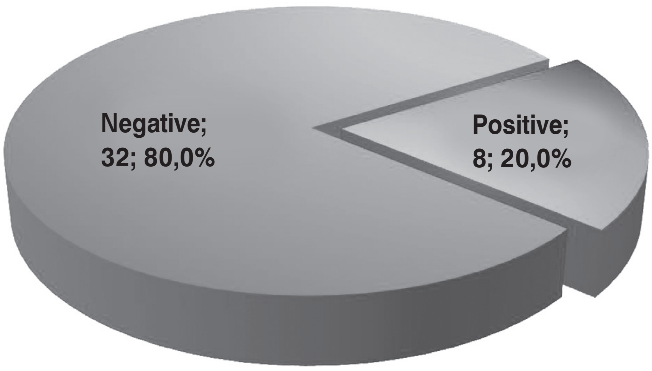


Figure 2. Frequency distribution of patients by somatostatin receptor 5 expression (data not available for one patient).



Discussion

Our aim was to study the expression of somatostatin receptors 2 and 5 in the patients we examined. An important feature of neuroendocrine tumors is the overexpression of somatostatin receptors, which allows obtaining not only a highly specific image by nuclear medical methods, but also personalized radionuclide treatment. Somatostatin binds to all somatostatin receptors, in contrast, the first synthesized somatostatin analogue octreotide and the subsequent synthesized lanreotide bind only to SSTR2 and SSTR5.Recent studies have shown that a large proportion of neuroendocrine neoplasms express somatostatin receptors SSTR1-SSTR5, which largely depends on the differentiation and type of tumor (24-28). Immunohistochemical studies in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms show that SSTR2 type is expressed in the highest percentage (84-100% of cases with G1-G2) and SSTR5 in a lower percentage (55 -83%) (29, 30). SSTR 2a showed expression in 100% of gastrinomas, 58% of insulinomas and 86% of gastrointestinal NETs, while SSTR5 immunoreactivity was found in 76% of gastrinomas, 78% of insulinomas and 83% of GEP-NETs (31).

In our study, positive expression of somatostatin receptor 2 was observed in 22% of patients, and for somatostatin receptor 5 it was 20%. For positive expression of SSR2 we accepted membrane staining or membrane and cytoplasmic, while for SSR5 – any staining, both cytoplasmic and membrane. The low frequency of expression of both receptors can be explained by the high percentage of poorly differentiated neuroendocrine carcinomas G3 in the cohort of patients we studied. We set the task of studying and comparing the focal and diffuse expression of the two receptors. The diffuse / focal expression ratio for receptor 2 is approximately 1,2 / 1, while for receptor 5 it is 1 / 3. Some studies have highlighted the role of focal expression as a reason for the lack of effect of treatment with somatostatin analogues (32).

Zhao et al reported 86,7% expression in GEP-NETs

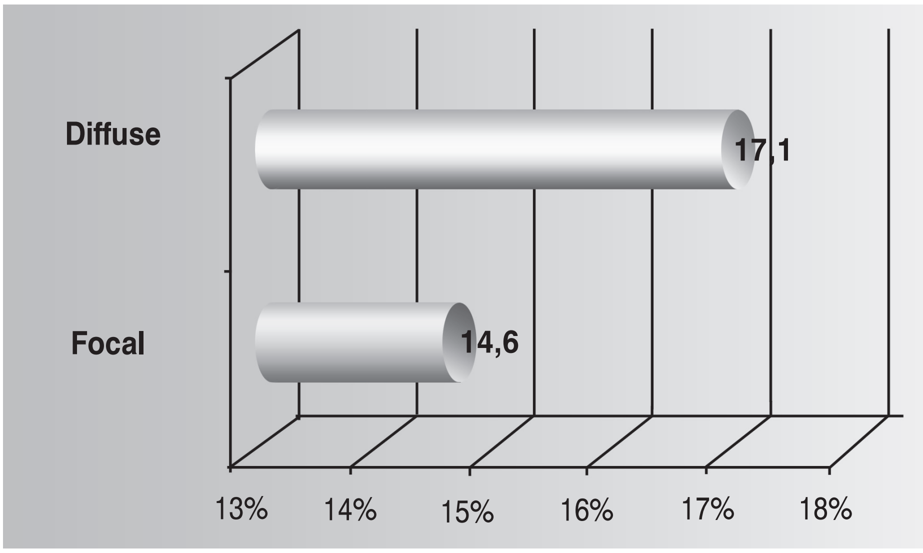
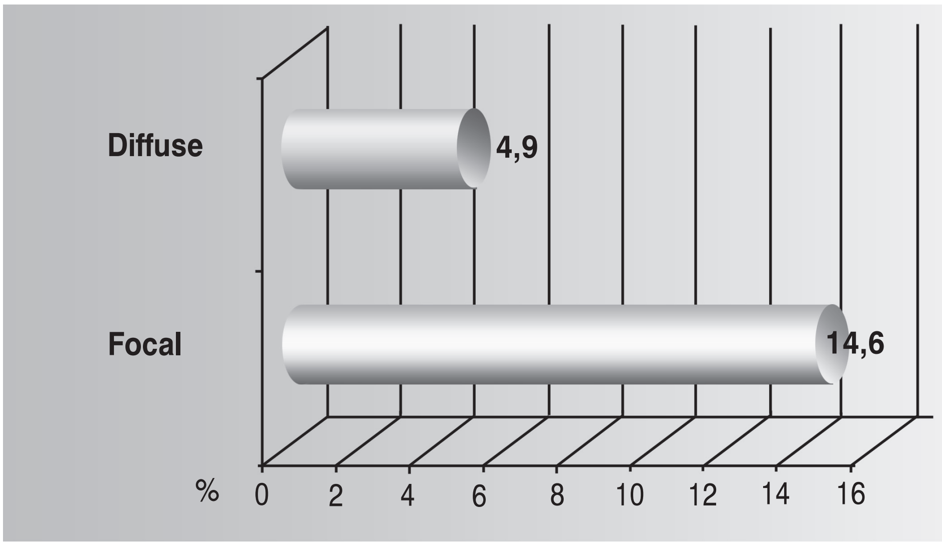


Figure 3.

Frequency distribution of patients by focal and diffuse somatostatin receptor 2 expression.

Figure 4 .

Frequency distribution of patients by focal and diffuse somatostatin receptor 5 expression.



of SSR2 and 47,2% of SSR5 (33). Volante et al. (4) reported 79% SSR2 expression in highly differentiated tumors, while in poorly differentiated tumors it was 44%. SSR5 is expressed in 71% of well-differentiated tumors, while in poorly differentiated the expression is only 28% (4). According to the degree of differentiation, SSTR 2 is expressed in 91% of G1 tumors, 82,8% in G 2 and 100% in G3. While SSTR5 show expression in 81,8%, 60% and 0% of grade G1, G2 and G3, respectively. Regarding the location of the tumor, heterogeneity in the expression of the two mentioned receptors is also observed. Eighty-five percent of pancreatic, 100% of gastric, 70% of small intestinal, 85,7% of appendicular, and 100% of rectal NETs show SSTR 2 expression. SSTR 5 is positive in: 61,9% of the pancreas, 37,5% of the stomach, 70% of the intestinal 71,5% of the appendicular and 66,6% of the rectal neuroendocrine tumors (34, 35). Pisarek et al. found that SSR5 expression decreased with increasing tumor differentiation (36). Volante et al. (4) found SSTR2 in 79% of well-differentiated neuroendocrine tumors/carcinomas and in 44% of poorly differentiated neuroendocrine carcinomas. Poorly differentiated tumors [G3 tumors and neuroendocrine carcinoma (NEC) + mixed adenoneuroendocrine carcinoma (MANEC)] have lower SSTR2 expression compared to well- and moderately differentiated tumors [G1, G2 tumors and neuroendocrine tumor (NET)]. The expression of SSTR2 in stage I and II tumors was 77,5%, which was significantly increased compared to stage III and IV tumors (58,3%; P=0,014) (4). Similarly, SSTR5 expression is significantly higher in pancreatic and well-differentiated tumors than in gastrointestinal and poorly differentiated tumors (37).

We did not find a similar relationship in our study. In our study, a higher rate of receptor expression was observed in G2 tumors. In the monitored cohort of patients, the percentage of those diagnosed with a neuroendocrine tumor of the pancreas was very low. We do not have data on the exact histological variant of thetumor. According to the literature, insulinomas in 90%

Figure 5 . Functions of overall survival according to somatostatin receptor 2 expression.

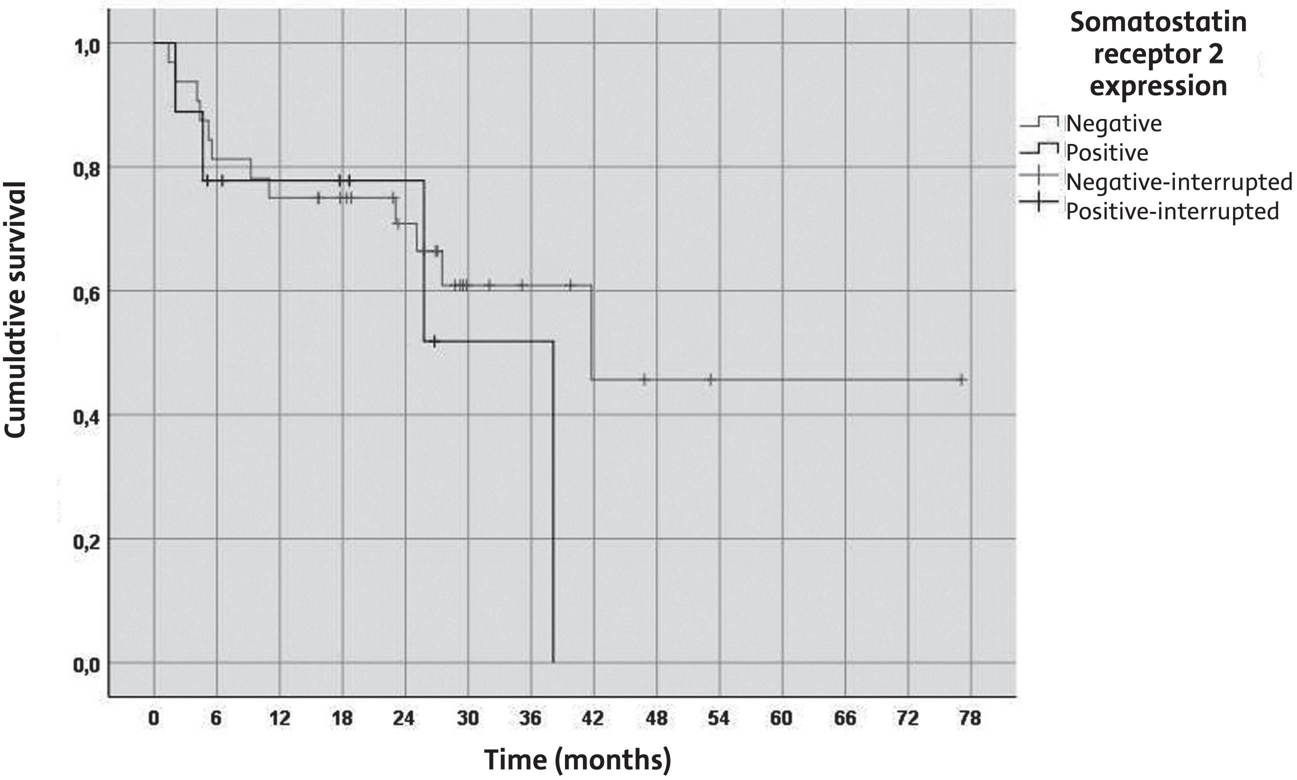


Figure 6 . Functions of overall survival according to somatostatin receptor expression 5.

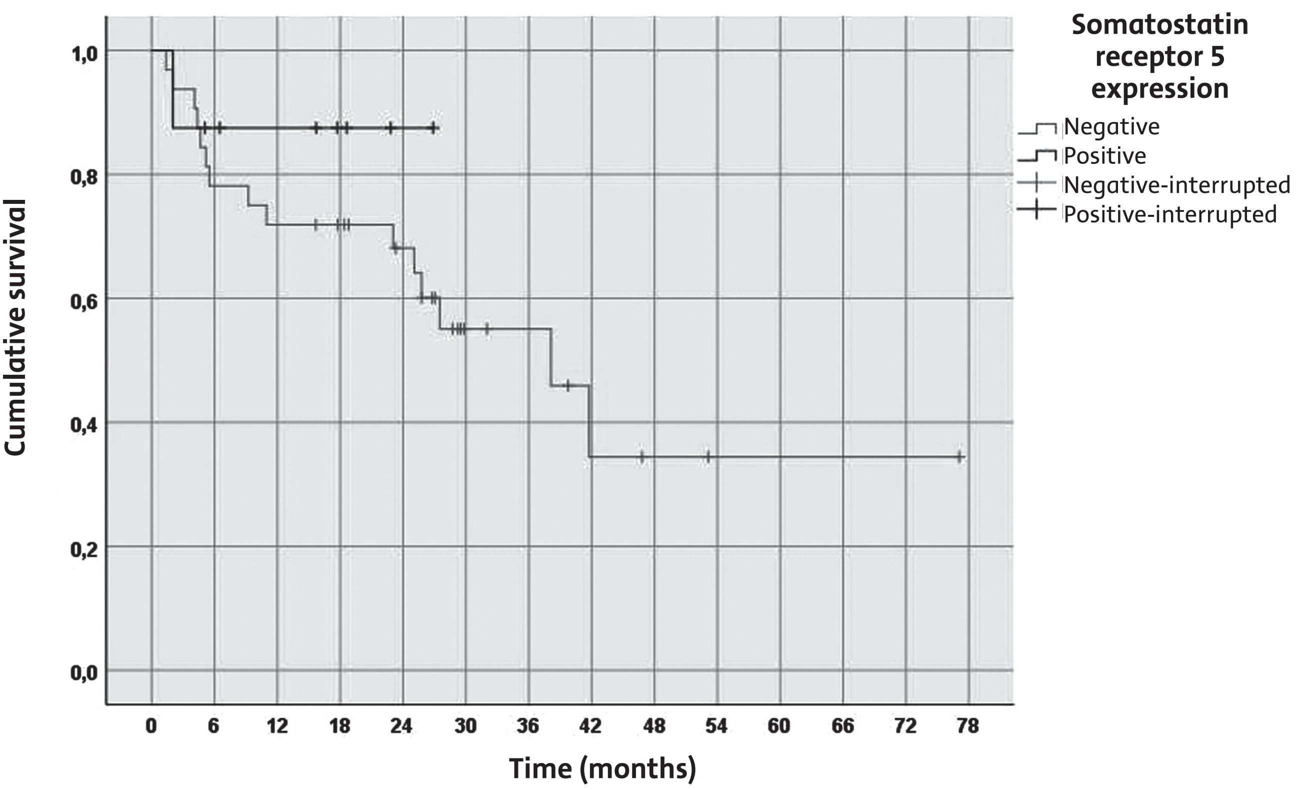
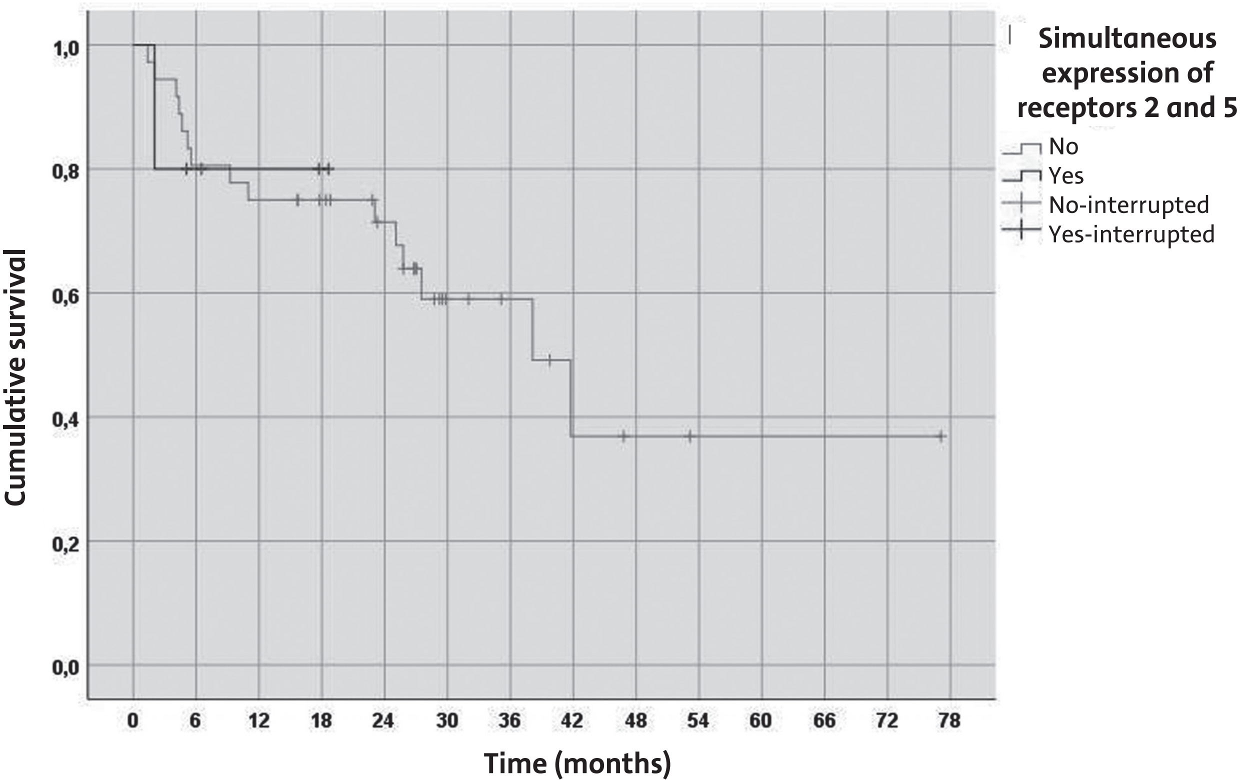


Figure 7. Functions of overall survival according to the indicator of simultaneous expression of somatostatin receptors 2 and 5.



of cases are benign and independent and in 99% are located in the pancreas (38). They express SSTR1 and SSTR2, while de Sa et al. (39) reported SSTR5 positive expression associated with tumor size and aggression. Glucagonoma is the third most common endocrine-secreting tumor of islet cells, which in 70% of cases is malignant. Glucagonomas show high expression of SSTR2 and lower expression of SSTR5. However, due to the very low frequency of glucagonomes, it is difficult to make a generalized statement about the typical expression pattern of SSTRs. Gastrinomas (gastrin-producing tumors) account for up to 20% of pancreatic endocrine tumors, SSTR2 (up to 100%) and SSTR5 (76-100%) are expressed predominantly in gastrinomas, which correlates well with the clinical response to octreotide treatment. Somatostatinomas (somatostatin tumors), which are 90% malignant and PP-producing tumors, are extremely rare. VIPomas are vasoactive intestinal polypeptides that produce tumors that are often foundin the endocrine islets. SSTR5 appears to be positive predominantly in somatostatinomas, while SSTR2- predominantly in VIPomas (40), providing a molecular basis for diagnostic and therapeutic targeting with radioactive octreotide.

Lower SSR2 expression correlates with a decrease in overall survival, whereas with more pronounced receptor positivity, survival is better. The lower expression of SSR2 suggests a weaker effect of the treatment.

In our study, the 29-month survival rate was lower in patients with positive SSR2 expression than in those with negative. We would explain this by the fact that the percentage of patients with NETs of the pancreas is only 19,5%.

Regarding the role of SSR5 expression as a predictor of survival, worldwide studies are limited. In our study, survival was 17 months lower in patients with SSR5-positive expression. Comparing the data for the two receptors, we can conclude that the relationship between digestibility and somatostatin receptor expression is stronger for somatostatin receptor 2. The overall survival is lower by about 27 months in patients with co-expression of SSR2 and SSR5. A result that is close to the data in the literature. High receptor expression suggests treatment with somatostatin analogues, and low – the use of general chemotherapy regimens (41).

Conclusion

A serious drawback of the immunohistochemical method is it‘s lack of standardization and indeterminate sensitivity. A scale for assessing somatostatin receptor 2 expression has been proposed by Volante et al. (4) which has been accepted but not validated. In the future, more studies on large populations are needed to establish standardized procedures for immunohistochemical assessment of somatostatin receptor expression.

References

1. **Bartsch DK, Albers M, Knoop R, Kann PH, Fendrich V, Waldmann J.** Enucleation and limited pancreatic resection provide long-term cure for insulinoma in multiple endocrine neoplasia type 1. *Neuroendocrinology 2013;* 98: 290–298.

2. **Jiao Y, Shi C, Edil BH, de Wilde RF, Klimstra DS, Maitra A, et al.** DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science 2011;* 331(6021): 1199-1203.

3. **Krampitz GW, Norton JA.**: Current management of the Zollinger-Ellison syndrome. *Adv Surg 2013;* 47: 59–79.

4. **Volante M, Brizzi MP, Faggiano A, La Rosa S, Rapa I, Ferrero A, et al.** Somatostatin receptor type 2A immunohistochemistry in neuroendocrine tumors: a proposal of scoring system correlated with somatostatin receptor scintigraphy. *Mod Pathol 2007;* 20: 1172–1182.

5. **Bergestuen DS, Aabakken L, Holm K, Vatn M, Thiis-Evensen E.** Small intestinal neuroendocrine tumors: prognostic factors and survival. *Scand J Gastroenterol 2009;* 44(9): 1084–1091.

6. **Jung KS, Yun KE, Chang Y, Ryu S, Park JH, Kim HJ, et al.** Risk factors associated with rectal neuroendocrine tumors: a cross-sectional study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2014;* 23: 1406–1413.

7. **Moore AR, Boyce M, Steele IA, Campbell F, Varro A, Pritchard DM.** Netazepide, a gastrin receptor antagonist, normalises tumour biomarkers and causes regression of type 1 gastric neuroendocrine tumours in a nonrandomised trial of patients with chronic atrophic gastritis. *PLoS One 2013;* 8(10): e76462.

8. **Unger N, Ueberberg B, Schulz S, Saeger W, Mann K, Petersenn S.** Differential expression of somatostatin receptor subtype 1-5 proteins in numerous human normal tissues. *Exp Clin Endocrinol Diabetes 2012;* 120: 482–489.

9. **Warner RR.** Enteroendocrine tumors other than carcinoid: a review of clinically significant advances. *Gastroenterology 2005;* 128(6):1668–1684.

10. **Reid MD, Balci S, Saka B, Adsay NV.** Neuroendocrine tumors of the pancreas: current concepts and controversies. *Endocr Pathol 2014;* 25 (1): 65-79.

11. **Rindi G, Klöppel G, Alhman H, Kaplin M, Couvelard A, et al.** TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch 2006;* 449: 395-401.

12. ***Lee CG, Lim YJ, Park SJ, Jang BI, Choi SR, Kim JK, et al.*** Neuroendocrine tumor study g. The clinical features and treatment modality of esophageal neuroendocrine tumors: a multicenter study in Korea. *BMC Cancer 2014;* 14: 569.

13. **Klimstra DS, Modlin IR, Coppola D, Lloyd RV, Suster S.** The pathologic classification of neuroendocrine tumors: a review of nomenclature, grading, and staging systems. *Pancreas 2010;* 39(6): 707–712.

14. **Dunn JP.** Carcinoid tumours of the appendix: 21 cases, with a review of the literature. NZ Med J 1982; 95: 73–76.

15. **Bruno JF, Xu Y, Song J,** Berelowitz M. Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA 1992;* 89: 11151–11155.

16. **Schulz S, Schulz S, Schmitt J, Wiborny D, Schmidt H, Olbricht S, et al.** Immunocytochemical detection of somatostatin receptors sst1, sst2A, sst2B, and sst3 in paraffin-embedded breast cancer tissue using subtype-specific antibodies. *Clin Cancer Res 1998;* 4: 2047–2052.

17. **Woelfl S, Bogner S, Huber H, Salaheddin-Nassr S, Hatzl M, Decristoforo C, et al.** Expressionof somatostatin receptor subtype 2 and subtype 5 in thyroid malignancies. *Nucl Med (Stuttg) 2014;* 53:179–185.

18. **Lee JL, Yu CS, Kim M, Hong SM, Lim SB, Kim JC.** Prognostic impact of diagnosing colorectal neuroendocrine carcinoma using the World Health Organization 2010 classification. *Surgery 2014;* 155: 650–658.

19. **Norton JA, Fraker DL, Alexander HR, Gibril F, Liewehr DJ, Venzon DJ, et al.** Value of surgery in patients with negative imaging and sporadic zollinger-ellison syndrome. *Ann Surg 2012;* 256: 509–517.

20. **Jann H, Roll S, Couvelard A, Hentic O, Pavel M, Müller-Nordhorn J, et al.** Neuroendocrine tumors of midgut and hindgut origin: Tumor-node-metastasis classification determines clinical outcome. *Cancer 2011;* 117: 3332-3341.

21. **Lupp A, Nagel F, Schulz S.** Reevaluation of sst1 somatostatin receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-7. *Regul Pept 2013;* 183:1–6.

22. **Papotti M, Kumar U, Volante M, Pecchioni C, Patel YC.** Immunohistochemical detection of somatostatin receptor types 1-5 in medullary carcinoma of the thyroid. *Clin Endocrinol (Oxf) 2001;* 54: 641–649.

23. **Schimmack S, Svejda B, Lawrence B, Kidd M, Modlin IM.** The diversity and commonalities of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Langenbecks Arch Surg 2011;* 396(3): 273–298.

24. **Ozao-Choy J, Buch K, Strauchen JA, Warner RR, Divino CM.** Laparoscopic antrectomy for the treatment of type I gastric carcinoid tumors. *J Surg Res 2010;* 162(1): 22–25.

25. **Klöppel G, Perren A, Heitz PU.** The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification. *Ann N Y Acad Sci 2004;* 1014: 13–27.

26. **Basuroy R, Srirajaskanthan R, Ramage JK.** A multimodal approach to the management of neuroendocrine tumour liver metastases. *Int J Hepatol 2012;* 2012: 819193.

27. **Srirajaskanthan R, Watkins J, Marelli L, Khan K, Caplin ME.** Expression of somatostatin and dopamine 2 receptors in neuroendocrine tumours and the potential role for new biotherapies. *Neuroendocrinology 2009;*89:308–314.

28. **O'Carroll AM, Lolait SJ, König M, Mahan LC.** Molecular cloning and expression of a pituitary somatostatin receptor with preferential affinity for somatostatin-28. *Mol Pharmacol 1992;* 42: 939–946.

29. **Peranteau WH, Palladino AA, Bhatti TR, Becker SA, States LJ, Stanley CA, Adzick NS.** The surgical management of insulinomas in children. *J Pediatr Surg 2013;* 48: 2517– 2524.

30. **Connor SJ, Hanna GB, Frizelle FA.** Appendiceal tumors: retrospective clinicopathologic analysis of appendiceal tumors from 7,970 appendectomies. *Dis Colon Rectum 1998;* 41(1): 75–80.

31. **Singhal H:** Carcinoid tumor, Intestinal. Available online at: http://www.emedicine.com.

32. **Yamada Y, Post SR, Wang K, Tager HS, Bell GI, Seino S.** Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. *Proc Natl Acad Sci USA 1992;* 89: 251–255.

33. **Zhao W-Y, Zhuang C, Xu J, Wang M, Zhang Z-Z, Tu L, et al.** Somatostatin receptors in gastrointestinal stromal tumors: new prognostic biomarker and potential therapeutic strategy. *Am J Transl Res 2014;* 6: 831–840.

34. **Wiedenmann B, Pavel M, Kos-Kudla B.** From targets to treatments: a review of molecular targets in pancreatic neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology 2011;* 94(3): 177–190.

35. **Toumpanakis C, Standish RA, Baishnab E, Winslet MC, Caplin ME.** Goblet cell carcinoid tumors (adenocarcinoid) of the appendix. *Dis Colon Rectum 2007;* 50(3): 315–322.

36. **Pisarek H, Krupinski R, Kubiak R, Borkowska E, Pawlikowski M, Winczyk K.** Differential expression of somatostatin receptor subtype-related genes and proteins in non-functioning and functioning adrenal cortex adenomas. *Mol Med Rep 2011;* 4: 963–969

37. **Rinke A, Muller HH, Schade-Brittinger C, Klose KJ, Barth P, Wied M, Mayer C .** Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors a report from the PROMID Study Group. *J Clin Oncol 2009;* 27: 4656-4663.

38. **Tamagno G, Sheahan K, Skehan SJ, Geoghegan JG, Fennelly D, Collins CD, et al.** Initial impact of a systematic multidisciplinary approach on the management of patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor. *Endocrine 2013;* 44(2): 504–509.

39. **de Sá SV, Corrêa-Giannella ML, Machado MC, de Souza JJ, Pereira MA, Patzina RA, Siqueira SA, Machado MC, Giannella-Neto D.** Somatostatin receptor subtype 5 (SSTR5) mRNA expression is related to histopathological features of cell proliferation in insulinomas. *Endocr Relat Cancer 2006;* 13(1): 69-78.

40. **Hemminki K, Li X.** Incidence trends and risk factors of carcinoid tumors: a nationwide epidemiologic study from Sweden. *Cancer 2001;* 92(8): 2204–2210.

41. **Demirev A, Kostadinova.** Role of Positron Emission Tomography – Computer Tomography /PET-CT/ in patients with neuroendocrine tumours. *Journal of Bulgarian Society of Oncology 2015;*4: 35-39 (In Bulgarian) [**Демирев А, Костадинова И.** Ролята на позитронната емисионна томография-компютърна томография /ПЕТ-КТ/ при болни с нервоендокринни тумори. *Списание на българското онкологично дружество 2015;*4: 35-39].

Серумна концентрация на естрадиола при жени с недребноклетъчен белодробен рак

Учиков, Петър А.[1], Учиков, Ангел П.[1], Орбецова, Мария М.[2], Гаргова-Мерджанова, Яна Т.[3], Учикова, Екатерина Х.[3]

[1] Втора Хирургична Клиника, УМБАЛ „Св. Георги", Катедра Специална хирургия, МФ, МУ, Пловдив
[2] Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Св. Георги", Катедра Ендокринология, МФ, МУ, Пловдив
[3] Клиника по Акушерство и гинекология, УМБАЛ „Св. Георги", Катедра Акушерство и гинекология, МФ, МУ, Пловдив

Адрес за кореспонденция:
Проф. Екатерина Учикова, дм,
Клиника по Акушерство и гинекология, УМБАЛ „Св. Георги",
ул. „Пещерско шосе" №66, Пловдив-4000
e-mail: euchikova@yahoo.com

Постъпване: 16. 12. 2020
Приемане: 22. 02. 2021

Резюме

Половите хормони участват в развитието на женските полови органи и формирането на вторичните полови белези, в калциевия метаболизъм и туморогенезата на гърда, ендометриум, бял дроб и др. Установено е, че в белодробната ракова тъкан се синтезира ароматаза, която превръща андростендиона и тестостерона в естрон и естрадиол.

Цел: Да се изследва серумната концентрация на естрадиола при жени с недребноклетъчен белодробен рак (НДБР).

Материал и методи: Проведено е ретроспективно проучване от типа „случай-контрола" в Катедрата по Специална хирургия, МУ, Пловдив и Втора хирургична клиника, УМБАЛ „Св. Георги" – Пловдив, върху 90 жени, непушачки, разпределени в две групи: „случаи" – 49 жени с НДБР и „контроли" – 41 жени.

Резултати: Средната възраст при жените с НДБР е 65,90 ± 12,02 г., като най-младата жена е на 40 г., а най-възрастната – на 87 г. Серумната концентрация на естрадиола в групата на случаите е почти 5 пъти по-висока в сравнение с контролната група. Установихме сигнификантна корелация между нивата на естрадиола и наличието на НДБР (p=0,04).

Заключение: По-високата серумна концентрация на естрадиол в менопаузата е рисков фактор за развитието на недребноклетъчен белодробен рак.

Ключови думи: недребноклетъчен белодробен рак, естрадиол, менопауза, естрогенови рецептори.

Въведение

През последните 20 години се задълбочиха проучванията върху половите различия при някои малигнени заболявания, включително и при карцинома на белия дроб (1). Известно е, че половите хормони участват в развитието на женските полови органи и формирането на вторичните полови белези, в калциевия метаболизъм и туморогенезата на гърда, ендометриум, бял дроб и др. Това обяснява експресията на прогестеронови и естрогенови рецептори както в нормалната, така и в туморно променената тъкан. В белодробната ракова тъкан се синтезира ароматаза (CYP19A1). Тя е цитохтом P-450 ензим, който превръща андростендиона и тестостерона в естрон и естрадиол (2).

Все повече се дискутира участието на хормоналните фактори в патогенезата на белодробния рак, като е доказана положителна корелация между високите нива на ароматаза и естрадиол (E2) в раковите клетки при жени с недребноклетъчен белодробен рак (НДБР) (3,4).

Материали и методи

Проведено е ретроспективно проучване по типа „случай-контрола“ във Втора Хирургична Клиника, УМБАЛ „Св. Георги“ и Катедрата по Специална хирургия, МУ – Пловдив, в периода м. януари 2016 г. – м. септември 2019 г. Обхванати са 90 жени, непушачки, разделени в две групи: „случаи“ – 49 пациентки с НДБР (включващи критерии: възраст > 40 г.; раждали жени; жени с естествено настъпила менопауза; хистологично доказан карцином на белия дроб); „контроли“ – 41 пациентки, аналогични по критерии на първата група, но без онкологични заболявания. Проучването отговаря напълно на стандартите и критериите за научност и етичност и е одобрено от Комисията по Научна етика към Съвета по Научно-изследователска дейност при МУ, Пловдив.

Серумната концентрация на естрадиола, с референтни стойности за жени в менопауза (73-147 pmol/L) е определена имунохимично, чрез

Таблица 1.

Процентно разпределение по възрастови групи.

	Група случаи		Контролна група	
Възраст	N	%	N	%
40г.	2	4,10%	0	0%
41-50г.	5	10,20%	1	2,40%
51-60г.	8	16,30%	9	22,00%
61-70г.	15	30,60%	19	46,30%
71-80г.	14	28,60%	12	29,30%
>80г.	5	10,20%	0	0%
Общо	**49**	100%	**41**	100%

използване на хемилуминсцентен прицип с автоматичен имунологичен анализатор (Access 2) в Централна Клинична Лаборатория – УМБАЛ „СВ. Георги“, Пловдив. Биологичният материал е взет атравматично при спазване на стандартните условия. За целите на изследването е използван серум без хемолиза и липемия.

Статистическата обработка на резултатите е извършена със статистически пакет SPSS v 23; SPSS Inc., Chicago, IL, USA. Използваните анализи са: честотно разпределение, χ^2 („хи квадрат“) на Пирсън, коефициент на Крамер и линеен регресионен анализ, one-way ANOVA. Резултатите са представени чрез средна аритметична величина и стандартно отклонение (mean ± SD). Използваното критично ниво на значимост е α=0,05. Съответната нулева хипотеза се отхвърля, когато P стойността (P-value) е по-малка от α.

Резултати

Средната възраст при групата с НДБР е 65,90±12,02 г., като най-младата жена е на 40 г., а най-възрастната – на 87 г. Средната възраст при контролната група е съпоставима – 64,95±7,04, като най- младата жена е на 48 г., а най-възрастната – на 77 г. Процентното разпределение по възрастови групи е представено в *Таблица1*.

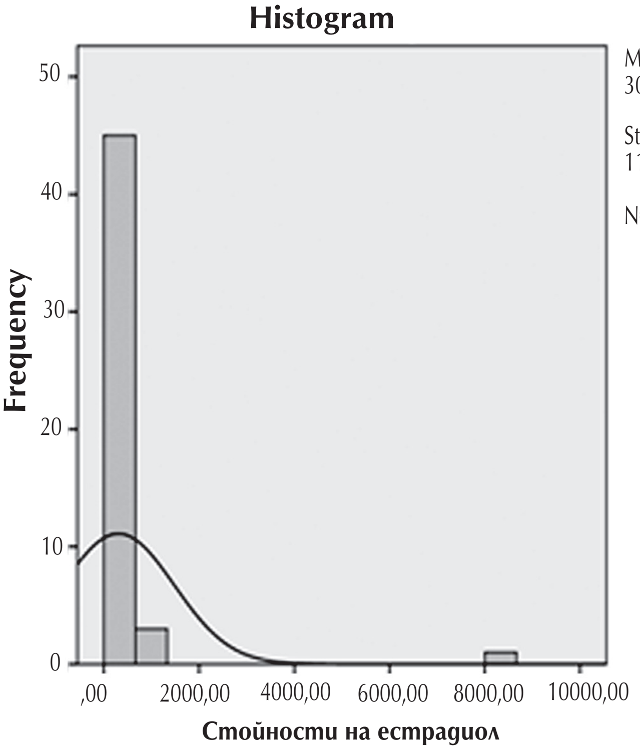
Не беше доказана статистически значима разлика между възрастта на контролната група и групата на случаите (p>0.05). Най-голям и при двете групи е процентът на жените във възрастта 61-70 г.

Установяваме статистически значима разлика в средните стойности на естрадиола при изследваните от нас групи (p<0,0001). При групата на случаите средна стойност на естрадиола е 304,14 pmol/L *(Фиг.1)*, а при контролната група средната стойност е 63,05 pmol/L *(Фиг.2)*. Серумната концентрация на естрадиола в групата на жените с белодробен карцином е почти пет пъти по-висока в сравнение с контролната група. Установихме сигнификантна корелация между серумната концентрация на естрадиола и наличието на карцином на белия дроб (p=0,04).

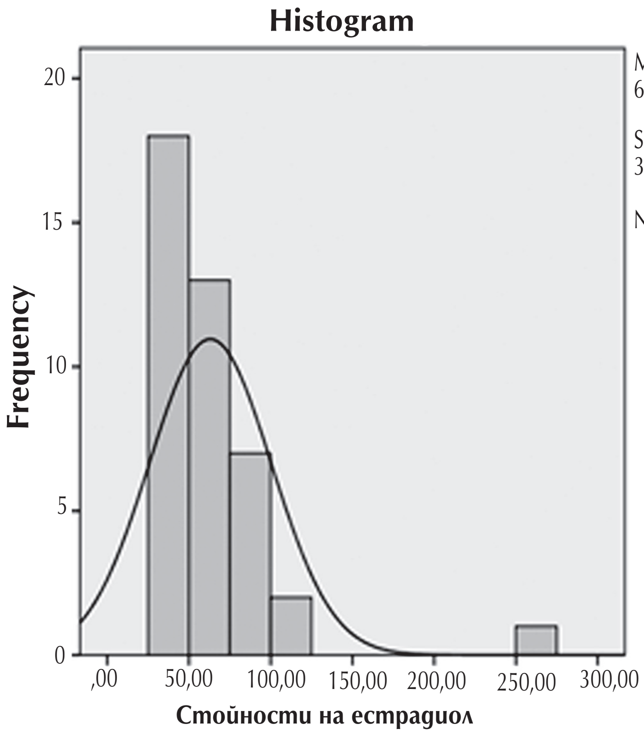
Обсъждане

Половите различия по отношение на белодробния рак налагат необходимостта от анализиране на ролята на женските полови хормони. Жените с НДБР имат по-високи нива на естрогени в серума в сравнение с клинично здрави жени на същата възраст, като нивото им намалява значително след лечение (5,6). В нашето проучване установяваме почти пет пъти по-високи нива на естрадиол в серума при жени с НДБР в сравнение с контролната група.

Естрогените при жените в репродуктивна възраст се синтезират от яйчника



Фигура 1. Стойности на естрадиол в групата на случаите



Фигура 2.
Стойности на естрадиол в контролната група

и плацентата. Известно е, че серумните нива на естрадиола се увеличават непрекъснато през бременността, като достигат своя пик през втория и третия триместър (до 7200 pg/mL). За сравнение, стойностите на естрадиола в постменопаузата са под 18 pg/mL (2,7,8). При жените в постменопауза естрогените се синтезират чрез CYP19A1 в негонадна тъкан като мастна тъкан и бял дроб. Ароматазата има множество промотори и те се експресират както в първичната, така и в метастатичната белодробна тъкан, което от своя страна стимулира синтезата на β-естрадиол в раковите клетки. Доказана е положителна корелация между високите нива на ароматаза и естрадиол в раковите клетки при жени с НДБР (3,4,9-11).

Ikeda K. и сътр. (11) изследват концентрациите на естроген в нормална и туморна тъкан на белия дроб и установяват високи нива на естрогените в туморната тъкан. В други проучвания при жени в менопауза с карцином на белия дроб са установени високи концентрации на естрадиола в плевралната течност при изследване на малигнени плеврални изливи (9,12).

Счита се, че екзогенно внесените хормони могат да повлияят развитието на рак на белия дроб. Но, данните за връзката между хормонозаместителната терапия (ХЗТ) и риска от карцином на белия дроб са противоречиви. Рандомизирани контролирани проучвания предполагат, че терапията с естроген/прогестин повишава заболеваемостта и смъртността от рак на белия дроб (13,14). Така, Slatore C. и сътр. (13) докладват, че жените в менопауза, приемащи комбинацията естроген/прогестин имат 50% по-висок риск от развитие на рак на белия дроб при употреба на препаратите повече от 10 години.

Greiser C. и сътр. (14) извършват систематичен преглед и мета-анализ на 18 проучвания за риска от рак на белия дроб след употреба на ХЗТ. Обобщеният анализ на данните показва, че употребата на ХЗТ при непушачки може да увеличи риска от белодробен аденокарцином (14).

Установяват се етнически и географски особености в честотата на рака на белия дроб при жените непушачки.

Проучване в Съединените Американски Щати показва, че 10-15% от НДБР се установява при непушачи, като по-често е при жените (17,5%) в сравнение с мъжете (6,9%). В Азия над 50% от жените непушачки развиват рак на белия дроб (15).

За връзката между естрогените и карцинома на белия дроб говори и експресията на естрогенни рецептори в туморната тъкан. В белодробната ракова тъкан при НДБР основно се експресира естрогенов рецептор – β (ER- β). Най-вероятно той участва във вътреутробното развитие на белия дроб. ER-β е функционален рецептор с афинитет към -естрадиола. Активността на ER-β може да бъде блокирана in vitro с инхибитори. Прогестеронът инхибира клетъчната пролиферация и индуцира апоптозата при НДБР. Този ефект на прогестерона корелира с по-голяма преживяемост при жени с НДБР (16,17).

Както при мъжете, така и при жените в около 73% от случаите на НДБР се установяват по-високи нива на естрадиол в раковата тъкан. Тези резултати отново показват, че естрадиолът се произвежда локално в НДБР чрез интратуморния синтез на ароматаза (16-18). Резултатите от нашето проучване потвърждават зависимостта между серумната концентрация на естрадиола и наличието на НДБР.

Белодробният рак се очертава като основен здравен проблем при жените, с непрекъснато нарастваща честота и висока смъртност. Жените непушачки по-често развиват белодробен рак в сравнение с мъжете непушачи, което отново поставя въпроса за участието на хормоналните фактори в генезата на НДБР при жените (18).

Дизайнът на проучването и обемът на изследваната извадка са лимитиращи по отношение на категорични изводи, но установената от нас положителна корелация между високите серумни концентрации на естрадиола и развитието на НДБР е в полза на предполагаемото участие на естрогените в генезата на заболяването.

В заключение: Правилното интерпретиране и по-нататъшните задълбочени проучвания върху ролята на естрогените в карциногензата на НДБР при жените, най-вероятно би променило стратегията за превенция и лечение.

Serum Estradiol Concentration in Women with Non-small Cell Lung Cancer

Uchikov, Petar A.[1], Uchikov, Angel P.[1], Orbetzova, Maria M.[2], Gargova-Merdjanova, Yana T.[3], Uchikova, Ekaterina H.[3]

[1] Second Surgical Clinic, „Sv. Georgy" University Hospital, Department of Special Surgery, Medical Faculty, Medical University, Plovdiv

[2] Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases, University Hospital, Department of Endocrinology, Medical Faculty, Medical University, Plovdiv

[3] Clinic of Obstetrics and Gynecology, „Sv. Georgy" University Hospital, Department of Obstetrics and Gynecology, Medical Faculty, Medical University, Plovdiv

Address for correspondence:
Prof. Ekaterina Uchikova, MD
Clinic of Obstetrics and Gynecology, University Hospital "Sv. Georgy",
Peshtersko Shosse Street №66, Plovdiv-4000
e-mail: euchikova@yahoo.com

Submitted: 16. 12. 2020
Accepted: 22. 02. 2021

Abstract

Sex hormones are involved in the development of the female genital organs and the formation of secondary sexual characteristics, in calcium metabolism and in tumorigenesis of the breasts, endometrium, lungs and others. Aromatase has been found to be synthesized in lung cancer tissue and it converts androstenedione and testosterone to estrone and estradiol.

Objective: To investigate the serum estradiol concentration in women with non-small cell lung cancer (NSCLC).

Material and methods: A retrospective study of the „case-control" type was conducted at the Department of Special Surgery, at the Medical University of Plovdiv and the Second Surgical Clinic, in the „Sv. Georgy" University Hospital – Plovdiv, on 90 women, non-smokers, divided into two groups: „cases" – 49 women with NSCLC and „controls" – 41 women.

Results: The mean age of women with NSCLC was 65,90±12,02 years, with the youngest woman being 40 years old and the oldest being 87 years old. The serum estradiol concentration in the case group was almost 5 times higher than in the control group. We found a significant correlation between estradiol levels and the presence of NSCLC (p=0,04).

Conclusion: Higher serum estradiol concentration at menopause is a risk factor for the development of non-small cell lung cancer.

Key words: non-small cell lung cancer, estradiol, menopause, estrogen receptors.

Introduction

In the last 20 years, studies on gender differences in some malignancies, including lung cancer, have intensified (1). It is known that sex hormones are involved in the development of the female genitalia and the formation of secondary sexual characteristics, in calcium metabolism and tumorigenesis of the breasts, endometrium, lungs and others. This explains the expression of progesterone and estrogen receptors in both normal and tumor-altered tissue. Aromatase (CYP19A1) is synthesized in lung cancer tissue. It is a cytochtom P-450 enzyme that converts androstenedione and testosterone to estrone and estradiol (2).

The involvement of hormonal factors in the pathogenesis of lung cancer is increasingly being discussed, with a positive correlation between high levels of aromatase and estradiol (E2) in cancer cells in women with non-small cell lung cancer (NSCLC) (3,4).

Material and methods

A retrospective study on the type of „case-control“ was conducted at the Second Surgical Clinic, "Sv. Georgy“ University Hospital and the Department of Special Surgery, MU - Plovdiv, during the period January 2016 - September 2019. Ninety non-smoking women were analyzed, divided into two groups: „Cases“- 49 patients with NSCLC including criteria: age > 40 years, women who gave birth, women with natural menopause, histologically proven lung cancer; „Controls“ – 41 patients, similar in criteria to the first group, but without cancer. The study completely meets the standards and criteria for science and ethics and is approved by the Commission on Scientific Ethics at the Council for Research at MU-Plovdiv.

The serum concentration of estradiol, with reference values for menopausal women (73-147 pmol/L), was determined immunochemically, using a chemiluminescent principle with an automatic immunological analyzer (Access 2) in the Central Clinical Laboratory – „Sv. Georgy“ University Hospital, Plovdiv. The biological material was taken atraumatically under standard conditions. Serum without hemolysis and lipemia was used for the study.

Statistical processing of the results was performed with the statistical package SPSS v 23; SPSS Inc., Chicago, IL, USA. The analyzes used are: frequency distribution, Pearson's χ^2 („chi square“), Kramer's coefficient and linear regression analysis, one-way ANOVA. Results are presented by arithmetic mean and standard deviation (mean ± SD). The critical significance level used is $\alpha = 0{,}05$. The corresponding null hypothesis is rejected when the P-value is less than α.

Table 1. Percentage distribution by age groups.

	Group of cases		Control group	
Age	**N**	%	**N**	%
40 y	2	4,10%	0	0%
41-50 y	5	10,20%	1	2,40%
51-60 y	8	16,30%	9	22,00%
61-70 y	15	30,60%	19	46,30%
71-80 y	14	28,60%	12	29,30%
>80 y	5	10,20%	0	0%
Total	**49**	100%	**41**	100%

Results

The mean age in the group NSCLC was 65,90±12,02 years, with the youngest woman being 40 years old and the oldest being 87 years old. The mean age in the control group was 64,95±7,04, as the youngest woman was 48 years old, and the oldest – 77 years old. The percentage distribution by age groups is presented in *Table1*.

There was no statistically significant difference between the age of the control group and the case group (p> 0,05). The percentage of women aged 61-70 was the highest in both groups.

We found a statistically significant difference in the mean values of estradiol in the groups we studied (p <0,0001). In the case group, the mean value of estradiol was 304,14 pmol/L *(Fig. 1),* and in the control group the mean value was 63,05 pmol/L *(Fig. 2)*. The serum concentration of estradiol in the group of women with lung cancer was almost five times higher than in the control group. We found a significant correlation between serum estradiol concentration and the presence of lung cancer (p=0,04).

Discussion

Gender differences in lung cancer necessitate an analysis of the role of female sex hormones. Women with NSCLC have higher serum estrogen levels than clinically healthy women of the same age, and their levels decrease significantly after treatment (5, 6). In our study, we found serum estradiol levels almost five times higher in women with NSCLC compared to the control group.

Estrogens in women of reproductive age are synthesized by the ovary and the placenta. Serum estradiol levels are known to increase continuously during pregnancy, reaching their peak during the second and third trimesters (up to 7200 pg/mL). In comparison, postmenopausal estradiol levels are below 18 pg/mL (2, 7, 8). In postmenopausal women estrogens are synthesized by CYP19A1 in non-gonadal tissues such as adipose tissue and lung tissue. Aromatase has multiple promoters and they are expressed in both primary and metastatic lung tissue, which in turn stimulates the synthesis of β-estradiol in cancer cells. There is a positive correlation between high levels of aromatase and estradiol in cancer cells in women with NSCLC (3, 4, 9-11).

Ikeda K. et al (11) examined estrogen concentrations in normal and tumor lung tissue and found high levels of estrogen in tumor tissue. In other studies in menopausal women with lung cancer, high concentrations of estradiol in the pleural fluid were found in a study of malignant pleural effusions (9,12).

It is believed that exogenously imported hormones may influence the development of lung cancer. However, data on the relationship between hormone replacement therapy (HRT) and the risk of lung cancer are contradictory. Randomized controlled trials suggest that estrogen / progestin therapy increases lung cancer morbidity and mortality (13, 14). Thus, Slatore C. et al. (13) reported that menopausal women taking the estrogen / progestin combination had a 50% higher risk of developing lung cancer when using these medications for more than

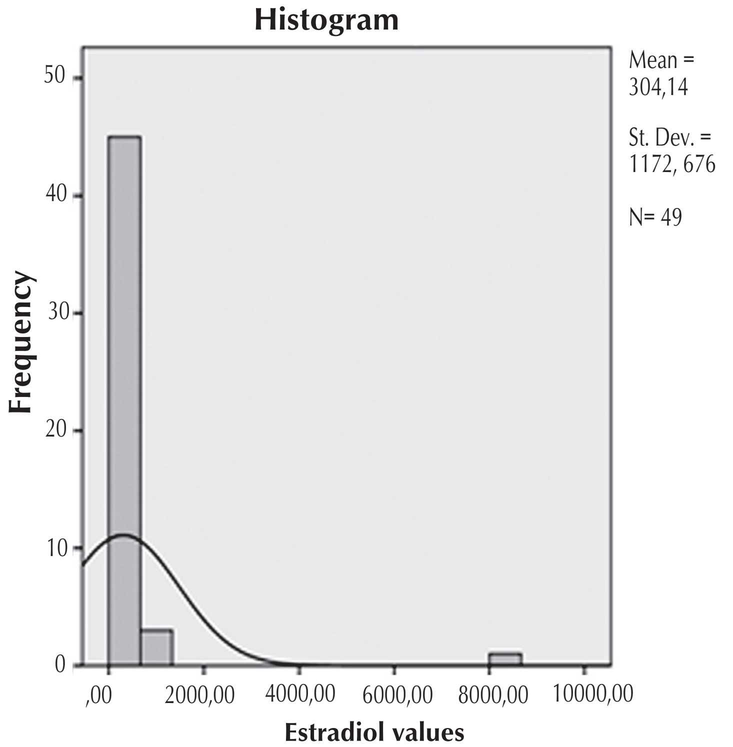


Figure 1. Estradiol values in the case group

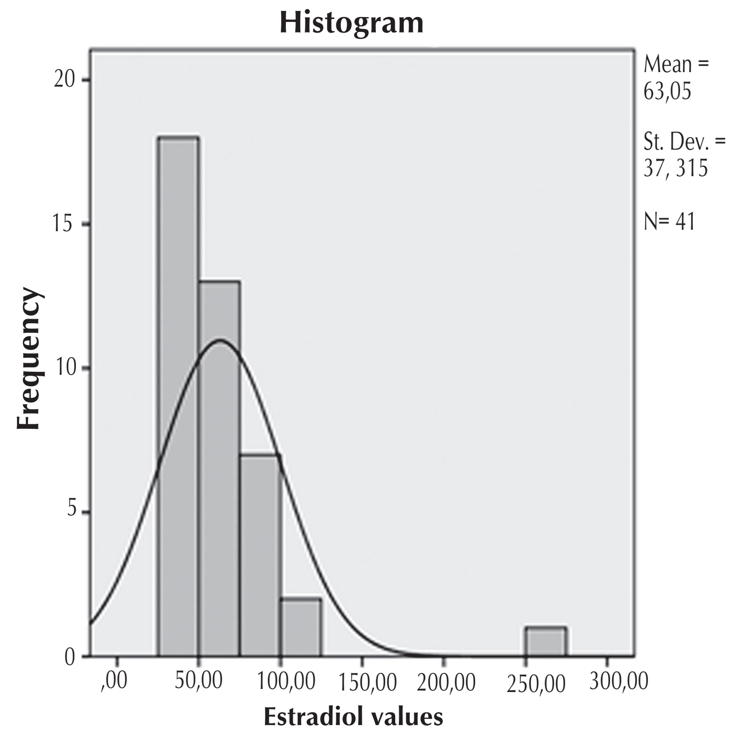


Figure 2. Estradiol values in the control group

10 years. Greiser S. et al. (14) performed a systematic review and meta-analysis of 18 studies on the risk of lung cancer after HRT use. A generalized analysis of the data shows that the use of HRT in non-smokers may increase the risk of lung adenocarcinoma (14).

Ethnic and geographical features in the incidence of lung cancer in non-smoking women have been established. A study in the United States shows that 10-15% of NSCLC cases are found in non-smokers, more often in women (17,5%) compared to men (6,9%). In Asia, more than 50% of non-smoking women develop lung cancer (15).

The expression of estrogen receptors in the tumor tissue shows the relationship between estrogen and lung cancer.

The relationship between estrogen and lung cancer is also indicated by the expression of estrogen receptors in tumor tissue. The estrogen receptor – β (ER- β) is mainly expressed in the lung cancer tissue in patients with NSCLC and is most probably involved in the intrauterine development of the lungs. ER-β is a functional receptor with affinity for β-estradiol. ER-β activity can be blocked in vitro by inhibitors. Progesterone inhibits cell proliferation and induces apoptosis in NSCLC. This effect of progesterone correlates with higher survival rates in women with NSCLC (16, 17).

In both men and women, higher levels of estradiol in cancerous tissue are found in approximately 73% of cases of NSCLC. These results again show that estradiol is produced locally in the NSCLC by intratumoral aromatase synthesis (16-18). The results of our study confirm the relationship between serum estradiol concentration and the presence of NSCLC.

Lung cancer is emerging as a major health problem in women, with an increasing incidence and high mortality. Non-smoking women are more likely to develop lung cancer than non-smoking men, which again raises the question of the role of hormonal factors in the genesis of NSCLC in women (18).

The design of the study and the volume of the studied sample are limiting in terms of definite conclusions, but our positive correlation between high serum estradiol concentrations and the development of NSCLC is in favor of the presumed participation of estrogens in the genesis of the disease.

In conclusion: Proper interpretation and further in-depth studies on the role of estrogens in NSCLC carcinogen in women are likely to change the prevention and treatment strategy.

References

1. **North C, Christiani D.** Women and lung cancer: Whats New? *Semin Thorac Cardiovasc Surg 2013;* 25 (2):87-94.

2. **Assaggaf H, Felty Q.** Gender, Estrogen, and Obliterative Lesions in the Lung. *Int J Endocrinol 2017;* 2017: 8475701. doi: 10.1155/2017/8475701.

3. **Chlebowski R, Anderson G, Manson J, Schwartz A, Wakelee H, Gass M, et al.** Lung cancer among postmenopausal women treated with estrogen alone in the Women's Health Initiative randomized trial. *J Natl Cancer Inst 2010;* 102: 1413–1421.

4. **Ding X, Tang C, Wang Z, Liang J.** Recent Advances in Association of Estrogen and Non-small Cell Lung Cancer. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi 2017;* 20(7): 499-504.

5. **Hon J, Singh B, Sahin A, Du G, Wang J,Wang V, et al.** Breast cancer molecular subtypes: from TNBC to QNBC. *Am J Cancer Res 2016;* 6: 1864–1872.

6. **Rutkowska A, Szybiak A, Serkies K, Rachoń D.** Endocrine disrupting chemicals as potential risk factor for estrogen-dependent cancers. *Pol Arch Med Wewn 2016;* 126: 562–570.

7. **Carranza-Lira S, Hernández F, Sánchez M, Murrieta S, Hernández A, Sandoval C.** Prolactin secretion in molar and normal pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet 1998;* 60(2): 137-141.

8. **He F, Xie J, Liu C, Xiong W, Xu Q, Liu Z, et al.** The relationship of lung cancer with menstrual and reproductive factors may be influenced by passive smoking, cooking oil fumes,and tea intake. A case–control study in Chinese women. *Medicine 2017;* 96:46.

9. **Hsu L, Chu N, Kao S.** Estrogen, Estrogen Receptor and Lung Cancer. *Int J Mol Sci 2017;* 18(8).

10. **Honma N, Hosoi T, Arai T, Takubo K.** Estrogen and cancers of the colorectum, breast, and lung in postmenopausal women. *Pathol Int 2015;* 65: 451–459.

11. **Ikeda K, Shiraishi K, Yoshida A, Shinchi Y, Sanada M, Motooka Y, et al.** Synchronous multiple lung adenocarcinomas: Estrogen concentration in peripheral lung. *PLoS ONE 2016;*11(8): e0160910. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160910.

12. **Hsu L, Liu K, Tsai M, Wu C, Feng A, Chu N, et al.** Estrogen adversely affects the prognosis of patients with lung adenocarcinoma. *Cancer 2015;* 106: 51–59.

13. **Slatore C, Chien J, Au D, Satia J, White E.** Lung cancer and hormone replacement therapy: Association in the vitamins and lifestyle study. *J Clin Oncol 2010;* 28: 1540–1546.

14. **Greiser C, Greiser E, Dören M.** Menopausal hormone therapy and risk of lung cancer-systematic review and meta-analysis. *Maturitas 2010;* 65: 198–204.

15. **Pelosof L, Ahn C, Gao A.** Proportion of never-smoker non-smallcell lung cancer patientsat three diverse institution. *J Natl Cancer Inst 2017;* 7: 1195-1211.

16. **Marquez-Garban D, Mah V, Alavi M, Maresh E, Chen H, Bagryanova L, et al.** Progesterone and estrogen receptor expression and activity in human non-small cell lung cancer. *Steroids 2011;* 76(9): 910-920.

17. **Siegfried J, Stabile L,** Estrogenic steroid hormones in lung cancer. *Semin Oncol 2014;* 41: 5-16.

18. **MacRosty C, Rivera P.** Lung cancer in women. A modern epidemic. *Clin Chest Med 2020;* 41(1): 53-65.

Феохромоцитом/параганглиом – рядка причина за артериална хипертония в детската възраст

Куртинова-Алиева, Виктория К.[1], Цветанова, Цветелина А.[1], Янков, Иван В.[1,2], Чочкова-Букова, Любов А.[1,2], Мошеков, Евгений К.[3], Георгиева, Мария Г.[4], Калева-Ходжева, Нарцис Н.[1,2]

[1] Клиника по Детски и генетични заболявания, УМБАЛ „Св. Георги", Пловдив
[2] Катедра по Педиатрия и медицинска генетика, МФ, МУ, Пловдив
[3] Клиника по Детска хирургия, УМБАЛ „Св. Георги", Пловдив
[4] Д-р М. Георгиева – „АИПСМПДЕБОП" ЕООД

Адрес за кореспонденция:
Доц. Д-р Нарцис Калева-Ходжева,
Клиника по Детски и генетични заболявания,
УМБАЛ „Св. Георги", МФ, МУ – Пловдив
Бул. „Васил Априлов" 15А, Пловдив – 4000,
e-mail:narito@abv.bg

Постъпване: 27. 10. 2020
Ревизиране: 27. 02. 2021
Приемане: 01. 03. 2021

Резюме

Представя се клиничен случай на пациентка на 10 г. 7 мес. възраст с едногодишна давност на пристъпно главоболие, придружено от гадене и повръщане, фото- и фонофобия, фамилно обременена за артериална хипертония, мигрена и неоплазми. Многократно е прегледжана по повод на пристъпите без да е мерено артериалното налягане (АН). При пореден пристъп пациентката е прегледана в спешно отделение и са регистрирани много високи стойности на АН. След консултация с детски кардиолог е стартирана антихипертензивна терапия. Отчетен е незадоволителен ефект, поради което е хоспитализирана. При последващите изследвания се установяват метаболитна алкалоза с долнограничен калий и КТ данни за туморна формация, ангажираща дясната ренална артерия.

След предоперативна подготовка като при феохромоцитом е осъществена тотална туморна екстирпация. Хистологичното изследване потвърждава вида на тумора. Три месеца по-късно пациентката е с нормално АН и без отклонения в соматичния статус.

Ключови думи: вторична артериална хипертония; екстрамедуларен феохромоцитом/параганглиом; преходна ренална артериална стеноза

Въведение

В детската възраст за артериална хипертония (АХ) се приемат стойности на систолното и/или диастолното артериално налягане (АН) над 95-ти персентил за съответната възраст, пол и ръст *(Табл.1, Табл. 2)*. Стойности между 90-ти и 95-ти персентил се приемат за високо нормално налягане (прехипертония) *(Табл. 3)*. Стойностите при деца над 16 г. съответстват на тези при възрастни.

Поставянето на диагноза АХ се прави при 3 патологични измервания в 3 отделни визити синтервал между тях най-малко 7 дни. Честотата на АХ в детска възраст нараства успоредно с увеличаване честотата на затлъстяването. АХ се открива при 4% от децата, а прехипертония – при 9,67%. По-честа е първичната АХ (ПАХ), особено след 10 годишна възраст. Тя, обаче, е диагноза на изключването (1, 2) .

В България АХ се среща при около 5-6% от децата, като преобладава първичната АХ. Според проведено проучване в Плевен и региона честотата на ПАХ при юношите е 4,53% (n=75), като преобладават момчетата – в 65,3% от случаите. С АХ II степен са 58,7% от изследваната група, с АХ I степен – 36% и само 5,3% са с високо нормално АН (3). Вторичните АХ се срещат при бъбречни, ендокринни, сърдечни и неврологични заболявания *(Табл. 4)*.

Таблица 1. Персентилни таблици за артериално налягане на момчета. Оградeното в каре съответства на референтните стойности за момчета на възраст 16 години или повече, при които се препоръчват референтни стойности на възрастни според Европейско Сдружение по Хипертония от 2009 г.

Възраст		персентили на ръста, САН							персентили на ръста, ДАН						
Перс.АН		5	10	25	50	75	90	95	5	10	25	50	75	90	95
1г.	90	94	95	97	99	100	102	103	49	50	51	52	53	53	54
	95	98	99	101	103	104	106	106	54	54	55	56	57	58	58
	99	105	106	108	110	112	113	114	61	62	63	64	65	65	66
2г.	90	97	99	100	102	104	105	106	54	55	56	57	58	58	59
	95	104	105	107	109	110	112	113	63	63	64	65	66	67	67
	99	109	110	111	113	115	117	117	66	67	68	69	70	71	71
3г.	90	100	101	103	105	107	108	109	59	59	60	61	62	63	63
	95	104	105	107	109	110	112	113	63	63	64	65	66	67	67
	99	111	112	114	116	118	119	120	71	71	72	73	74	75	75
4г.	90	102	103	105	107	109	110	111	62	63	64	65	66	66	67
	95	106	107	109	111	112	114	115	66	67	68	69	70	71	71
	99	113	114	116	118	120	121	122	74	75	76	77	78	78	79
5г.	90	104	105	106	108	110	111	112	65	66	67	68	69	69	70
	95	108	109	110	112	114	115	116	69	70	71	72	73	74	74
	99	115	116	118	120	121	123	123	77	78	79	80	81	81	82
6г.	90	105	106	108	110	111	113	113	68	68	69	70	71	72	72
	95	109	110	112	114	115	117	117	72	72	73	74	75	76	76
	99	116	117	119	121	123	124	125	80	80	81	82	83	84	84
7г.	90	106	107	109	111	113	114	115	70	70	71	72	73	74	74
	95	110	111	113	115	117	118	119	74	74	75	76	77	78	78
	99	117	118	120	122	124	125	126	82	82	83	84	85	86	86
8г.	90	107	109	110	112	114	115	116	71	72	72	73	74	75	76
	95	111	112	114	116	118	119	120	75	76	77	78	79	79	80
	99	119	120	122	123	125	127	127	83	84	85	86	87	87	88
9г.	90	109	110	112	114	115	117	118	72	73	74	75	76	76	77
	95	113	114	116	118	119	121	121	76	77	78	79	80	81	81
	99	120	121	123	125	127	128	129	84	85	86	87	88	88	89
10г.	90	111	112	114	115	117	119	119	73	73	74	75	76	77	78
	95	115	116	117	119	121	122	123	77	78	79	80	81	81	82
	99	122	123	125	127	128	130	130	85	86	86	88	88	89	90
11г.	90	113	114	115	117	119	120	121	74	74	75	76	77	78	78
	95	117	118	119	121	123	124	125	78	78	79	80	81	82	82
	99	124	125	127	129	130	132	132	86	86	87	88	89	90	90
12г	90	115	116	118	120	121	123	123	74	75	75	76	77	78	79
	95	119	120	122	123	125	127	127	78	79	80	81	82	82	83
	99	126	127	129	131	133	134	135	86	87	88	89	90	90	91
13г	90	117	118	120	122	124	125	126	75	75	76	77	78	79	79
	95	121	122	124	126	128	129	130	79	79	80	81	82	83	83
	99	128	130	131	133	135	136	137	87	87	88	89	90	91	91
14г	90	120	121	123	125	126	128	128	75	76	77	78	79	79	80
	95	124	125	127	128	130	132	132	80	80	81	82	83	84	84
	99	131	132	134	136	138	139	140	87	88	89	90	91	92	92
15г	90	122	124	125	127	129	130	131	76	77	78	79	80	80	81
	95	126	127	129	131	133	134	135	81	81	82	83	84	85	85
	99	134	135	136	1389	140	142	142	88	89	90	91	92	93	93
16г.	90	125	126	128	130	131	133	134	78	78	79	80	81	82	82
	95	129	130	132	134	135	137	137	82	83	83	84	85	86	87
	99	136	137	139	141	143	144	145	90	90	91	92	93	94	94
17г.	90	127	128	130	132	134	135	136	80	80	81	82	83	84	84
	95	131	132	134	136	138	139	140	84	85	86	87	87	88	89
	99	139	140	141	143	145	146	147	92	93	93	94	95	96	97

Описание на клиничен случай

Данни от анамнезата: Пациентка на 10 г. 7 мес. възраст с необременена преморбидна анамнеза, фамилно обременена за АХ (баба и леля по майчина линия), мигрена (леля и братовчед по майчина линия) и неоплазми (вуйчо с неоплазма на стомаха). В последната година е с пристъпно главоболие, по тип на тензионно, неповлияващо се от аналгетици, придружено от гадене и повръщане, фото- и фонофобия. Има полидипсо-полиурия до 3,5 л/дн. и емоционална лабилност. Многократно е преглеждана от различни лекари по повод на пристъпите, без да е измервано АН. Консултирана е от детски невролог и е осъществен ЯМР на централна нервна система, който е без патологични отклонения. При пореден такъв пристъп в спешно отделение на регионална болница е регистрирано повишено АН (160/100 mmHg) и е насочена към детски кардиолог. При осъществената ЕхоКГ е установена начална левокамерна хипертрофия и е започната терапия с клонидин. Пациентката е консултирана с детски ендокринолог с цел изключване на вторична хипертония. Установени са високи нива на $ФТ_4$ и ТСХ. Прието е, че вероятно се касае за резистентност към тиреоидните хормони и е коригирана антихипертензивната терапия с атенолол, като е преустановен приемът на клонидин. На фона на терапията АХ персистира със стойности до 186/126 mmHg при сърдечна честота (СЧ) около 120 уд./мин. Пациентката е хоспитализирана за диагностично уточняване в Детска клиника на УМБАЛ „Св. Георги" гр. Пловдив.

Данни от физикалния статус: Детето е с долногранично тегло за неговия ръст (ръст=130 см – на $3^{-ти}$ персентил при таргетен между $3^{-ти}$и $15^{-ти}$ персентил; телесно тегло = 25 кг, ИТМ= 14,7 кг/м^2 – между $3^{-ти}$ и $15^{-ти}$ персентил). Установяват се бляскав поглед с изчерпващ се хоризонтален нистагъм; хипопигментации по типа на микоза около дясна лакетна става; невуси по тялото и крайниците и едно хиперпигментно петно на гърба тип „café au lait" в дясна долна гръдна половина с неясни граници, с размери около 40/40 мм. Шията е свободно подвижна; без видими съдови пулсации; без тиреомегалия. Сърдечно-съдова система: СЧ-106 уд./мин., АН=135/100 mm Hg на дясната ръка, 140/100 mm Hg на лявата ръка и 125/90 mm Hg на крака. Корем: мек, без органомегалия. Нормален неврологичен статус.

Лабораторни изследвания

Общ холестерол – 7,17 mmol/L, над $99^{-ти}$ персентил за възрастта и пола; HDL-холестерол - 1,94 mmol/L, между $90^{-ти}$ и $97^{-ми}$ персентил за възрастта и пола; триглицериди – 1,3 mmol/L, между $90^{-ти}$ и $97^{-ми}$ персентил за възрастта и пола; електролити: K – 3,8 mmol/L; Na – 140 mmol/L;

Cl – 94 mmol/L; Ca – 2,44 mmol/L; йонизиран Ca - 1,23 mmol/L; Фосфор – 1,52 mmol/L; Mg – 1,13 mmol/L;

ТСХ – 8,866 mU/L (0,3-5,6 mU/L) при FT_4 в референтни граници и негативни анти- ТРО антитела.

АКР: pH – 7,47; BE 6,0; HCO_3 31,0. Останалите лабораторни показатели (вкл. ПКК, урина, азотни фракции, трансаминази, кортизол, DHEA-S, неврон специфична енолаза) са в референтни стойности.

Образни изследвания

Ехографски се установява солидна, хомогенна, хипоехогенна туморна формация в областта на хилуса на десен бъбрек, с резки граници, гладки очертания и впечатление за капсула. Според ***Доплер ехографията*** липсва нарушаване на кръвотока в реналната артерия *(Фиг. 1).*

При ***компютър-томографското изследване (КТ)*** се визуализира формация с размери 27/18/28 мм с изходна плътност 47 ХЕ, повишаваща се до 282 ХЕ в артериална фаза и намаляваща до 151 ХЕ и 69 ХЕ във венозна и съответно късна фаза. Формацията ангажира реналната артерия; налице е зона на хипоперфузия в десния бъбрек, както и прегъване на уретера, без да се нарушава проходимостта му. Остиумът на артерията е запазен като се представя сегмент с дължина 2-3мм. В късна фаза се представя периферно усилено каптиране както при фиброзна капсула и централна зона на washout. Формацията дислоцира

Таблица 3. Нормално артериално налягане и артериална хипертония

Категория	0-15 години САН и/или ДАН (персентили)	Над 16 години САН и/или ДАН (mm Hg)
Нормално	< 90	<130/85
Високо нормално	> 90 до < 95	130-139/85-89
Артериална хипертония	> 95	> 140/90
I степен хипертония	95–99 + 5 mm Hg	140-159/90-99
II степен хипертония	> 99 + 5 mm Hg	160-179/100-109

Таблица 2. Персентилни таблици за артериално налягане при момичета. Оградените в каре съответства на референтните стойности за момичета на възраст 16 години или повече, при които се препоръчват референтни стойности на възрастни според Европейско Сдружение по Хипертония от 2009 г.

Възраст		персентили на ръста, САН							персентили на ръста, ДАН						
Перс.АН		5	10	25	50	75	90	95	5	10	25	50	75	90	95
1г.	90	97	97	98	100	101	102	103	52	53	53	54	55	55	56
	95	100	101	102	104	105	106	107	56	57	57	58	59	59	60
	99	108	108	109	111	112	113	114	64	64	65	65	66	67	67
2г.	90	98	98	100	101	103	104	105	57	58	58	59	60	61	61
	95	102	103	104	105	107	108	109	61	62	62	63	64	64	65
	99	109	110	111	112	114	115	116	69	69	70	70	71	72	72
3г.	90	100	100	102	103	104	106	106	61	62	62	63	64	64	65
	95	104	104	105	107	108	109	110	65	66	66	67	68	68	69
	99	111	111	113	114	115	116	117	73	73	74	74	75	76	76
4г.	90	101	102	103	104	106	107	108	64	64	65	66	67	67	68
	95	105	106	107	108	110	111	112	68	68	69	70	71	71	72
	99	112	113	114	115	117	118	119	76	76	76	77	78	79	79
5г.	90	103	103	105	106	107	109	109	66	67	67	68	69	69	70
	95	107	107	108	110	111	112	113	70	71	71	72	73	73	74
	99	114	114	116	117	118	120	120	78	78	79	79	80	81	81
6г.	90	104	105	106	108	109	110	111	68	68	69	70	70	71	72
	95	108	109	110	111	113	114	115	72	72	73	74	74	75	76
	99	115	116	117	119	120	121	122	80	80	80	81	82	83	83
7г.	90	106	107	108	109	111	112	113	69	70	70	71	72	72	73
	95	110	111	112	113	115	116	116	73	74	74	75	76	76	77
	99	117	118	119	120	122	123	124	81	81	82	82	83	84	84
8г.	90	108	109	110	111	113	114	114	71	71	71	72	73	74	74
	95	112	112	114	115	116	118	118	75	75	75	76	77	78	78
	99	119	120	121	122	123	125	125	82	82	83	83	84	85	86
9г.	90	110	110	112	113	114	116	116	72	72	72	73	74	75	75
	95	114	114	115	117	118	119	120	76	76	76	77	78	79	79
	99	121	121	123	124	125	127	127	83	83	84	84	85	86	87
10г.	90	112	112	114	115	116	118	119	73	73	73	74	75	76	76
	95	116	116	117	119	120	121	122	77	77	77	78	79	80	80
	99	123	123	125	126	127	129	129	84	84	85	86	86	87	88
11г.	90	114	114	116	117	118	119	120	74	74	74	75	76	77	77
	95	118	118	119	121	122	123	124	78	78	78	79	80	81	81
	99	125	125	126	128	129	130	131	85	85	86	87	87	88	89
12г	90	116	116	117	119	120	121	122	75	75	75	76	77	78	78
	95	119	120	121	123	124	125	126	79	79	79	80	81	82	82
	99	127	127	128	130	131	132	133	86	86	87	88	88	89	90
13г	90	117	118	119	121	122	123	124	76	76	76	77	78	79	79
	95	121	122	123	124	126	127	128	80	80	80	81	82	83	83
	99	128	129	130	132	133	134	135	87	87	88	89	89	90	91
14г	90	119	120	121	122	124	125	125	77	77	77	78	79	80	80
	95	123	123	125	126	127	129	129	81	81	81	82	83	84	84
	99	130	131	132	133	135	136	136	88	88	89	90	90	91	92
15г	90	120	121	122	123	125	126	127	78	78	78	79	80	81	81
	95	124	125	126	127	129	130	131	82	82	82	83	84	85	85
	99	131	132	133	134	136	137	138	89	89	90	91	91	92	93
16г.	90	121	122	123	124	126	127	128	78	78	79	80	81	81	82
	95	125	126	127	128	130	131	132	82	82	83	84	85	85	86
	99	132	133	134	135	137	138	139	90	90	90	91	92	93	93
17г.	90	122	122	123	125	126	127	128	78	79	79	80	81	81	82
	95	125	126	127	129	130	131	132	82	83	83	84	85	85	86
	99	133	133	134	136	137	138	139	90	90	91	91	92	93	93

долната празна вена и бъбречните вени вентрално без видимо да ги ангажира. Богато васкуларизирана е от реналната артерия – от хилус и долен полюс и от вертебрални артерии *(Фиг. 2-7)*.

Фундоскопия – данни за оток на папилите и наличие на макулна звезда в резултат на хипертензивна оптикопатия.

Ход на заболяването

По време на престоя в стационара пациентката е с трайна АХ на фона на терапия с бета-блокер и диуретик. Регистрира се хипертензивна криза, купирана с калциев антагонист. След получаване на данните от образното изследване за стеноза на реналната артерия от външна компресия от тумор и, предвид клиниката, счетохме за много вероятно да се касае за парагаглиом. Поради високостепенната АХ и хипертензивната криза на фона на антихипертензивната терапия и спешността на състоянието, взехме решение да преминем към предоперативна подготовка както при феохромоцитом/параганглиом (PPGL) – алфа-блокер (доксазозин по 0,5мг. дневно 5 дни преди операцията). Осъществена е тотална екстирпация на тумора с отпрепариране на реналната артерия и запазване на десния бъбрек. Хистологичното изследване потвърждава клиничното съмнение за феохромоцитом/параганглиом (гефрир: Феохромоцитом; траен хистоло-гичен препарат: Феохромоцитом; Имунохистохимично изследване: Хромогранин А /+/; Синаптофизин/+/; AE1/AE3 /-/). След обичайната преходна хипотония в ранния постоперативен период пациентката отново е с АХ, наложила тройна антихипертензивна терапия (атенолол, еналаприл, фуроземид).

В следващия месец същата е редуцирана и спряна. Месец след спиране на антихипертензивната терапия детето е с нормални нива на уринните метанефрини (Метанефрин – 108 µg/24 ч. (норма 43,4 – 260 µg/24 ч.)/ 224 µg/g креатинин (норма 34-367 µg/g креатинин); Норметанефрин – 170 µg/24 ч. (норма 128-484 µg/24 ч.)/352 µg/g креатинин (норма 38-523 µg/gкреатинин); 3-Метокси-тирамин –219 µg/g креатинин (норма 0-525 µg/g креатинин)/ и стойности на АН от двукратно проведеното 24-часово Холтер мониториране – под 90-ти персентил *(Фиг. 8)*.

Обсъждане

Детето постъпва с анамнеза за главоболие от една година и клиника на високостепенна АХ с трайно повишено АН, като толерира добре стойности до 160/90 mm Hg, с начална левокамерна хипертрофия и хипертензивна оптикопатия.

Предвид астеничния хабитус още при постъпването е изключен метаболитен синдром, чийто чест компонент е АХ. Първоначалните изследвания са в насока изключване на най-честите причини за вторична АХ, а именно тази от бъбречен произход. Изключена е и коарктация на аортата, чиято адултна форма често пъти се диагностицира по повод на АХ. При детето не се покриват критериите на различните видове васкулити в частност панартериит, протичащи с високостепенна АХ.

От изследванията има данни за метаболитна алкалоза и долнограничен калий. Това извежда на преден план хипералдостеронизъм като причина за състоянието. Първичният хипералдостеронизъм е най-честата ендокринна причина за АХ. Бе изпратено изследване на ренин и алдостерон, но поради технически проблем с пробата не

Таблица 4. Причини за артериална хипертония

РЕНО-ПАРЕНХИМНИ ПРИЧИНИ • Диспластичен бъбрек • Бъбречна поликистоза • Обструктивни уропатии • Тумор на Wilms • Гломерулонефрити • Хемолитично-уремичен синдром • Рефлуксни нефропатии • Системен лупус еритематодес РЕНОВАЗАЛНИ ПРИЧИНИ • Стеноза на ренална артерия • Емболия на бъбречна артерия • Тромбоза на бъбречна вена • Артериит (Takayasu, периартериитис нодоза) • Външна компресия на артерията КОАРКТАЦИЯ НА АОРТАТА • Първична АХ	НЕВРОЛОГИЧНИ ПРИЧИНИ • Синдром на Guillain –Barre • Повишено вътречерепно налягане • Стрес, свръхвъзбуда • Енцефалит • Неврофиброматоза ЕНДОКРИННИ ПРИЧИНИ • Първичен хипералдостеронизъм • Синдроми на Liddle и Gordon • Феохромоцитом и невробластом • Вродена надбъбречна хиперплазия • Синдром/Болест на Cushing • Хипертиреоидизъм –предимно голяма систоло-диастолна разлика, а не истинска хипертония • Хиперпаратиреоидизъм • Захарен диабет с диабетна нефропатия • Метаболитен синдром

Таблица 5. Медикаменти, които могат да дадат фалшиво положителни резултати при изследване на катехоламини и катехоламинови метаболити. (Модифицирано по Ендокринология и грешки на обмяната на Кириаке Сарафооглу).

Медикаменти	**Катехоламини**		**Метанефрини**	
	Норепинефрин	**Епинефрин**	**Норметанефрин**	**Метанефрин**
Трициклични антидепресанти	+++	–	+++	–
Неселективни α-блокери	++	–	++	–
Селективни α-блокери	+	–	–	–
ß-блокери	+	+	+	+
Калциеви антагонисти	+	+	–	–
Вазодилататори-хидралазин	+	–	+	–
МАО инхибитори	++	++	++	++
Симпатикомиметици	++	++	++	++
Стимуланти-кофеин, никотин	++	++	++	++
Леводопа, карбидопа	++	–	–	–
Кокаин	++	++	++	–

бе получен резултат. Същевременно, ехографски се откри формация в хилуса на десен бъбрек. Въпреки нормалния кръвоток от Доплер ехографията, е прието, че описаните по-горе лабораторни отклонения са в резултат на вторичен хипералдостеронизъм вследствие притискане на артерия реналис от формацията. Същото е потвърдено по-късно от КАТ ангиографията.

В процеса на диагностично търсене бе изследван и кортизол в полунощ за изключване на атипичен синдром на Cushing – изолиран или в рамките на Carnney comlex или Mc Cune Albright синдром. Визуализирането на формация в хилуса на единия бъбрек постави нов въпрос: дали се касае за изолиран вторичен хипералдостеронизъм и реновазална хипертония, или и самият тумор е хормонално активен и допринася за хипертонията, предвид локализацията му (параганглиом, произхождащ от паравертебралните симпатикусови ганглии). Негативната неврон-специфична енолаза (NSE) не изключва със сигурност невробластом. Скриниговото изследване за феохромоцитом, а именно – определяне на фракционирани уринни метанефрини в 24-часова уринна проба се прави при специфични условия. Препоръчва се при изследването да не се приемат определени медикаменти, както и някои храни и напитки, съдържащи фенолово ядро. От една страна е налице интерфериране между екскретираните катехоламинови метаболити и някои медикаменти, които се отделят непроменени в урината при самото им техническо измерване (4), а от друга страна редица медикаменти повлияват самия метаболизъм на катехоламините in vivo и променят нивата им в кръвта и урината, без да е налице феохромоцитом/параганглиом *(Табл. 5)* (8).

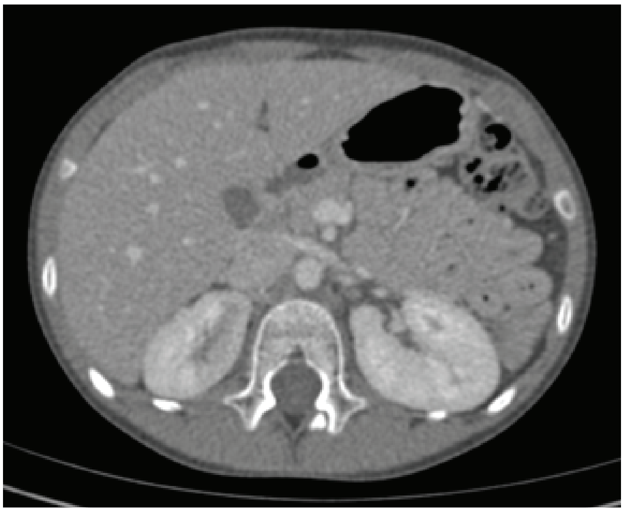
За разлика от АХ при възрастни с феохромицитом, която е по-често пристъпна, при деца АХ вследствие феохромоцитом е по-често постоянна (60-90%), съпроводена с главоболие (около 67%). По-рядко може да се наблюдават пароксизмална тахикардия и аритмия. В 47-57% от случаите пациентите съобщават за сърцебиене, изпотяване, гадене, повръщане и побледняване. Други симптоми, които се срещат са: тревожност, загуба на тегло, зрителни нарушения (от мидриазата илимного по-рядко в резултат на отлепване на ретината), полиурия, полидипсия, тремор, гърчове при хипертензивна енцефалопатия (5).

При нашата пациентка наличието на трайна АХ с насложени кризи, съпроводени с тахикардия и често главоболие, изразената емоционална лабилност, полидипсо-полиурия и астеничният хабитус, както и СТ-характеристики на тумора ни насочиха към диагнозата феохромоцитом. По тази причина бе добавен алфа-блокер към терапията и детето бе насочено за оперативно лечение.

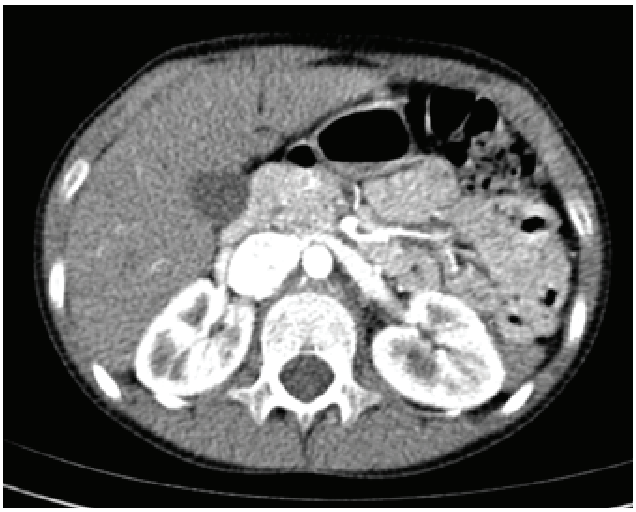
Оперативната интервенция доведе до обратно развитие на АХ, което едновременно потвърждава диагнозата и изключва остатъчна стеноза на реналната артерия. Ежегодно ще бъдат проследявани нивата на уринните метанефрини съобразно съвременните препоръки за проследяване на пациентите, оперирани за PPGL (6).

Феохромоцитомът е тумор, произхождащ от хромафинните клетки, който произвежда, натрупва, метаболизира и екскретира катехоламини и техни деривати. Честотата на тумора е 0,2-0,8:100 000 (7). Причинява 0,5-2% от случаите с АХ в детска възраст. В 80-85% от случаите туморът е с адренална локализация и тогава се дефинира като феохромоцитом.

Фигура 1. Доплер ехография на десен бъбрек.



Фигура 2. КТ преди контрастиране



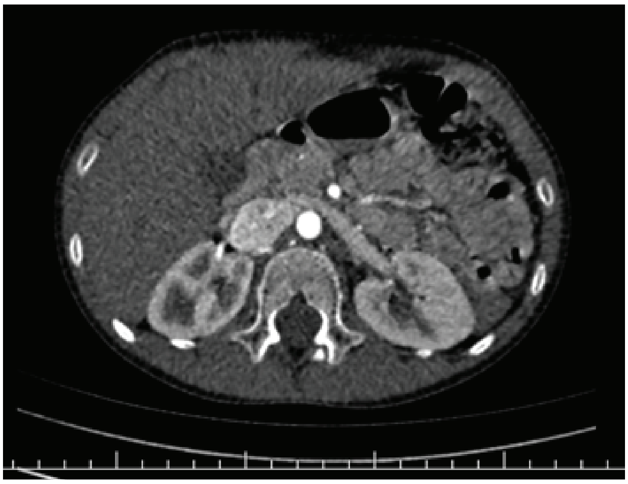
Фигура 3. КТ – ранна фаза на контрастиране

В останалите 15-20% се касае за екстраадренална локализация (в областта на главата и шията, гръден кош, коремна кухина, бъбречен хилус, малък таз) и тогава се дефинира като параганглиом (5). Може да възникне спорадично или като част от вродени синдроми.

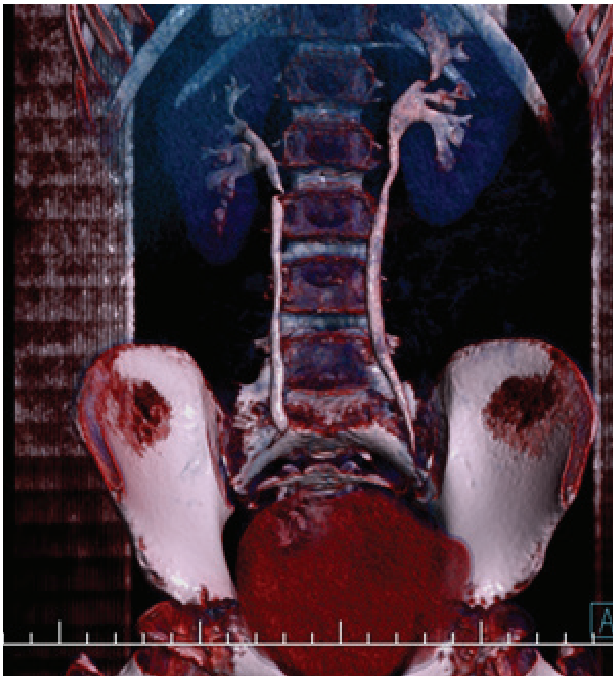
Според последните проучвания сред пациентите с феохромоцитом, изглеждащи като спорадични случаи, повече от 35% са наследствени (при 15-20% се доказва соматична мутация) (8). В детска възраст мутации се доказват в 80% от случаите (5). Наследственият синдромен феохромоцитом се асоциира с MEN-2A, MEN-2B, неврофиброматоза тип 1, болест на von Hippel-Lindau, както и параганглиома-феохромоцитома синдроми на базата на мутации в гените, кодиращи субединиците на сукцинат дехидрогеназата (SDHx): SDHA, SDHB, SDHC или SDHD. Повечето генетично обусловени феохромоцитоми и особено параганглиомите се асоциират с мутация в SDHD и SDHB гените. Затова е възприето да се провежда изследване за тези два типа мутации при екстраадренална локализация на тумора, особено в коремната кухина. Функционално неактивните параганглиоми, които не продуцират, метаболизират и секретират катехоламини се асоциират с мутации в гените, кодиращи SDHB, SDHD и по рядко SDHC. С мутации в последните гени се асоциират и по-голяма част от метастатичните форми. Мутациите в SDHA гените са много редки. Описани са и редица други мутации, асоциирани с феохромоцитом/параганглиом (TMEM127, MAX, HIF2A, PHD1, ATRX, FH и MDH2) (8).

Докладите за малигнен феохромоцитом варират между 3 и 36% в зависимост от генетиката и локализацията на тумора. С по-висок риск са тези с екстраадренална локализация – 35% (9). Близо 10% са с метастатична форма на заболяването при поставяне на диагнозата, като с повишен риск са тези с тумор над 5 см (8). Необходимо е проследяване на пациентите с феохромоцитом чрез регулярно изследване на фракционираниуринни метанефрини, а по преценка и чрез образно изследване (8, 10). Има описани случаи на развитие на метастатично заболяване 20 г. след премахване на първичния тумор (8). Клиничната презентация е твърде разнообразна и туморът спада към групата на т. нар. „велики имитатори" (8). Предвид изявата в детска възраст, липсата на метастази и екстраадреналната локализация най-подходящият панел за генетични изследвания е за SDHB, SDHC, SDHD, VHL и MAX (10).

Златен стандарт за диагноза са свободни плазмени или фракционирани уринни метанефри-



Фигура 4. КТ – късна фаза на контрастиране



Фигура 5. КТ – ангажиране на уретера

ни, като много вероятни за тумор са резултати по-високи от 4 пъти над горна граница на нормата. Твърде много фактори могат да повлияят на резултатите и да доведат до фалшиво положителни или фалшиво отрицателни резултати, поради което резултатите трябва да бъдат внимателно интерпретирани и изследванията да бъдат повтаряни при нужда (10) *(Табл. 5)*. Адреналните феохромоцитоми произвеждат и секретират и двата вида катехоламини, докато хормонално активните параганглиоми секретират само норадреналин, аналогично на изолирания синтез на норадреналин в нервната система и синтеза на адреналин, и на норадренали от надбъбречната жлеза, чрез ензимно метаболизиране на норадреналина до адреналин (5).

От образните изследвания средство на избор е КТ, която е със специфичност около 95%. МРТ се провежда в случаи на противопоказания за КТ. Понякога се налага провеждане на функционални образни изследвания: Сцинтиграфия с ^{123}I-метайодбензилгуанидин (MIBG); PET/CT с 18F-флуородеоксиглюкоза (18FFDG), белязан с радионуклеид-соматостатинов аналог или ДОПА. Това спомага за диагностицирането на метаболитно активния тумор/тумори тъй като:

1. 5-10% от хората имат бенигнени хормонално неактивни адренални формации.
2. Норметанефринът може да е повишен и при адренална (50% от адреналните), и при екстраадренална локализация.
3. 10% имат метастатична форма на заболяването при поставяне на диагнозата.
4. 30% от случаите са с фамилни и множествени форми (8).

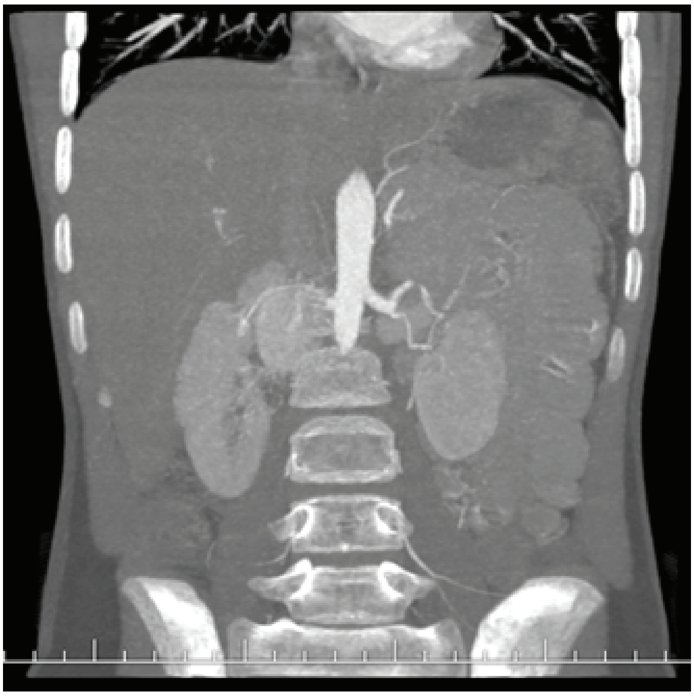
Задължителна е предоперативната подготовка за предотвратяване на интраоперативни усложнения вследствие хипертонична криза при манипулация върху тумора и „изръсване" на катехоламини. Прилагат се α-блокери (селективни и неселективни за поне 7 дни); β-блокери (след адекватна α-блокада, само в случаите на неовладяема тахикардия/тахиаритмия,); тирозин-хидроксилазен инхибитор (потискащ катехоламиновия синтез); калциев антагонист (8, 9, 11).

Съчетанието между PPGL с ренална артериална стеноза е описано за първи път през 1958г. от Харисън при 16-годишно момиче. По-честа е при параганглиомите. Честотата при адренална локализация възлиза на 7%, а при екстраадренална – на 30% от случаите. Има единствен случай, описан в литературата на постоперативна трайна стеноза (12).

Реналната артериална стеноза може да се дължи на:

1. Компресия от тумора или от фиброзна тъкан в тумора;
2. Хипертрофия на мускулната стена на артерията, а в последствие и трайна стеноза, предизвикана от катехоламините и особено норепинефрина при екстраадренален тумор, предизвикващ продължителен спазъм;
3. Постоперативни срастванияq;
4. Псевдостеноза по време на хипертензивна криза (13).

Фигура 6. КТ – Реконструкция – профил



Фигура 7 . КТ – Реконструкция – фас.

Заключение

Представеният клиничен случай е на късно диагностицирана високостепенна АХ в резултат на липсата на утвърдена практика за измерване на АН при физикалния преглед на децата. Въпреки че зачестява в последните две десетилетия, АХ като цяло не е честа в детската възраст, но нерядко е първи белег на подлежащо сериозно заболяване, ранната диагноза на което би определила прогнозата. От друга страна, ранното диагностициране на първичната АХ и вземането на съответни мерки (често само с промяна в стила и начина на живот) би предотвратило изявата на ранни сърдечно-съдови заболявания, водещи до инвалидизация.

Друг проблем у нас, в частност при вторичните ендокринни хипертонии, са ограниченият обем хормонални изследвания, които могат да бъдат направени в повечето от държавните болници. Това допълнително затруднява и забавя диагностиката. Пациентите с редки ендокринни заболявания е най-добре да бъдат насочвани за диагностициране към Експертните центрове за редки ендокринни болести, които са част от Европейската Мрежа за Редки Ендокринни заболявания (ENDO-ERN) и разполагат с всички съвременни утвърдени методи за диагностициране и лечение на тези заболявания. В същото време всяко лечебно заведение, разполагащо с необходимите специалисти и апаратура за лечение на такива заболявания, трябва да има готовност да реагира при спешни ендокринни състояния, каквото е малигнената АХ. Наличието на повече специализирани центрове би скъсило пътя на пациента, би намалило рисковете при транспорт и би увеличило качеството на обслужване.

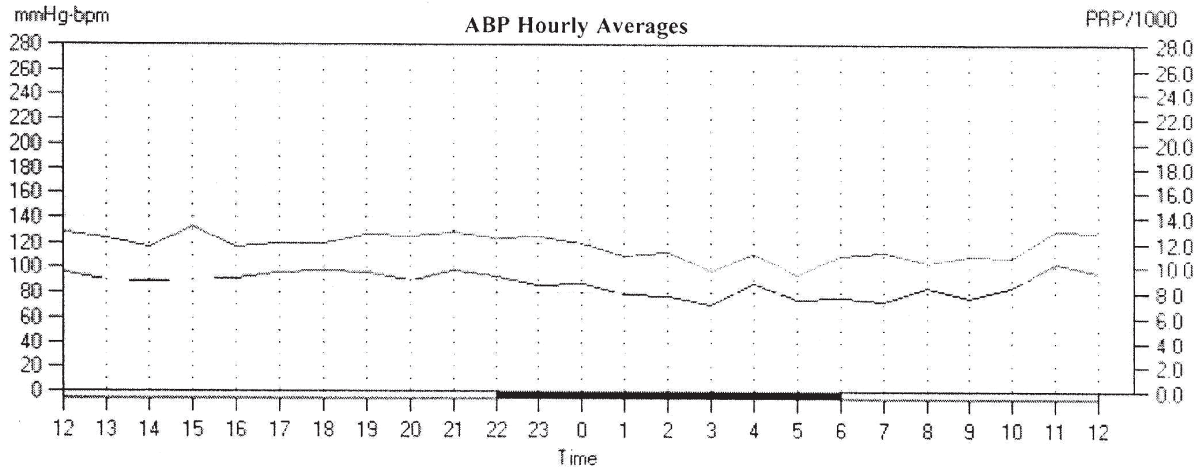
Измерването на АН трябва да стане задължителен елемент от физикалния преглед на всички деца над 3 годишна възраст. Правилото е трикратно измерване с интервал от 3 минути и използване на средната стойност от последните две измервания. Има утвърден алгоритъм на поведение у нас, а персентилните таблици за АН според пол, възраст и ръст са лесно достъпни.

AMBULATORY BLOOD PRESSURE REPORT

Patient Name: Danaya Bachvarova
Patient ID: 0948067717

Test Date: 22-Þíè-2020
Report Date: 23-Þíè-2020

Oscar 2 ABP Hourly Averages



Averaged ABP Data

Hour	#	Sys/Dia (mmHg)	Hrt (BPM)	MAP (mmHg)	PP (mmHg)	PRP/1000
12:00 - 12:59	2	129/ 83	96	98	46	12.5
13:00 - 13:59	2	124/ 91	90	102	34	11.3
14:00 - 14:59	2	117/ 76	89	90	40	10.4
15:00 - 15:59	2	132/ 90	91	104	41	11.9
16:00 - 16:59	2	116/ 75	92	88	40	10.6
17:00 - 17:59	2	120/ 80	96	94	40	11.5
18:00 - 18:59	2	120/ 77	98	92	44	11.8
19:00 - 19:59	2	127/ 90	96	102	38	12.2
20:00 - 20:59	1	126/ 87	91	100	39	11.5
21:00 - 21:59	2	128/ 87	98	101	41	12.5
22:00 - 22:59	1	124/ 83	94	97	41	11.7
23:00 - 23:59	1	125/ 88	86	100	37	10.8
00:00 - 00:59	1	119/ 80	87	93	39	10.4
01:00 - 01:59	1	110/ 68	79	82	42	8.7
02:00 - 02:59	1	112/ 69	77	83	43	8.6
03:00 - 03:59	1	97/ 60	70	72	37	6.8
04:00 - 04:59	1	111/ 74	88	86	37	9.8
05:00 - 05:59	1	95/ 61	75	72	34	7.1
06:00 - 06:59	2	110/ 68	76	82	42	8.4
07:00 - 07:59	1	113/ 76	73	88	37	8.2
08:00 - 08:59	2	104/ 68	84	80	36	8.7
09:00 - 09:59	2	110/ 70	76	83	41	8.3
10:00 - 10:59	2	108/ 70	85	83	37	9.1
11:00 - 11:59	2	130/ 94	104	106	36	13.5

Фигура 8. Холтер АН

Pheochromocytoma/Paraganglioma – a Rare Cause of Childhood Hypertension

Kurtinova-Alieva, Victoria K[1]., Tsvetanova, Tsvetelina A.[1], Yankov, Ivan V.[1,2], Chochkova-Bukova, Lyubov A.[1,2], Moshekov, Evgeny K.[3], Georgieva, Maria G.[4], Kaleva–Hodzheva, Narcis N.[1,2]

Clinic of Pediatric and Genetic Diseases, „Sv. Georgy" University Hospital, Plovdiv
Department of Pediatrics and Medical Genetics, Medical Faculty, Medical University, Plovdiv
Clinic of Pediatric Surgery, „Sv. Georgy" University Hospital, Plovdiv
Dr. M. Georgieva – AIPSMP DEBOP Ltd

Address for correspondence:
Clinic of Pediatric and Genetic Diseases, „Sv. Georgy" University Hospital,
15 A „Vassil Aprilov" Str. Plovdiv – 4000,
e-mail: narito@abv.bg

Submitted: 27. 10. 2020
Revised: 27. 02. 2021
Accepted: 01. 03. 2021

Abstract

A clinical case of a patient aged 10 years and 7 months is presented with one year of relapse headache, accompanied by nausea and vomiting, picturephobia and phonophobia, familial burden of arterial hypertension (AH), migraine and neoplasms. She had been repeatedly examined for seizures without measuring blood pressure (BP). In another attack, the patient was examined in the emergency department and very high values of blood pressure were registered. After consultation with a pediatric cardiologist, antihypertensive therapy was started. An unsatisfactory effect was reported, due to which she was hospitalized. Subsequent examinations revealed metabolic alkalosis with lower potassium and CT data for tumor formation involving the right renal artery. After preoperative preparation as in pheochromocytoma, total tumor extirpation was performed. Histological examination confirmed the type of tumor. Three months later, the patient had normal blood pressure and no abnormalities in somatic status.

Key words: secondary arterial hypertension, extramedullary pheochromocytoma / paraganglioma, transient renal arterial stenosis

Intoduction

In childhood, values of systolic and/or diastolic blood pressure above the 95th percentile for the respective age, sex and height are taken for AH *(Table 1, Table 2)*. Values between the 90th and 95th percentiles are considered high normal pressure (prehypertension) *(Table 3)*. The values for children over 16 years of age correspond to those for adults.

The diagnosis of AH was made by three pathological measurements in three separate visits with an interval between them of at least 7 days. The incidence of AH in childhood increases conjointly with the increase in the incidence of obesity. AH is found in 4% of children and prehypertension in 9,67%. Primary AH (PAH) is more common, especially after the age of 10. However, it is a diagnosis of exclusion (1,2).

In Bulgaria, AH occurs in about 5-6% of all children, with primary AH predominating. According to a study conducted in Pleven and the region, the incidence of PAH in adolescents is 4,53% (n = 75), with boys predominating – in 65,3% of cases. With AH II degree are 58,7% of the studied group, AH I degree - 36% and only 5,3% have high normal blood pressure (3). Secondary AH occurs in renal, endocrine, cardiac and neurological diseases (*Table 4*).

Clinical case

History: The patient, aged 10 years and 7 months, presented with unencumbered premorbid history, familial history of AH (maternal grandmother and aunt), migraine (maternal aunt and cousin) and neoplasms (uncle with gastric neoplasm). She had had for over a year a paroxysmal headache, a type of tension headache, unresponsive to analgesics, accompanied by nausea and vomiting, picturephobia and phonophobia. There was polydipsia-polyuria up to 3,5 L / day. and emotional lability. She had been repeatedly examined by a number of physicians for seizures

Table 1. Percentile tables for boys' blood pressure. The boxed box corresponds to the reference values for boys aged 16 and over, for which adult reference values are recommended. According of European Society of Hypertension, 2009.

Age (years)	BP percentile	Systolic (mmHg) percentile of height							Diastolic (mmHg) percentile of height						
		5	10	25	50	75	90	95	5	10	25	50	75	90	95
1y	90	94	95	97	99	100	102	103	49	50	51	52	53	53	54
	95	98	99	101	103	104	106	106	54	54	55	56	57	58	58
	99	105	106	108	110	112	113	114	61	62	63	64	65	65	66
2y	90	97	99	100	102	104	105	106	54	55	56	57	58	58	59
	95	104	105	107	109	110	112	113	63	63	64	65	66	67	67
	99	109	110	111	113	115	117	117	66	67	68	69	70	71	71
3y	90	100	101	103	105	107	108	109	59	59	60	61	62	63	63
	95	104	105	107	109	110	112	113	63	63	64	65	66	67	67
	99	111	112	114	116	118	119	120	71	71	72	73	74	75	75
4y	90	102	103	105	107	109	110	111	62	63	64	65	66	66	67
	95	106	107	109	111	112	114	115	66	67	68	69	70	71	71
	99	113	114	116	118	120	121	122	74	75	76	77	78	78	79
5y	90	104	105	106	108	110	111	112	65	66	67	68	69	69	70
	95	108	109	110	112	114	115	116	69	70	71	72	73	74	74
	99	115	116	118	120	121	123	123	77	78	79	80	81	81	82
6y	90	105	106	108	110	111	113	113	68	68	69	70	71	72	72
	95	109	110	112	114	115	117	117	72	72	73	74	75	76	76
	99	116	117	119	121	123	124	125	80	80	81	82	83	84	84
7y	90	106	107	109	111	113	114	115	70	70	71	72	73	74	74
	95	110	111	113	115	117	118	119	74	74	75	76	77	78	78
	99	117	118	120	122	124	125	126	82	82	83	84	85	86	86
8y	90	107	109	110	112	114	115	116	71	72	72	73	74	75	76
	95	111	112	114	116	118	119	120	75	76	77	78	79	79	80
	99	119	120	122	123	125	127	127	83	84	85	86	87	87	88
9y	90	109	110	112	114	115	117	118	72	73	74	75	76	76	77
	95	113	114	116	118	119	121	121	76	77	78	79	80	81	81
	99	120	121	123	125	127	128	129	84	85	86	87	88	88	89
10y	90	111	112	114	115	117	119	119	73	73	74	75	76	77	78
	95	115	116	117	119	121	122	123	77	78	79	80	81	81	82
	99	122	123	125	127	128	130	130	85	86	86	88	88	89	90
11y	90	113	114	115	117	119	120	121	74	74	75	76	77	78	78
	95	117	118	119	121	123	124	125	78	78	79	80	81	82	82
	99	124	125	127	129	130	132	132	86	86	87	88	89	90	90
12y	90	115	116	118	120	121	123	123	74	75	75	76	77	78	79
	95	119	120	122	123	125	127	127	78	79	80	81	82	82	83
	99	126	127	129	131	133	134	135	86	87	88	89	90	90	91
13y	90	117	118	120	122	124	125	126	75	75	76	77	78	79	79
	95	121	122	124	126	128	129	130	79	79	80	81	82	83	83
	99	128	130	131	133	135	136	137	87	87	88	89	90	91	91
14y	90	120	121	123	125	126	128	128	75	76	77	78	79	79	80
	95	124	125	127	128	130	132	132	80	80	81	82	83	84	84
	99	131	132	134	136	138	139	140	87	88	89	90	91	92	92
15y	90	122	124	125	127	129	130	131	76	77	78	79	80	80	81
	95	126	127	129	131	133	134	135	81	81	82	83	84	85	85
	99	134	135	136	1389	140	142	142	88	89	90	91	92	93	93
16y	90	125	126	128	130	131	133	134	78	78	79	80	81	82	82
	95	129	130	132	134	135	137	137	82	83	83	84	85	86	87
	99	136	137	139	141	143	144	145	90	90	91	92	93	94	94
17y	90	127	128	130	132	134	135	136	80	80	81	82	83	84	84
	95	131	132	134	136	138	139	140	84	85	86	87	87	88	89
	99	139	140	141	143	145	146	147	92	93	93	94	95	96	97

Table 2. Percentile tables for blood pressure in girls. The boxed box corresponds to the reference values for girls 16 years of age or older, for which adult reference values are recommended. According of European Society of Hypertension, 2009.

Възраст / Age (years)	BP percentile	перцентили на ръста, САН / Systolic (mmHg) percentile of height							перцентили на ръста, ДАН / Diastolic (mmHg) percentile of height						
		5	10	25	50	75	90	95	5	10	25	50	75	90	95
1г y	90	97	97	98	100	101	102	103	52	53	53	54	55	55	56
	95	100	101	102	104	105	106	107	56	57	57	58	59	59	60
	99	108	108	109	111	112	113	114	64	64	65	65	66	67	67
2г y	90	98	98	100	101	103	104	105	57	58	58	59	60	61	61
	95	102	103	104	105	107	108	109	61	62	62	63	64	64	65
	99	109	110	111	112	114	115	116	69	69	70	70	71	72	72
3г y	90	100	100	102	103	104	106	106	61	62	62	63	64	64	65
	95	104	104	105	107	108	109	110	65	66	66	67	68	68	69
	99	111	111	113	114	115	116	117	73	73	74	74	75	76	76
4г y	90	101	102	103	104	106	107	108	64	64	65	66	67	67	68
	95	105	106	107	108	110	111	112	68	68	69	70	71	71	72
	99	112	113	114	115	117	118	119	76	76	76	77	78	79	79
5г y	90	103	103	105	106	107	109	109	66	67	67	68	69	69	70
	95	107	107	108	110	111	112	113	70	71	71	72	73	73	74
	99	114	114	116	117	118	120	120	78	78	79	79	80	81	81
6г. y	90	104	105	106	108	109	110	111	68	68	69	70	70	71	72
	95	108	109	110	111	113	114	115	72	72	73	74	74	75	76
	99	115	116	117	119	120	121	122	80	80	80	81	82	83	83
7г y	90	106	107	108	109	111	112	113	69	70	70	71	72	72	73
	95	110	111	112	113	115	116	116	73	74	74	75	76	76	77
	99	117	118	119	120	122	123	124	81	81	82	82	83	84	84
8г.	90	108	109	110	111	113	114	114	71	71	71	72	73	74	74
	95	112	112	114	115	116	118	118	75	75	75	76	77	78	78
	99	119	120	121	122	123	125	125	82	82	83	83	84	85	86
9г y	90	110	110	112	113	114	116	116	72	72	72	73	74	75	75
	95	114	114	115	117	118	119	120	76	76	76	77	78	79	79
	99	121	121	123	124	125	127	127	83	83	84	84	85	86	87
10г y	90	112	112	114	115	116	118	119	73	73	73	74	75	76	76
	95	116	116	117	119	120	121	122	77	77	77	78	79	80	80
	99	123	123	125	126	127	129	129	84	84	85	86	86	87	88
11г. y	90	114	114	116	117	118	119	120	74	74	74	75	76	77	77
	95	118	118	119	121	122	123	124	78	78	78	79	80	81	81
	99	125	125	126	128	129	130	131	85	85	86	87	87	88	89
12г y	90	116	116	117	119	120	121	122	75	75	75	76	77	78	78
	95	119	120	121	123	124	125	126	79	79	79	80	81	82	82
	99	127	127	128	130	131	132	133	86	86	87	88	88	89	90
13г y	90	117	118	119	121	122	123	124	76	76	76	77	78	79	79
	95	121	122	123	124	126	127	128	80	80	80	81	82	83	83
	99	128	129	130	132	133	134	135	87	87	88	89	89	90	91
14г y	90	119	120	121	122	124	125	125	77	77	77	78	79	80	80
	95	123	123	125	126	127	129	129	81	81	81	82	83	84	84
	99	130	131	132	133	135	136	136	88	88	89	90	90	91	92
15г y	90	120	121	122	123	125	126	127	78	78	78	79	80	81	81
	95	124	125	126	127	129	130	131	82	82	82	83	84	85	85
	99	131	132	133	134	136	137	138	89	89	90	91	91	92	93
16г y	90	121	122	123	124	126	127	128	78	78	79	80	81	81	82
	95	125	126	127	128	130	131	132	82	82	83	84	85	85	86
	99	132	133	134	135	137	138	139	90	90	90	91	92	93	93
17г y	90	122	122	123	125	126	127	128	78	79	79	80	81	81	82
	95	125	126	127	129	130	131	132	82	83	83	84	85	85	86
	99	133	133	134	136	137	138	139	90	90	91	91	92	93	93

without measuring her blood pressure. She was consulted by a pediatric neurologist and an MRI of the central nervous system was performed, which showed no pathological abnormalities. In another such attack in the emergency department of a regional hospital, an elevated blood pressure (160/100mmHg) was registered and she was referred to a pediatric cardiologist. Echocardiography was performed with initial left ventricular hypertrophy and clonidine therapy was initiated. The patient was consulted by a pediatric endocrinologist in order to rule out secondary hypertension. High levels of FT_4 and TSH were found. As it was considered probably a case of resistance to thyroid hormones, the antihypertensive therapy with atenolol had been adjusted by stopping clonidine. Against the background of therapy, AH persisted with values up to 186/126 mmHg at a heart rate (HF) of about 120 beats/min. The patient was hospitalized for diagnostic clarification in the Children's Clinic of „Sv. Georgy“ University Hospital in Plovdiv.

Physical status data: The child had a lower weight for her height (height = 130 cm – on the 3rd percentile at a target between the 3rd and 15th percentile; body weight = 25 kg, BMI = 14,7 kg/ m^2 – between the 3rd and 15th percentile). Glamorous look with exhaustive horizontal nystagmus. Mycosis type hypopigmentation around the right elbow joint, nevi on the body and limbs and a hyperpigmented spot on the back with unclear borders, measuring about 40/40 mm in the right lower chest (type „café au lait“). The neck was freely movable. No visible vascular pulsations. No thyromegaly. Cardiovascular system – HF-106 beats / min, AP = 135/100 mmHg on the right arm, 140/100 mmHg on the left arm and 125/90 mmHg on the leg. Abdomen-soft, noorganomegaly. Normal neurological status.

Laboratory tests

Total cholesterol – 7,17 mmol/L, over 99th percentile for age and gender; HDL-cholesterol – 1,94 mmol/L, between the 90th and 97th percentile for age and gender; Triglycerides – 1,3 mmol/ L, between the 90th and 97th percentile for age and gender; Electrolytes: K – 3,8 mmol/L; Na – 140 mmol/L; Cl – 94 mmol/L; Ca – 2,44 mmol/L; ionized Ca – 1,23 mmol/l; Phosphorus 1,52 mmol/L; Mg – 1,13 mmol/L; TSH – 8,866 mU/L (0,3-5,6 mU/L) at fT_4 in the reference range, and negative anti-TPO. ABB: pH – 7,47; BE – 6,0; HCO3 – 31,0. Other laboratory parameters (including CBC, urine, nitrogen fractions, transaminases, cortisol, DHEA-S, neuron specific enolase) were in reference values.

Imaging tests

Ultrasound data for a solid, homogeneous, hypoechoic tumor formation in the area of the hilus of the right kidney, with sharp borders, smooth outlines and the impression of a capsule. According to Doppler ultrasound, there was no disturbance of blood flow in the renal artery *(Fig. 1)*.

In the ***computed tomographic examination (CT)*** - a formation with dimensions 27/18/28 mm (with an initial density of 47 XE, increasing to 282 XE in the arterial phase and decreasing to 151 XE and 69 XE in the venous and respectively late phase), engaging renal artery and the presence of a zone of hypoperfusion in the right kidney, as well as folding of the ureter without disturbing its patency. The ostium of the artery is preserved by presenting a segment with a length of 2-3 mm. In the late phase, peripheral enhanced capture is presented as in the fibrous capsule and the central area of the wash out. The formation dislocates the inferior vena cava and the renal veins ventrally without visibly engaging them. It is richly vascularized by the renal artery - by the hilus and inferior pole and by the vertebral arteries *(Fig. 2-7)*.

Fundoscopy - evidence of papillary edema and the presence of a macular star as a result of hypertensive opticopathy.

Course of the disease

During her stay in the hospital the patient had a permanent AH on the background of therapy with a beta-blocker and diuretic. A hypertensive crisis recorded with a calcium antagonist was reported. Upon receiving the data from the imaging examination for renal artery stenosis from a tumor and considering the clinic, we deemed it very likely that it was a case of paraganglioma. Due to the high degree of AH and the hypertensive crisis against the background of antihypertensive therapy and the urgency of the condition,

Table 3.

Normal blood pressure and arterial hypertension.

Category	0-15 years SYS and/or DIA (percentile)	Over 16 years SYS and/or DIA (mm Hg)
Normal	< 90	<130/85
Highly normal	> 90 go < 95	130-139/85-89
Hypertension	> 95	> 140/90
I degree of hypertension	95–99 + 5 mm Hg	140-159/90-99
II degree hypertension	> 99 + 5 mm Hg	160-179/100-109

Table 4. Causes of AH.

RENO-PARENCHIMAL CAUSES • Dysplastic kidney • Renal polycystosis • Obstructive uropathy • Wilms' tumor • Glomerulonephritis • Hemolytic uremic syndrome • Reflux nephropathy • Systemic lupus erythematosus RENOVASAL CAUSES • Renal artery stenosis • Renal artery embolism • Renal vein thrombosis • Arteritis / Takayasu, Periarteritis nodosa / • External compression of the artery COARCTATION OF THE AORTA • Primary AH	NEUROLOGICAL CAUSES • Guillain-Barre syndrome • Increased intracranial pressure • Stress, overexcitement • Encephalitis • Neurofibromatosis ENDOCRINE CAUSES • Primary hyperaldosteronism • Liddle and Gordon syndromes • Pheochromocytoma and neuroblastoma • Congenital adrenal hyperplasia • Cushing's syndrome / disease • Hyperthyroidism - mostly large systolic-diastolic difference, not true hypertension • Hyperparathyroidism • Diabetes mellitus with diabetic nephropathy • Metabolic syndrome

we decided to move to preoperative preparation as in pheochromocytoma/paraganglioma (PPGL). After preoperative preparation with alpha-blocker (doxazosin 0.5 mg/day, five days prior to surgery), total extirpation of the tumor was performed by dissection of the renal artery and preservation of the right kidney. Histological examination confirmed the clinical suspicion of pheochromocytoma/paraganglioma (GEFRIR: Pheochromocytoma/Permanent preparation: Pheochromocytoma/ Immunohistochemical examination: Chromogranin /+/; Synaptophysin /+/; AE1 / AE3 /–/).

After the usual transient hypotension in the early postoperative period, the patient again had arterial hypertension, requiring triple antihypertensive therapy (atenolol, enalapril, furosemide). In the following month it was reduced and stopped. A month after stopping the antihypertensive therapy, the child had normal levels of metanephrines and normetanephrines in the urine (Metanephrine in the urine – 108 μg/24 ^{h} (norm 43,4-260 μg/24 ^{h}) / 224 μg/gCrea (norm 34-367 μg/gCrea); Normetanephrine in urine – 170μg/24 h (norm 128-484 μg/24 ^{h}) / 352 μg/gCrea (norm 38-523 μg/gCrea); 3-Methoxy-tyramine – 219 μg/gCrea (norm 0-525 μg / gCrea) and BP values from the two-time 24-hour Holter monitoring below the 90th percentile *(Fig. 8).*

Discussion

The child was admitted with a history of a year-long headache and a clinic of high-grade hypertension with persistently elevated blood pressure, tolerating well values up to 160/90 mmHg, initial left ventricular hypertrophy and hypertensive opticopathy.

Given the asthenic habit, metabolic syndrome, whose common component is AH, was excluded upon admission. Initial research was aimed at excluding the most common causes of secondary AH, namely of renal origin. Coarctation of the aorta, whose adult form is often diagnosed with AH, was also excluded. The criteria of the different types of vasculitis, in particular panarteritis, occurring with high-grade AH, were not met in the child.

The tests showed that there were data for metabolic alkalosis and lower limit potassium. This brought to the fore hyperaldosteronism as the cause of the condition. Primary hyperaldosteronism is the most common endocrine cause of AH. A renin and aldosterone test was sent, but no result was obtained due to a technical problem with the sample. At the same time, ultrasound showed a formation in the hilus of the right kidney. De-spite the normal blood flow from Doppler ultrasound, it was accepted that the laboratory abnormalities described above were due to secondary hyperaldosteronism on account of compression of the renal artery by the formation. The same was later confirmed by CAT angiography.

Midnight cortisol was also tested in the diagnostic search to rule out atypical Cushing's disease - isolated either within the Carney complex or McCune-Albright syndrome. The visualization of a formation in the hilus of one kidney raised a new question: was it an isolated secondary hyperaldosteronism and reno-vascular hypertension or the tumor itself was hormonally active and contributed to hypertension, given its location (origin from paravertebral ganglia – paraganglioma). Negative neuron-specific enolase does not rule out neuroblastoma.

The screening test for pheochromocytoma, namely metanephrines and normetanephrines in urine, is performed under specific conditions. It is recommended that neither medications be taken, nor certain foods or drinks during the test. On the one hand, there is inter-

Table 5. Medications that may give false positive results in the study of catecholamines and catecholamine metabolites.

Medications	Catecholamines		Metanephrines	
	Norepinephrine	Epinephrine	Normetanephrine	Metanephrine
Tricyclic antidepressants	+++	–	+++	–
Nonselective α-blockers	++	–	++	–
Selective α-blockers	+	–	–	–
ß-blockers	+	+	+	+
Calcium antagonists	+	+	–	–
Vasodilators-hydralazine	+	–	+	–
MAO inhibitors	++	++	++	++
Sympathomimetics	++	++	++	++
Stimulants-caffeine, nicotine	++	++	++	++
Levodopa, carbidopa	++	–	–	–
Cocaine	++	++	++	–

ference between the excreted catecholamine metabolites and some drugs, which are excreted unchanged in the urine during their technical measurement (4). On the other hand, a number of drugs affect the metabolism of catecholamines in vivo and alter their levels in the blood and urine without the presence of pheochromocytoma/paraganglioma *(Table 5)* (5).

In contrast to AH in adults with pheochromocytoma, which is more commonly paroxysmal, in children AH due to pheochromocytoma is more commonly persistent (60-90%), accompanied by headache (about 67%). Paroxysmal tachycardia and arrhythmia may occur less frequently. In 47-57% of all cases, patients re-port palpitations, sweating, nausea, vomiting and paleness. Other symptoms that occur are anxiety, weight loss, visual disturbances (retinal detachment), polyuria, polydipsia, tremor, seizures in hypertensive encephalopathy (6).

In our patient, the presence of pronounced emotional lability, polydipsia-polyuria, glare and laboratory data for hyperlipidemia and thyrotropinemia (as manifestations of hypermetabolism) was what led us to believe that the tumor was a pheochromocytoma. On this occasion, an alpha-blocker was added to the therapy and the child was referred for surgical treatment.

Surgical intervention led to a definitive cure. Lack of AH on follow-up precludes residual stenosis of the renal artery. Urine metanephrine and normetanephrine levels will be monitored annually for risk of recurrence, according to current follow-up recommendations for patients operated on for PPGL (7.)

Pheochromocytoma is a tumor derived from chromaffin cells that produces, accumulates, metabolizes and excretes catecholamines and their derivatives.

The tumor incidence is 0,2-0,8: 100,000 (8). It causes 0,5-2% of cases of AH in childhood. In 80-85% of all cases it has adrenal localization and is then defined as pheochromocytoma. The remaining 15-20% are extraadrenal localization (chest, abdominal cavity, renal hilus) and are then defined as paraganglioma (6). It may occur sporadically or as part of congenital syndromes.

According to recent studies, more than 35% of pheochromocytoma patients appear to be sporadic (somatic mutation is detected in 15-20%) (5). In children mutations are found in 80% of the cases (6). Hereditary pheochromocytoma syndrome is associated with MEN-2A, MEN-2B, neurofibromatosis type 1, vonHippel-Lindau syndrome, and paraganglioma-pheochromocytoma syndromes (SDHx). Mutations in the succinate dehydrogenase genes (SDH-SDHA, SDHB, SDHC and SDHD) have been identified in a large proportion of patients. Most pheochromocytomas, and especially paragangliomas, are associated with mutations in the SDHD and SDHB genes. Therefore, it is accepted to conduct research on these two types of mutations in extraadrenal localization of the tumor, especially in the abdominal cavity. Functionally inactive paragangliomas that do not produce, metabolize, and secrete catecholamines are associated with mutations in genes encoding SDHB, SDHD, and less commonly SDHC. Mutations in the latter genes are also associated with most metastatic forms. Mutations in the SDHA genes are very rare. A number of other mutations associated with pheochromocytoma/paraganglioma have also been described (TMEM127, MAX, HIF2A, PHD1, ATRX, FH and MDH2) (5).

Reports of malignant pheochromocytoma vary between 3 and 36% depending on the genetics and location of the tumor. Those with extraadrenal localization are also at higher risk – 35% (9). Nearly 10% have a metastatic form of the disease at the time of diagnosis, and

Figure 1.
Doppler ultrasonography of the right kidney.

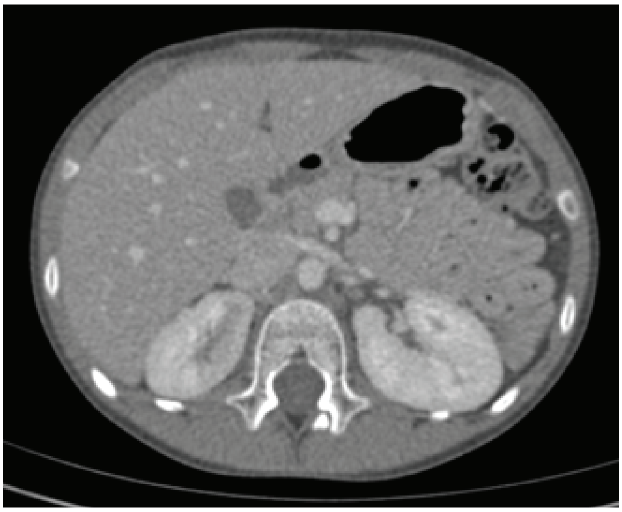


Figure 2. Before contrasting

Figure 3. Early phase of contrast.

those with a tumor larger than 5 cm are at increased risk (5). Patient follow-up is necessary with pheochromocytoma by regular examination of metanephrines and normetanephrines, and by assessment by imaging (5, 10) Cases of metastatic disease have been reported 20 years after removal of the primary tumor (5) The clinical presentation is very diverse and the tumor is declining to the group of the so-called „Great imitator“ (5). Given the manifestation in childhood, the absence of metastases and extraadrenal localization, the most suitable panel for genetic research is for SDHB, SDHC, SDHD, VHL and MAX (10).

The gold standard for diagnosis is metanephrine and normetanephrine in plasma or 24-hour urine, and very likely for the presence of a tumor are results higher than 4 times above the upper limit of normal. Too many factors can affect the results and lead to false positive or false negative results (10) *(Table 5)*.

In adrenal localization, both types of catecholamines are produced and secreted. In extramedullary localization, only norepinephrine is secreted, analogous to the isolated synthesis of norepinephrine in the nervous system and the synthesis of both adrenaline and noradrenaline by the adrenal gland, by enzymatic metabolism of norepinephrine to adrenaline (8).

From the imaging studies, the means of choice is CT, which has a specificity of about 95%. MRI is performed in cases of contraindications for CT. Functional imaging studies are sometimes required: 123I-metaiodobenzylguanidine (MIBG) scintigraphy; PET / CT with 18F-fluorodeoxyglucose (18FFDG), labeled with radionuclide-somatostatin analogue or DOPA. This Preoperative preparation is mandatory to prevent intraoperative complications due to hypertensive crises
in the manipulation of the tumor and the „eruption“ of catecholamines. A-blockers are used (selective and non-selective for at least 7 days); β-blockers (after adequate α-blockade, only in cases of uncontrollable tachycardia/tachyarrhythmia,); tyrosine hydroxylase inhibitor (suppressing catecholamine synthesis); calcium antagonist (5,10,11).

The combination of PPGL with renal arterial stenosis was first described in 1958 by Harrison in a 16-year-old girl. It is more common in paragangliomas. The frequency in adrenal localization is 7%, and in extraadrenal – 30% of cases. There is only one case described in the literature of postoperative permanent stenosis (12).

Renal arterial stenosis may be due to:

1. Compression of the tumor or fibrous tissue in the tumor;
2. Hypertrophy of the muscular wall of the artery, and subsequently permanent stenosis caused by catecholamines and especially norepinephrine in extraadrenal tumor, causing prolonged spasm;
3. Postoperative adhesions;
4. Pseudostenosis during a hypertensive crisis (13).

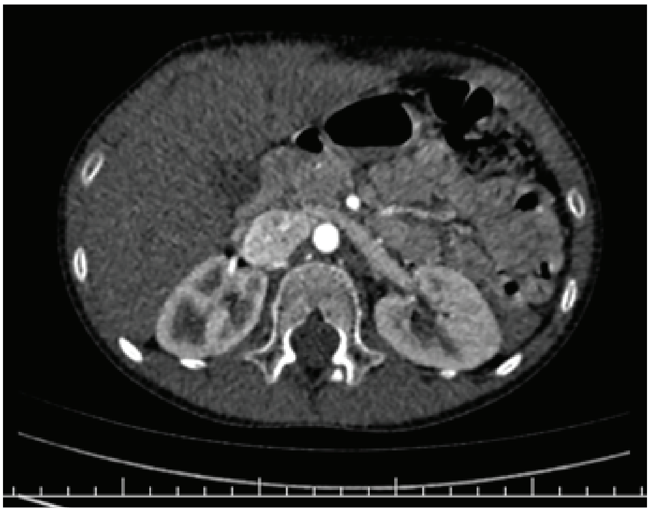


Figure 4. Late phase of contrast.

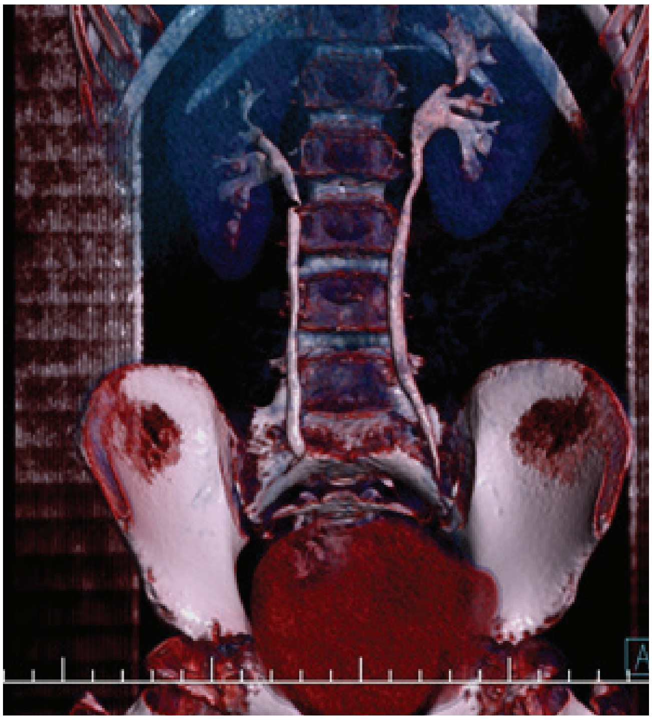


Figure 5. Engagement of the ureter

helps to diagnose the metabolically active tumor/tumors as:

1. 5-10% of people have benign hormonally inactive adrenal formations.
2. Normetanephrine may be elevated in adrenal (50% of adrenal) and in extraadrenal localization.
3. 10% have a metastatic form of the disease at diagnosis.
4. 30% of the cases are with familial and plural forms (5).

Conclusion

The presented clinical case is of late diagnosis of high-grade arterial hypertension as a result of the lack of established practice for measuring blood pressure during the physical examination of children. Although it has become more common in the last two decades, AH is generally not common in childhood, but it is often the first sign of an underlying serious disease, the early diagnosis of which would determine the prognosis. On the other hand, early diagnosis of primary AH and appropriate action (often only with lifestyle changes) would prevent the onset of early cardiovascular disease leading to disability.

Another problem in our country, in secondary endocrine hypertension in particular, is the limited amount of hormonal tests that can be done in most public hospitals. This further complicates and delays diagnosis. Patients with rare endocrine diseases should be referred for diagnosis to the Expert Centers for Rare Endocrine Diseases, which are part of the European Reference Network on Rare Endocrine Conditions (ENDO-ERN) and have all modern methods for diagnosing and treating these diseases. At the same time, any medical institution that has the necessary specialists and equipment for the treatment of such diseases must be prepared to respond to an emergency endocrine condition, such as malignant arterial hypertension. The availability of more specialized centers would shorten the patient's path, reduce transport risks and increase the quality of service.

The measurement of blood pressure should become a mandatory element of the physical examination of all children over 3 years of age. The rule is to measure three times with an interval of 3 minutes and use the average of the last two measurements. There is an established algorithm of behavior in our country, and the percentile tables for AH according to gender, age and height are easily accessible.

Figure 6. Reconstruction – side

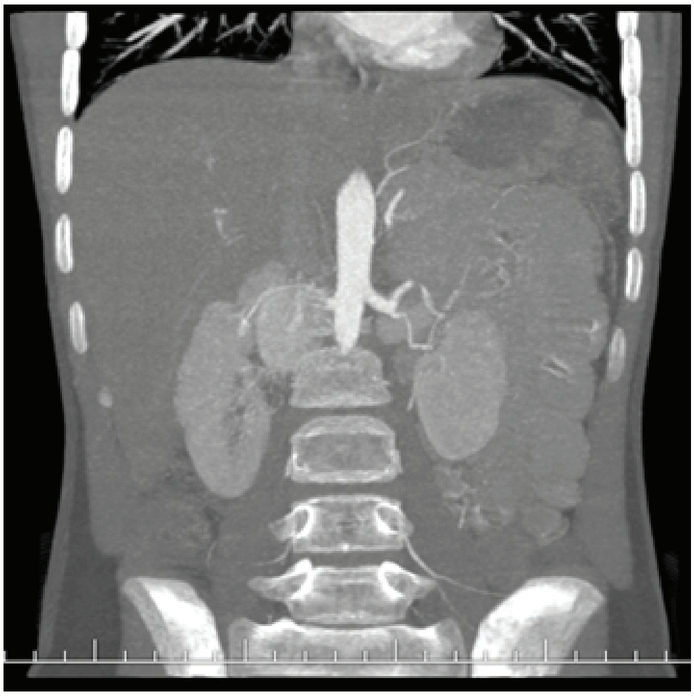
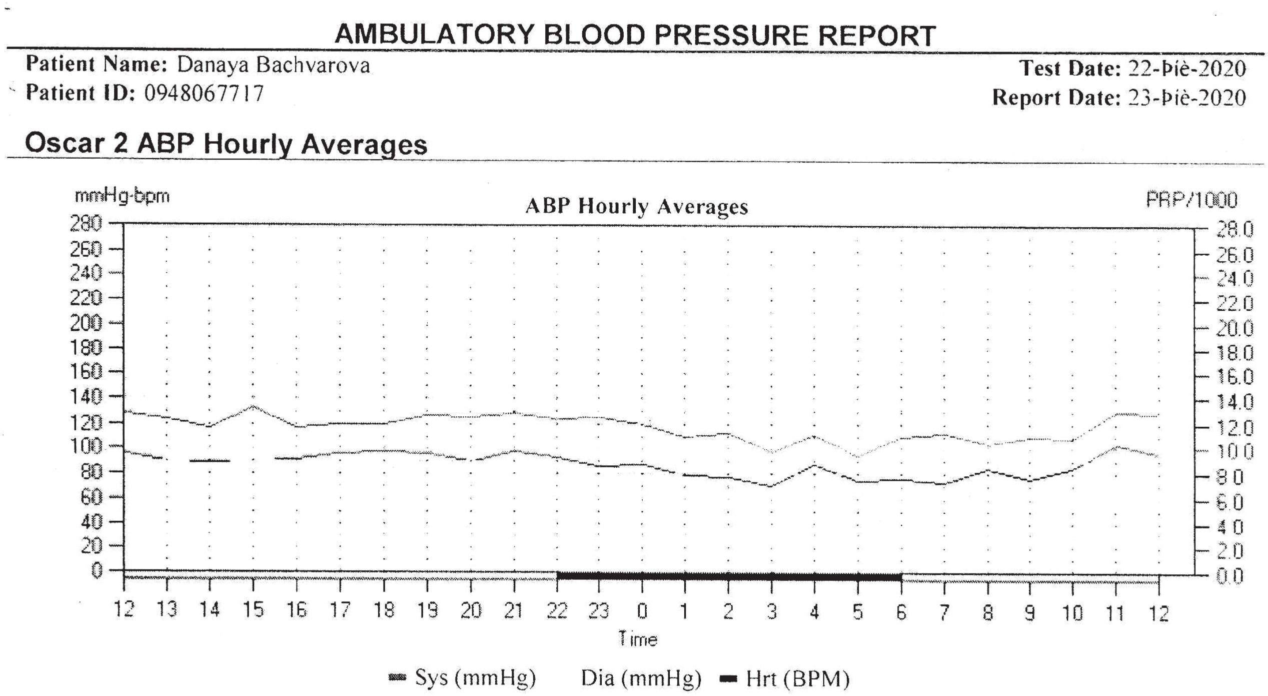


figure 7 . Reconstruction – front.

Figure 8 . Holter AH.



Averaged ABP Data

Hour	#	Sys/Dia (mmHg)	Hrt (BPM)	MAP (mmHg)	PP (mmHg)	PRP/1000
12:00 - 12:59	2	129/ 83	96	98	46	12.5
13:00 - 13:59	2	124/ 91	90	102	34	11.3
14:00 - 14:59	2	117/ 76	89	90	40	10.4
15:00 - 15:59	2	132/ 90	91	104	41	11.9
16:00 - 16:59	2	116/ 75	92	88	40	10.6
17:00 - 17:59	2	120/ 80	96	94	40	11.5
18:00 - 18:59	2	120/ 77	98	92	44	11.8
19:00 - 19:59	2	127/ 90	96	102	38	12.2
20:00 - 20:59	1	126/ 87	91	100	39	11.5
21:00 - 21:59	2	128/ 87	98	101	41	12.5
22:00 - 22:59	1	124/ 83	94	97	41	11.7
23:00 - 23:59	1	125/ 88	86	100	37	10.8
00:00 - 00:59	1	119/ 80	87	93	39	10.4
01:00 - 01:59	1	110/ 68	79	82	42	8.7
02:00 - 02:59	1	112/ 69	77	83	43	8.6
03:00 - 03:59	1	97/ 60	70	72	37	6.8
04:00 - 04:59	1	111/ 74	88	86	37	9.8
05:00 - 05:59	1	95/ 61	75	72	34	7.1
06:00 - 06:59	2	110/ 68	76	82	42	8.4
07:00 - 07:59	1	113/ 76	73	88	37	8.2
08:00 - 08:59	2	104/ 68	84	80	36	8.7
09:00 - 09:59	2	110/ 70	76	83	41	8.3
10:00 - 10:59	2	108/ 70	85	83	37	9.1
11:00 - 11:59	2	130/ 94	104	106	36	13.5

References

1. **Song P, Zhang Y, Yu J, Zha M, Zhu Y, Rahimi K, Rudan I.** Global Prevalence of Hypertension in Children: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Pediatr 2019* Oct 7;173(12):1-10

2. **Flynn JT, Kaelber DC, Baker-Smith CM, et al.** Clinical Practice Guideline for Screening and Management of High Blood Pressure in Children and Adolescents. *Pediatrics 2017;* 140(3): e20171904

3. **Kolarova-Yaneva N, Dasheva-Dimitrova A,** Primary arterial hypertension in childhood. Algorithm of behavior and prevention. *MEDINFO 2019;* 2.

4. **Spilker B, Watson BS, Woods JW.** Drug interference with measurement of metanephrines in urine. *Ann Clin Lab Sci 1983;* 13(1): 16-19.

5. **KyriakieSarafoglou** PediatricEndocrinology and Inborn Errors of Metabolism. *Second Edition Copyright © 2017 by McGraw-Hill Education.* ISBN 978-0-07-177314-0

6. **Bholah R, Bunchman TE.** Review of Pediatric Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Front Pediatr 2017;* 5: 155.

7. **Plouin PF, Amar L, Dekkers OM, Fassnacht M, Gimenez-Roqueplo AP, Lenders JW, Lussey-Lepoutre C, Steichen O; Guideline Working Group.** European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline for long-term follow-up of patients operated on for a phaeochromocytoma or a paraganglioma. *Eur J Endocrinol 2016;* 174(5): G1-G10.

8. **Gibson CM, Al Maradni A, Abdelwahed M.** Pheochromocytoma epidemiology and demographics. www.wikidoc.org.

9. **Blake MA, Chief Editor: George T Griffing.** Pheochromocytoma Treatment and Management. *Medscape Oncology 2020.*

10. **Lenders JW, Duh QY, Eisenhofer G, Gimenez-Roqueplo AP, Grebe SK, Murad MH, Naruse M, Pacak K, Young WF Jr;** Endocrine Society. Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab 2014;* 99(6): 1915-1942.

11. **Chen H, Sippel RS, O'Dorisio MS, Vinik AI, Lloyd RV, Pacak K;** North American Neuroendocrine Tumor Society (NANETS). The North American Neuroendocrine Tumor Society consensus guideline for the diagnosis and management of neuroendocrine tumors: pheochromocytoma, paraganglioma, and medullary thyroid cancer. *Pancreas 2010;* 39(6): 775-783.

12. **Sarathi V, Bandgar T, Lila AR, Deshpande AA, Dalvi AN, Patwardhan S, Shah NS.** Coexistence of pheochromocytoma /paraganglioma and renal artery stenosis. *Indian J Endocrinol Metab 2012;*16(6):1009-1011.

13. **Kota SK, Kota SK, Meher LK, Tripathy PR, Sruti J, Modi KD.** Pheochromocytoma with renal artery stenosis: A case-based review of literature. *J Cardiovasc Dis Res 2012;* 3(1):36-39.

Българско дружество по ендокринология
Bulgarian Society of Endocrinology

Списание
ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ISSN 1310-8131

Journal
ENDOCRINOLOGIA ISSN 1310-8131

Адрес на редакционната колегия:

Клиничен център – УСБАЛЕ
„Акад. Иван Пенчев“ ул. „Здраве“ №2, 1431 София;
Проф. Мария Обецова, *Главен редактор*
тел. (032) 602486;
Мобилен: 0887771322,
E-mail: morbetzova@abv.bg

Editorial Board address for correspondence:

Clinical Center of Endocrinology
„Acad. Iv. Penchev“, University Hospital 2,
Zdrave Str., 1431 Sofia, Bulgaria;
Prof. Maria Orbetzova, *Editor in Chief*
Tel (++359) 32602486;
Mobile (++359) 887771322,
E-mail: morbetzova@abv.bg

Списание „Ендокринология“, издание на Българското дружество по ендокринология, излиза в 4 книжки годишно. В него се отпечатват оригинални научни статии, описания на клинични случаи, обзори, рецензии, информация за проведени и предстоящи научни събития и други материали в сферата на клиничната ендокринология. Обзорните материали от български автори излизат на български език с резюме на български и английски език. Оригиналните статии и казуси се отпечатват едновременно на български и английски език. По усмотрение на авторските колективи и преценка на редакционната колегия въз основа характера на материала, някои оригинални статии могат да бъдат публикувани само на български език. Материалите, предоставени от чужди автори, се поместват на английски език с цялостен или подбран превод на български език по преценка на редакционната колегия.

Материалите се изпращат на български език в електронен вид с шрифт Times New Roman, размер 12 на e-mail на главния редактор

The journal of the Bulgarian Society of Endocrinology „Endocrinologia“ is published in 4 issues per year. It accepts for publication original research papers, case reports, short communications, reviews, opinions on new medical books, commentaries and announcements for past of future scientific events (congresses, symposia, etc.) in all fields of clinical Endocrinology.

The reviews are published in Bulgarian language with an abstract both in Bulgarian and English. The original papers and case reports are published also in both languages. Some original research papers may be published in Bulgarian only, depending on the content and the decision of the authors and the editors. Papers of non-Bulgarian authors are published in English with full of partial translation into Bulgarian, provided by the Editorial board.

The manuscripts should be submitted initially in Bulgarian (for materials from abroad – in English) as MS Word.doc files, formatted in 12 pt. Times New Roman typeface. The manuscript is then checked for compliance with the edition's requirements and sent to the reviewers. If accepted for publication after the review, the authors are (за чуждестранните материали – на английски език). След рецензиране и приемане за печат в срок до 3 седмици окончателният вариант се предоставя с превод на английски език (с изключение на обзорите) на e-mail на главния редактор с придружително писмо на адреса на редакцията, подписано от авторите, с което потвърждават съгласието си за участие и декларират, че материалът не е отпечатван в други научни списания, освен като резюме на съобщение, изнесено на научен форум.

Обемът на представените материали не трябва да превишава 10 стандартни (по 1800 знака) страници за оригиналните статии, 14 страници за обзорните статии, 4 страници за казусите, 2 страници за информация относно научни прояви и научни дискусии, 1 страница за рецензии на монографии, учебници и пр. В посочения обем не се включват титулната страница и резюмето.

Структурата на статиите трябва да отговаря на следните изисквания:

Титулна страница

а) заглавие, имена на авторите, месторабота, научна организация. При повече авторски звена с арабска цифра се маркират кореспондиращите им автори.

б) същите данни на английски език се изписват под българския текст. При статии от чужди автори българският текст следва английския.

в) адрес за кореспонденция – съдържа данните на автора за кореспонденция на български и английски език – име, месторабота, пощенски и електронен адрес.

Резюме

Резюмето се представя на отделна страница в обем до 250 думи. То трябва да бъде структурирано както следва: цел, материали и методи, резултати и заключения. Тази структура не важи за обзорните статии. Посочват се до 5 ключови думи.

Основен текст

Оригиналните статии трябва да са структурирани както следва: въведение, материал и методи, резултати, обсъждане, заключение и/или изводи. В текста се допускат само официално приети международни съкращения, останалите трябва да бъдат

required to submit within 3 weeks the corrected version together with the English language translation (not applicable for review articles). A cover letter, signed by all authors is mailed to the editors, stating any conflicts of interest and that the manuscript in full or any part of it has not been published elsewhere or simultaneously submitted for publication, except as an abstract of congress participation.

The size of each paper should not exceed 10 standard pages (1800 characters) for original research articles, 14 pages for reviews, 4 pages for case reports, 2 pages for short communications, discussions or scientific events announcements or comments and 1 page on medical book reviews. The manuscripts should be structured as follows:

Title page

a. Title, names of the authors (family name followed by given name), affiliation. If more than one affiliation, they should be designated by Arabic numbers in Bulgarian and English languages.

b. A short title up to 8 words should be provided

c. Address of the corresponding author name, postal address (business of home as preferred), phone number, fax number, email address.

Abstract

The abstract should occupy the next page of the manuscript and not exceed 250 words. The abstracts of original research papers should be clearly structured with Aim; Materials and methods; Results; Conclusions. Abstracts of review papers may not follow that structure. Up to five key words should be written after the abstract.

Main text

Original papers should be structured as follows: Introduction; Aim; Materials and methods; Results; Discussion; Conclusions. Any abbreviation that is not commonly accepted should be written in full followed by the abbreviation in parentheses at first mention in the text. The International System of Units (SI) should be used for all measurement units. Citations in the text are designated by their bibliography sequential numbers in parentheses.

Tables and figures

Each table should be on a separate page after the bibliography with the table caption preceding it. All illustrations should be submitted as separate пояснени в текста при първата им поява. За мерните единици е задължителна международната система SI. Цитатите вътре в текста се отбелязват само с номерата им в книгописа, оградени с малки скоби.

Таблици и илюстрации

Всяка таблица се предоставя на отделна страница след книгописа. Заглавията на таблиците се изписват над тях. Илюстрациите се представят на отделни файлове. Графики и диаграми се предоставят във формати .xls (MS Excel), .ppt (MS PowerPoint), .eps (encapsulated postscript), които позволяват редактиране. Снимки (собствени), както и репродукциите на ползвани от чужди източници от Интернет да бъдат представяни с добро качество във формат JPEG и резолюция 300 dpi. Текстът към илюстрациите се представя в края на основния текст, след таблиците. Номерацията на таблиците и илюстрациите е с арабски цифри и се посочва в основния текст. При използване на чужд илюстративен материал, последният трябва да бъде придружен със съответно съгласие за възпроизвеждане от носителя на авторските права. Това се указва в текста към илюстрацията.

Книгопис

Книгописът се представя на отделна страница. Броят на цитираните източници е препоръчително да не надхвърля 25 (за обзорните статии 40) като следва да включва актуални източници от последните 5 години, както и публикации от български автори, работили по съответния проблем. Подреждането на източниците да става по реда на поява в текста. Книгописът се оформя съгласно Унифицираните изисквания за публикации в областта на биологията и медицината и е опростена версия на стил Ванкувър (http: //www. ncbi. nlm.nih. gov/pmc/ articles/ PMC 3142758/). Всички автори се отбелязват с фамилно име, последвано от инициалите. При повече от шест автори, след шестия се поставя et al. Следва цялото заглавие на цитираната статия (с главна буква е само началната дума), название на списанието изписано съкратено според Index Medicus, година, том, брой на книжката в малки скоби (незадължителен при издания с непрекъснато

files. Diagrams and graphs should be prepared in .XLS (MS Excel), PPT (MS PowerPoint), EPS (encapsulated postscript) file formats that permit further processing. Bitmap images (photographs etc.) should be submitted in JPEG format and resolution 300 dpi. The figure captions are added to the main article document after the tables. All tables and figures are numbered sequentially and should be referred to in the text. If illustrations from other sources are used, the latter should be accompanied by the relevant permission for reproduction with a reference in the figure caption.

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 25 titles for original research articles and 40 titles for the reviews. It is advisable that sources on the topic from the recent five years be used. The references are listed in their order of first appearance in the text. They should follow the Vancouver format and the Uniform requirements (http:// www.ncbi. nlm. nih.gov/pmc/ articles/ PMC 3142758/). All authors should be listed for papers with up to six authors; for papers with more than six authors, the first six only should be listed, followed by et al. The authors are followed by the full title of the paper (Only the first word is capitalized). The journal title is abreviated in conformity with the latest edition of Index Medicus, followed by year, volume, issue in parentheses (not necessary for periodicals with a continuous pagination throughout the volume) and full first and last page. Chapters of books are cited in the same way, the full name off the chapter first, followed by „In:“, full title of the book, editors, publisher, town, year, first and last pages of the cited chapter.

Examples

Reference to a journal article:

1. **McLachlan S, Prumel MF, Rapoport B.** Cell Mediated or Humoral immunity in Graves‘ ophthalmopathy? *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78 (5): 1070-1074.

If the original cited paper is in Bulgarian:

2. **Christov Vl, Gocheva N, Petkova M, Zacharieva S, Tankova Tz, Orbetzova M, et al.** A consensus of the Bulgaran Institute Metabolic Syndrome on the metabolic syndrome. *Nauka Endocrinologia.* 2010; 2: 53-70 (in Bulgarian)

номериране на страниците в тома), пълни начална и крайна страница. Глави (раздели) от книги се изписват по аналогичен начин, като след автора и заглавието на главата (раздела) се отбелязват имената на редакторите, пълното заглавие на книгата, издателството, градът и годината на издаване, началната и крайната страница. Източниците на кирилица следва да бъдат представени и с оригиналния им превод на английски или транслитерация (ако източникът няма оригинален превод на заглавието и резюме на английски) и със забележка в скоби (in Bulgarian). Книгописът на оргиналните статии се отпечатва след английския текст.

Примери:

Статия от списание:

1. **McLachlan S, Prumel MF, Rapoport B.** Cell Mediated or Humoral immunity in Graves' ophthalmopathy? *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78 (5): 1070-1074.

2. **Christov Vl, Gocheva N, Petkova M, Zacharieva S, Tankova Tz, Orbetzova M, et al.** A consensus of the Bulgaran Institute Metabolic Syndrome on the metabolic syndrome. Nauka Endocrinologia. 2010; 2: 53-70 (in Bulgarian) (Христов Вл, Гочева Н, Петкова М, Захариева С, Орбецова М и съавт. Консенсус на Българския институт „Метаболитен синдром" за поведение при метаболитен синдром. *Наука Ендокринология 2010*; 2: 53-70).

Глава (раздел) от книга:

1. **Delange F.** Endemic Cretenism. In: Braveman L, Utiger R, editors. The Thyroid. 9-th ed. *Philadelphia: Lippincott Co*; 1991. p. 942-955.

Материалите трябва да са написани на правилен български, респективно английски език при спазване на съвременните правила за правопис и пунктуация. Препоръчително е авторите да консултират английския текст с филолог или англоговорящ. Редакцията може да насочи към квалифицирани преводачи за превод или редактиране на материалите на английски език срещу заплащане. Материали, които не отговарят на изискванията на списанието, се връщат на авторите за корекции преди да бъдат предадени за рецензиране.

(Христов Вл, Гочева Н, Петкова М, Захариева С, Орбецова М и съавт. Консенсус на Българския институт „Метаболитен синдром" за поведение при метаболитен синдром. *Наука Ендокринология* 2010; 2: 53-70).

References to a book chapter:

1. Delange F. Endemic Cretenism. In: Braveman L, Utiger R, editors. The Thyroid. 9-th ed. Philadelphia: Lippincott Co; 1991. p. 942-955.

The manuscripts should be prepared in good contemporary language with correct spelling, grammar and punctuation. Non-native English authors are advised to consult the text with a native speaker or a philologist. On demand, the editors might recommend paid qualified translators for text translation or language proof-reading. Manuscripts that do not comply with the requirements of the journal will be returned to the authors for corrections before being forwarded to the reviewers.

Address for sending the manuscripts and other editorial correspondence

Editorial Board Address for Correspondence:

Clinical Center of Endocrinology,
„Acad. Iv. Penchev", University Hospital, 2
Zdrave Str., 1431 Sofia, Bulgaria;
Prof. Maria Orbetzova, *Editor in Chief*
Tel (++359) 32 60 24 86;
Mobile (++359) 887771322
E-mail: morbetzova@abv.bg

Адрес на редакционната колегия:

Клиничен център – УСБАЛЕ,
„Акад. Иван Пенчев"
ул. „Здраве" №2, 1431 София;
Проф. Мария Орбецова, *Главен редактор*
тел. (032) 602486;
Мобилен: 0887771322,
E-mail: morbetzova@abv.bg

ISSN 1310-8131

®

ЕНДОКРИНОЛОГИЯ
ENDOCRINOLOGIA

Списание на Българското дружество по ендокринология към СНМД в България

Journal of the Bulgarian Society of Endocrinology (BSE)

Списание „Ендокринология“ се индексира в следните база-данни/the journal „Endocrinologia“ is indexeded by:
- **SCOPUS Elsevier Bibliographic Databases** ***(2001-2017)***
- **EMBASE**
- **Bulgarian Citation Index** ***(since 1996)***
- **EBSCO** ***(since 2019)***

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

- **SCOPUS Elsevier Bibliographic Diabetes,** *Netherlands*
- **National Library of Medicine,** *Bethesda*
- **The Librarian Royal Society of Medicine,** *London*
- **WHO Health Organization Library,** *Geneva*
- **Academic National de medicine bibliotheque,** *Paris*
- **Canadian Institute for Scientiic and technical Information,** *Otava*
- **ВИНИТИ/РАН-МИННАУКЕ РОССИИ,** *Москва*
- **ДЕРЖАВНА НАУКОВА МЕДИЧНА БИБЛИОТЕКА,** *Киев*

Адрес на редакционната колегия:
Клиничен център – УСБАЛЕ, „Акад. Иван Пенчев“ ул. № Здраве 2, 1431 София;
Мобилен: 0887771322 (Проф. Мария Орбецова), E-mail: morbetzova@abv.bg

Editorial Board address for correspondence:
Clinical Center of Endocrinology „Acad. Ivan Penchev“, University Hospital,
2 Zdrave Str., 1431 Sofia, Bulgaria;
Mobile: (++359) 0887771322 (Prof. Maria Orbetzova) E-mail: morbetzova@abv.bg