

GENETSKA ANALIZA KOD PACIJENTA SA FEOHROMOCITOMOM

Sažetak: Pacijentkinja stara 45 godina, primljena je u Institut zbog tumora nadbubrežne žlezde. Tegobe su počele godinu dana ranije skokovima krvnog pritiska, crvenilom i toplotom u licu, obilnim znojenjem, mukom i nagonom na povraćanje. Ultrazvučno je pokazano prisustvo velike abdominalne mase u predelu desne nadbubrežne žlezde, što je kasnije potvrđeno i skenerom. Dobijeni su izrazito povišeni urinarni kateholamini (noradrenalin i adrenalin), čime je postavljena dijagnoza feohromocitoma. Pacijentkinja je potom i operisana, a patohistoloski nalaz je potvrdio dijagnozu. Genetskim ispitivanjem je utvrđeno postojanje germinativne mutacije u 46 kodonu (GTG→GTA,V46V) u genu za sukcinat dehidrogenazu D (SDHD).

Feohromocitom je tumor hromafinih ćelija koji sekretuje kateholamine. Uglavnom je lokalizovan u nadbubrežnoj žlezdi, dok je u 10% slučajeva lokalizovan u ganglijama simpatickog nervnog sistema. Najčešće se javlja kao sporadični tumor ali može biti i nasledan, u okviru četiri familijarna kancerska sindroma: multipla endokrina neoplazija tip II (MEN 2), von Hippel-Lindau sindrom (VHL), neurofibromatoza tip1 (NF1) i familijarni feohromocitom. Za nastanak ovih sindroma su odgovorne mutacije u RET protoonkogenu (MEN 2), VHL tumor-supresorskom genu, NF1 tumor-supresorskom genu i genu za SDHD (familijarni feohromocitom). Feohromocitomi koji se javljaju u sklopu familijarnih sindroma se razlikuju od sporadičnih formi i najčešće se javljaju kao bilateralni tumori. Zbog toga ali i zbog pridružene pojave drugih maligniteta, genetski skrining pacijenata sa feohromocitomom je obavezan. S obzirom na to da se svi sindromi prenose autozomno dominantno i da ih odlučuje visoka penetrantnost, neophodno je i testiranje srodnika. Skrining mutacija u SDHD genu bi trebalo da bude rutinska analiza kod svih pacijenata sa naizgled sporadičnim feohromocitomom.

Cljučne reči: feohromocitom, MEN 2a, VHL, NF 1, SDHD.

Abstract: A 45-year old female was admitted to the hospital because of a large adrenal tumor. The history of disease began a year earlier with hypertensive paroxysms accompanied by redness and warmth in the face, profuse sweating, nausea and the urge to vomit. Large abdominal mass in the right adrenal area was detected ultrasonographically, and confirmed by CT-scan. Biochemical analyses revealed highly elevated urinary catecholamines (norepinephrine and epinephrine), which led to clinical diagnosis of pheochromocytoma. The patient was operated, and pathohistological finding confirmed the diagnosis. Genetic testing revealed the existence of germline mutation in 46. codone (GTG@GTA,V46V) in succinate-dehydrogenase D gene (SDHD).

Pheochromocytoma is a catecholamine-secreting tumor of chromafine cells usually localized in adrenal glands, only 10% are localized in ganglia of simathetic nervous system. The most of these tumors are sporadic, but they can be inherited as a part of four familial cancer syndromes: multiple endocrine neoplasia type 2 (MEN 2), von Hippel-Lindau syndrome (VHL), neurofibromatosis type 1 (NF1) and familial pheochromocytoma. These syndromes are caused by mutations in RET protooncogene, VHL tumor-suppressor gene, NF1 tumor-suppressor gene and SDHD gene. In comparison with sporadic, familial pheochromocytomas have different characteristics, and they are usually bilateral. Because of the coexistence of other malignancies, genetic screening of patients with pheochromocytoma is mandatory. These syndromes have autosomal dominant inheritance with high penetrance, and it is important to test first-degree relatives as well as carriers. Genetic screening for mutations in SDHD gene should be done routinely in all patients with apparently sporadic pheochromocytoma.

Key words: pheochromocytoma, MEN II, vHL, NF1, SDHD.

Prikaz

Žena stara 45 godina iz Vranja, primljena je u Institut u februaru 2005. godine radi ispitivanja zbog tumora desne nadbubrežne žlezde. **Anamnezno** tegobe počinju aprila meseca 2004. godine naglim skokovima krvnog pritiska do najvećih vrednosti od 200/110 mmHg, praćenih crvenilom i toplotom u licu, obilnim znojenjem, ponekad mukom i nagonom na povraćanje. Tegobe su spontano počinjale i spontano prestajale nakon nekoliko minuta, nakon čega se osećala iscrpljeno. Napadi su bivali sve češći i javljali su se i do nekoliko puta nedeljno. Navodi da već deset godina ima povišen pritisak, prosečnih vrednosti oko 150/90mmHg, bez skokova. Povremeno je lečena antihipertenzivnim lekovima (metoprolol, fosinopril, amlodipin). Ultrazvučni pregled trbuha je pokazao uvećanje desne nadbubrežne žlezde promera 41.4 mm, jasnih kontura i hipoehogene strukture, sa dve manje cistične promene unutar iste. Potom je urađen CT trbuha u maju 2004. godine, i konstatovana je tumorska promena u projekciji desne nadbubrežne žlezde, veličine 56 x 64 cm sa hipodenznim središtem. Zbog specifične porodične situacije pacijentkinja se i pored sve učestalijih tegoba nije kontrolisala do januara 2005. godine, kada je na kontrolnom ultrazvuku trbuha pokazana dalja progresija tumorske promene, veličine oko 75 x 65 mm. Tada je upućena u Institut za endokrinologiju KCS. Nije bitnije menjala telesnu težinu, u ličnoj anamnezi navodi operaciju ciste desnog jajnika (2000. godine), u porodičnoj anamnezi da je majka hipertoničar.

Objektivno pacijentkinja je bila gojazna sa ravnomernim rasporedom masnog tkiva, telesne težine 89 kg, visine 170 cm i indeksa telesne mase 31 kg/m. Koža i vidljive sluznice blede prebojene. Štitasta žlezda difuzno uvećana sa mikronodusima u oba režnja, bezbolna, pokretna pri gutanju, limfne žlezde se nisu pipale. Nalaz na srcu i plućima normalan, TA 150/100 mmHg, f 88/min, ortostatska hipotenzija nije registrovana. Jetra i slezina se nisu pipale, nisu palpirane rezistencije u truhu. **Laboratorijske analize:** u krvnoj slici znaci mikrocitne anemije (retikulociti normalni, MCV 71.6/L) glikemija našte povišena (prosečna koncentracija šećera u krvi 8.7mmol/l) u OGTT-u dobijena dijabetesna kriva (9.2, 12.9, 16.2, 10.9, 14.6 mmol/l), ostale laboratorijske analize uredne. **Tumorski markeri:** Hromogranin A povišen (359.4 ěg/ml n.v. 19.4 do 98.1 ěg/ml), kalcitonin, tireoglobulin, CEA, AFP i 5-HIAA normalnih vrednosti. **Imunske analize:** anti Tg At i anti TPO At negativna. **Hormonske analize:** u šest uzoraka slobodnih urinarnih kateholamina dobijeni povišeni noradrenalin i adrenalin (NOR: 1503.56, 1884.44, 1704.97, 389.85, 98.64, 107.98 ěg/24h; ADR: 12.8, 7.10, 11.62, 8.23, 6.20, 13.94 ěg/24h; DM: 221.45, 242.34, 231.67, 251.22, 152.17, 142.63 ěg/24h). Kortizol, ACTH, 17-OH progesteron, testosteron, SHBG, sTSH, FT4 normalnih vrednosti. **Rtg grudnog koša** urednog nalaza. **EHO trbuha:** U projekciji desne nadbubrežne žlezde vidi se tumorska promena veličine 78 x 58 mm, ostalo b.o. **CT trbuha:** U predelu desne nadbubrežne žlezde vidljiva okrugla, nehomogena, hipodenzna tumorska formacija veličine 5 x 6 x 10 cm sa centralnim nekrozama, retroperitonealno nisu viđeni uvećani limfni nodusi. Ostali nalaz uredan. Na osnovu povećanih vrednosti slobodnih urinarnih kateholamina, postavljena je dijagnoza feohromocitoma. Započeta je preoperativna priprema phenoxybenzaminom (Dibenzylamine) u dozi od 40mg dnevno, nakon čega je pacijentkinja upućena na hirurško odeljenje gde je učinjena desnostrana adrenalektomija. **PH nalaz:** pheochromocytoma gl. suprarenalis. Tumor je jasno ograničen, veličine 75 x 65 x 30mm, težine 78g, inkapsuliran debljom fibroznom kapsulom koju na nekim mestima cepa i siri se u okolne strukture.

S obzirom na pristigli PH nalaz planirana je nova hospitalizacija pacijentkinje, kada ce se izvršiti to da je J¹³¹MIBG (metajodobenzilguanidin) scintigrafija celog tela i ponovo odrediti slobodni urinarni kateholamini. **Genetska analiza** metodom PCR i direktnim sekvenciranjem DNK leukocita periferne krvi je pokazala prisustvo germinativne mutacije u 46 kodonu (GTG @ GTA, V46V) u genu za sukcinat dehidrogenazu D (SDHD) (slika 1).

Diskusija

Feohromocitom je neuroendokrini tumor hromafinih ćelija koji sekretuje kateholamine i u oko 90% slučajeva potiče iz srži nadbubrega, dok je u 10% slučajeva porekla vannadbubrežnog hromafinog tkiva (paragangliomi). U 90% slučajeva su benigne prirode, mada ne postoji pouzdan histopatološki metod kojim bi se maligni feohromocitom mogao razlikovati od benignog. Osobine koje upućuju na malignitet su: stepen nekroze, nuklearni pleomorfizam, mitotski indeks, kapsularna invazija, vaskularna invazija. Ipak, da bi se feohromocitom okarakterisao kao maligni neophodno je i postojanje udaljenih metastaza, a karakteristične su i visoke vrednosti dopamina u serumu i urinu (1).

Postoje dve subpopulacije hromafinih ćelija: adrenergijske ćelije, koje sadrže enzim feniletanolamin N-metiltransferazu (PNMT) i koje predominantno skladište adrenalin i noradrenergijske hromafine ćelije, koje ne sadrže ovaj enzim i dominantno skladište noradrenalin. PNMT vrši konverziju noradrenalina u adrenalin. Većina feohromocitoma predominantno produkuje noradrenalin, ređe noradrenalin i adrenalin i retko samo adrenalin. Feohromocitomi koji produkuju adrenalin uglavnom vode poreklo iz nadbubrežnih žlezda, dok paragangliomi, s obzirom na to da ne sadrže PNMT, produkuju samo noradrenalin. Pored kateholamina, feohromocitomi mogu da sadrže i produkuju brojne peptide: hromogranin A, endogene opoide, eritropoetin, PTH-related peptid, neuropeptid Y itd., koji se mogu koristiti kao tumorski markeri u praćenju efikasnosti lečenja.

Klinička slika zavisi od metaboličkih i hemodinamskih efekata cirkulišućih kateholamina ali i vrste istovremeno izlučenih peptida. Najčešća klinička manifestacija feohromocitoma je hipertenzija, i to paroksizmalna hipertenzija (50%), mada jedan deo ovih pacijenata može biti i normotenzivan (10%). Nije retka ni ortostatska hipotenzija praćena tahikardijom. Bledilo je takođe karakterističan znak (30%) dok se crvenilo lica i flaševi javljaju kod daleko manjeg broja pacijenata. Više od polovine pacijenata ima oštećenu toleranciju na glukozu i ovaj poremećaj glikoregulacije ne zahteva lečenje, s obzirom na to da simptomi nestaju sa uklanjanjem tumora. Ipak, klasičan trijas simptoma kod pacijenata sa hipertenzijom koji pobuđuje sumnju na feohromocitom čine glavobolja (90%), palpitacije i profuzno znojenje. Mogu biti prisutni i dispnoja, gubitak telesne težine, bolovi u stomaku, mučnina, napadi panike, umor, poliurija itd (2, 3).

Feohromocitom može da se javi kao sporadičan i kao nasledan tumor, u okviru nekoliko familijarnih kancerskih sindroma: 1) MEN 2a i MEN 2b, 2) von Hippel – Lindau sindrom (VHL), 3) familijarna neurofibromatoza tip 1, i 4) familijarni feohromocitom (4, 5). Pacijenti sa naslednim tumorom su uglavnom mladi pri postavljanju dijagnoze, najčešće imaju bilateralan tumor i imaju manji rizik za malignu bolest.

Sindrom multiple endokrine neoplazije 2a (MEN 2a) je autozomno dominantno nasledan kancerski sindrom koji čine meduladni karcinom štitaste žlezde (MTC), primarni hiperparatireoidizam (PHPT) i feohromocitom. MEN 2b čine medularni karcinom štitaste žlezde, feohromocitom, marfanoidni habitus i multipli mukozni neuromi. Feohromocitom se javlja u 50% pacijenata sa MEN 2a ili MEN 2b sindromom, u 50% pacijenata je bilateralan i najčešće se javljaju između 30 i 40 godina starosti. Kao prva manifestacija bolesti se javlja u 25.1% slučajeva (7). Svi pacijenti sa MEN2 sindromom imaju germinativnu mutaciju u RET proto-onkogenu, lociranom na hromozomu 10q11.2. RET proto-onkogen se eksprimira u tkivima poreklom od neuralne kreste poput hromafinih i parafolikularnih C ćelija, i njegove mutacije dovode do ligand-nezavisne konstitutivne aktivnosti tirozin kinaznog receptora. Mutacije su najčešće u 10. exonu (kodoni 609, 611, 618, 620) i 11. exonu (kodoni 631 i 634). Kod 80% pacijenata sa klasičnim MEN 2a sindromom ima mutaciju u 634. kodonu i ovakva mutacija nosi najveći rizik za nastanak feohromocitoma. Mutacija koja dovodi do zamene metionina u treonin u 918 kodonu 16. exona dovodi do nastanka MEN 2b i povezana je sa nastankom feohromocitoma u ovom sindromu.

Sindrom von Hippel – Lindau (VHL) je autozomno dominantno nasledni kancerski sindrom koga čine hemangioblastomi cele kranio-spinalne osovine, renalne ciste i karcinom bubrežnih ćelija, pankreasni neuroendokrini tumori i ciste, ciste epididimisa i širokih ligamenata i feohromocitom. Nastaje mutacijom u VHL genu na 3p26-25 hromozomu, koji kodira tumor-supresorski VHL protein, koji u tumorigenezi učestvuje na različite načine (preko hipoksijom inducibilnog faktora HIF1 ili direktno, onemogućavajući ulazak ćelije u G0 fazu ćelijskog ciklusa, poremećajem angiogeneze, poremećajem u ekstracelularnom matriksu ćelije, itd). Postoji nekoliko tipova VHL sindroma, a feohromocitom se javlja u tipovima 2a (feohromocitom, retinalni i CNS hemangioblastomi), 2b (feohromocitom, retinalni i CNS hemangioblastomi, karcinom bubrežnih ćelija, pankreasni tumori i ciste) i 2c (feohromocitom). (8) Oko 10 – 20% pacijenata

sa VHL sindromom razvije feohromocitom, ali ova incidencija varira u zavisnosti od vrste mutacija. Feohromocitom u VHL sindromu češće je bilateralan nego unilateralan, i javlja se ranije nego u MEN 2a pacijenata ali češće sa vannadbubrežnom prezentacijom (12%). (3, 4) Feohromocitomi u okviru MEN 2a sindroma su uglavnom adrenergijski, za razliku od VHL sindroma sa dominantno noradrenergijskim tumorom. S obzirom na to da nižu ekspresiju PNMT ovi pacijenti najčešće imaju povišen samo noradrenalin.

Neurofibromatoza tip 1 (NF1, Recklinghausen-ova bolest) je autozomno-dominantno nasledno oboljenje, koga karakterišu mrlje boje bele kafe (*cafe-au-lait* makule), neurofibromi, hamartomi irisa (Lišovi noduli). Tumor supresorski gen za NF1 se nalazi na 17q11.2 hromozomu i kodira protein neurofibromin, čija funkcija još uvek nije sasvim poznata (najverovatnije Ras proteina). NF1 gen se sastoji od 51 exona i moguće su brojne mutacije u okviru tako velikog gena, te je njihova identifikacija teška. Kod ovih pacijenata postoji povećana incidencija nastanka nekih tumora poput feohromocitoma i juvenilne mijeloidne leukemije. Feohromocitom se javlja kod 0.1 - 5.7% pacijenata sa NF1 (9).

Za familijarni feohromocitom su karakteristične mutacije u sukcinat dehidrogenazi, subjedinici D (SDHD). Sukcinat dehidrogenaza (SDH) je mitohondrijalni enzim sastavljen od 4 subjediniče (SDHA, SDHB, SDHC i SDHD) koje zajedno formiraju mitohondrijalni kompleks II poznat kao sukcinat: ubikvion oksidoreduktaza. SDH je tako pozicioniran da jednim delom kontaktira sa matriksom mitohondrija a drugim delom preko subjediniče SDHD i SDHC je uronjen u unutrašnjost same mitohondrijalne membrane. Na taj način učestvuje u Krebsovom ciklusu i oksidativnoj fosforilaciji. SDHD je tumor supresor gen koji se sastoji od 4 egzona. S obzirom na to da je još uvek nepoznat mehanizam nastanka tumora samo se pretpostavlja da parcijalni ili kompletni gubitak enzimske funkcije dovodi do narušavanja funkcije mitohondrija i nastanka respiratorne eksplozije, procesa u kome se oslobađaju slobodni radikali. Mitohondrije ovakvo stanje prepoznaju kao hipoksiju pa dolazi do aktiviranja hipoksijom-indukovanog faktora („hypoxia-inducible factor” HIF) koji aktivira antiapoptotičke i proliferativne gene (TGF, EGF, VEGF, PDGF). Pacijenti sa feohromocitomom koji su nosioci SDHD germinativne mutacije u 75% slučajeva imaju mutaciju na 5' kraju gena u prva 2 egzona. Pacijenti sa paraganglionom imaju mutacije na 3' kraju u 3 i 4 egzonu. Kod 50% svih mutacija u SDHD genu se nalazi u prva 2 egzona i na početku 3. Poremećaj u ovom regionu dovodi do promene u signalnom peptidu (presekvenci). To onemogućava inserciju enzima u mitohondrijalnu membranu što dovodi do rastavljanja kompleksa i gubitka katalitičke aktivnosti. Ovo predstavlja predispoziciju za nastanak feohromocitoma. Mutacije u SDHD genu su po tipu: pogrešnog smisla („missense”), besmislene („nonsense”), mutacije koje dovode do promene u okviru čitanja („frameshift”) i neme mutacije („ silent”) (10).

Dijagnoza feohromocitoma se postavlja na osnovu karakteristične kliničke slike, biohemijskih parametara (kateholamini u 24 h urinu, hromogranin A), precizne vizualizacije (CT / NMR abdomena) i scintigrafije nadbubrežnih žlezda (J^{131} MIBG-metajodobenzilguanidin), a scintigrafija celog tela može da pokaže prisustvo metastaza ovog tumora.

Terapija je hirurška. Pre hirurške intervencije, neophodna je preoperativna priprema pacijenta, pri čemu se koristi fenoksibenzamin, nekompetitivni $\alpha 1$ – adrenergički antagonist produženog dejstva, u prosečnoj dozi od 40 – 80 mg/dan. Alfa – adrenergičkom blokadom se sprečava vazokonstrikcija ali i šok nakon iznenadne vazodilatacije po uklanjanju tumora. U prekidanju napada se takođe koriste α – blokeri, kojima se mogu dodati i male doze β -blokera da bi se sprečila refleksna tahikardija. β -blokada kod pacijenata sa feohromocitomom može biti opasna ukoliko prethodno nije postignuta blokada α – adrenergijskih receptora.

Zaključak

Genetski skrining pacijenata sa feohromocitomom je u razvijenom svetu obavezan i obavlja se rutinski. On obuhvata analize u RET, VHL i SDH genima, s obzirom na čestu udruženost feohromocitoma sa drugim malignitetima kao i češću pojavu bilateralne bolesti. Ove mutacije je danas moguće otkriti u genetskoj laboratoriji Instituta za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma KCS. Time je omogućena profilaktička terapija, naročito u slučaju medularnog karcinoma štitaste žlezde u sindromu MEN 2a, ali i

adekvatno praćenje i blagovremeno lečenje bolesti, s obzirom na mogućnost predviđanja kliničke slike u zavisnosti od tipa mutacije.

Kod naše pacijentkinje je utvrđena germinativna heterozigotna mutacija u 46 kodonu (GTG → GTA, V46V). Ova promena ne dovodi do aminokiselinske zamene jer oba kodona kodiraju istu aminokiselinu, valin. Pošto nema promene na nivou proteina ne može se tvrditi da je ovo patogena mutacija koja je dovela do nastanka feohromocitoma. Dalje praćenje pacijentkinje i testiranje njene porodice je neophodno u prevenciji nastanka familijarnog feohromocitoma. Skrining mutacija u SDHD genu trebalo bi da bude rutinska analiza kod svih pacijenata sa naizgled sporadičnim feohromocitomom.

Slika 1. DNK sekvenca SDHD gena: germinativna heterozigotna mutacija u 46 kodonu (GTG → GTA, V46V).

Literatura

1. Eisenhofer G, Bornstein S, Brouwers FM et al. Malignant pheochromocytoma: current status and initiatives for future progress, *Endocrine Related Cancer*, 2004.11: 423 - 436.
2. Ram, C.V. and G.A. Fierro-Carrion, Pheochromocytoma. *Semin Nephrol*, 1995. 15(2): p. 126-37.
3. Pacak, K. Linehan, M. Eisenhofer, G. et al. Recent Advances in Genetics, Diagnosis, Localisation and Treatment of Pheochromocytoma, *Annals of Internal Medicine*, 2001. 134(4): 315 - 329.
4. Koch C.A., Vortmeyer A.O. Huang S.C et al. Genetic aspects of pheochromocytoma, *Endocrine Regulations*, 2001. 35: 43 – 52.
5. Bryant J, Farmer j, Kessler L.j. et al. Pheochromocytoma: The expanding Genetic Differential Diagnosis, *Journal of the National Cancer Institute*, 2003. 95(16): 1196 – 1203.
6. Inabnet WB, Caragliano P, Pertsemlidis D. Pheochromocytoma: Inherited associations, unilaterality and cortex preservation. *Surgery* 2000; 128:1007 – 1011.
7. Modigliani E, Vasen HM, Raue K et al. Pheochromocytoma in Multiple Endocrine Neoplasia type 2a: European study. The Euromen Study Group. *Journal of Internal Medicine* 1995. 238: 363 - 367.
8. Lonser R.R. Glenn G.M. Walther Mc. et al. von Hippel – Lindau disease, *The Lancet*, 2003. 361: 2059 – 2067.
9. Walther MM, Herring J, Enquist E et al. Von Recklinghausen's disease and pheochromocytomas. *J Urol* 1999; 162: 1582 - 1586.
10. Astuti D, Hart-Holden N, Latif F et al. Genetic analysis of mitochondrial complex II subunits SDHD, SDHB and SDHC in paraganglioma and pheochromocytoma susceptibility, *Clinical Endocrinology*, 2003; 59:728 - 733.

Dr Tatjana Isailović, Institut za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma KCS; Centar za endokrine tumore i nasledne kancerske sindrome; Dr Subotica 13, Beograd, e-mail: taya@beotel.yu