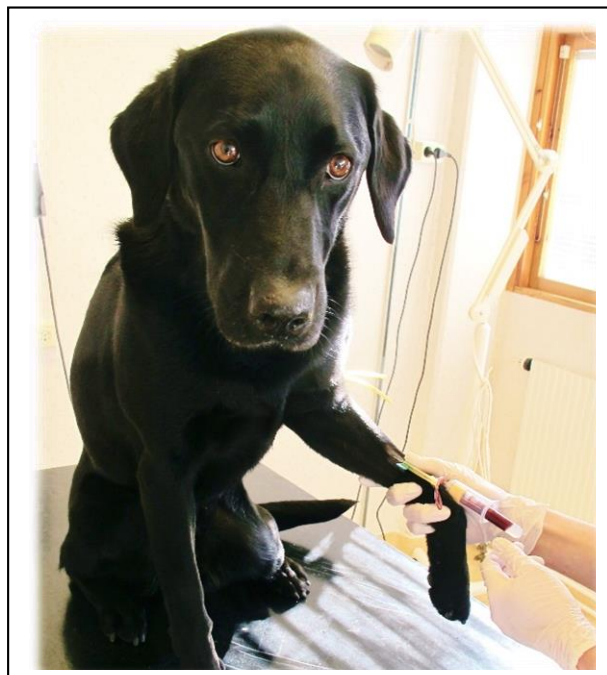




Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

# Chromogranin A – potential som prognostisk biomarkör hos hund

*Ellinor Ahlund*



---

Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2014: 22

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2014

---





Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

## **Chromogranin A – potential som prognostisk biomarkör hos hund**

Chromogranin A – potential as a prognostic biomarker in dogs

*Ellinor Ahlund*

**Handledare:**

Katja Höglund, SLU, Institutionen för anatomi och fysiologi  
Kristina Dahlborn, SLU, Institutionen för anatomi och fysiologi

**Examinator:**

Eva Tydén, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Omfattning:** 15 hp

**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin

**Kurskod:** EX0700

**Program:** Veterinärprogrammet

**Nivå:** Grund, G2E

**Utgivningsort:** SLU Uppsala

**Utgivningsår:** 2014

**Omslagsbild:** Maria Lyberg

**Serienamn, delnr:** Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2014: 22  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

**On-line publicering:** <http://epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** Chromogranin A, prognostisk biomarkör, sympatiska nervsystemet, hund, neuroendokrin neoplasia, hjärtsjukdom, stress

**Key words:** Chromogranin A, prognostic biomarker, sympathetic nervous system, dog, neuroendocrine neoplasia, heart disease, stress



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning .....	1
Summary .....	2
Inledning.....	3
Material och metoder.....	3
Litteraturoversikt.....	4
Graniner.....	4
Allmänt om Chromogranin A .....	4
Biomarkörer .....	5
Vad utgör en bra biomarkör?.....	5
Sympatiska nervsystemet .....	6
Chromogranin A vid sympatikuspåslag .....	6
Mätning av Chromogranin A i blod och saliv .....	7
Stabilitet .....	8
Variation under dygnet.....	8
Fysisk träning .....	8
Korrelation mellan blod och saliv .....	9
Chromogranin A som prognostisk markör vid olika tillstånd.....	9
Neuroendokrina neoplasier.....	9
Svårt sjuka patienter .....	9
Hjärt-kärlsjukdom .....	10
Diskussion .....	11
Chromogranin A som biomarkör .....	11
Chromogranin A – biomarkör för sympatikuspåslag?.....	11
Chromogranin A – potential som prognostisk biomarkör.....	12
Chromogranin A – potential som prognostisk biomarkör hos hund .....	13
Slutsats .....	13
Referenslista .....	14



## **SAMMANFATTNING**

För att få fram en prognos när ett djur uppsöker vård finns det idag olika metoder. Inga är dock perfekta och därför forskas det på biomarkörer som ska kunna berätta mer om en individs allmäntillstånd. En biomarkör ska objektivt fungera som en indikator för normala biologiska processer, patogena processer eller farmakologiska responser efter en terapeutisk åtgärd. Chromogranin A (CgA) är en molekyl vars egenskaper och funktion undersökts mycket, bland annat dess potential som biomarkör vid olika tillstånd. Få djurstudier finns men humanstudier demonstrerar att CgA-koncentrationer exempelvis ökar vid olika sjukdomstillstånd; såsom hjärtsjukdomar, brännskador och hos patienter med neuroendokrina tumörer. Vidare ses förhöjda koncentrationer även vid andra tillstånd; såsom högintensiv träning och psykologisk stress. Syftet med denna litteraturstudie är därför att undersöka CgA:s egenskaper och funktion. Det ska även utredas vid vilka situationer CgA-koncentrationer ökar och vad detta kan indikera. Har CgA potential som en prognostisk biomarkör och gäller det i så fall även hos hund?

Chromogranin A upptäcktes år 1967 och ingår i familjen Graniner som är en grupp sura, lösliga och sekretoriska proteiner. CgA finns i neuroendokrina celler i hela kroppen varifrån den frisätts genom exocytos tillsammans med respektive vävnads hormon/er eller verksamma substanser. Detta gäller även för hund och hos dem har man, som hos människa, även funnit att neuroendokrina tumörer innehåller CgA.

Chromogranin A frisätts bland annat från sympatiska nervändar och chromaffinceller i binjuremärget tillsammans med adrenalin och noradrenalin. Dessa är transmittorsubstanser i sympatiska nervsystemet (SNS) som aktiveras vid så kallade "fright-fight-flight-situationer". I flera studier ses förhöjda CgA-koncentrationer i takt med ökad sympatikusaktivitet, som vid hjärtstillestånd, hypoglykemi (även hund) eller psykologisk stress, vilket tyder på att CgA kan fungera som ett mått på sympatisk aktivitet. Denna koncentrationsökning är även något som kan påverka resultaten vid mätning av CgA-koncentrationer vid andra tillstånd. Hos patienter med neuroendokrina tumörer ses även allmänt förhöjda CgA-koncentrationer. Dessutom har förhöjda koncentrationer Chromogranin A visats kunna ge en prognos angående tumörstorlek samt om metastasering skett hos patienter med neuroendokrina tumörer. Utöver detta har CgA även kopplats samman med mortalitet och sämre prognos hos hjärtsjuka samt allvarligt sjuka patienter.

Hos människa verkar alltså CgA besitta många av de egenskaper som definierar en biomarkör och har dessutom uppvisat potential som en prognostisk sådan vid olika tillstånd. Molekylen är dessutom stabil och kan mätas i blod eller saliv hos både människa och hund. Det finns även studier som talar för att hundars CgA på flera sätt liknar människans. Men trots de många humanstudier som talar för CgA:s potential som prognostisk biomarkör kan inga paralleller dras till hund. För detta krävs mer forskning och därmed klara bevis avseende just denna art. För att ha klinisk betydelse är det även viktigt att utreda huruvida CgA tillför något mer än de idag vedertagna prognostiska hjälpmedlen.

## SUMMARY

Today there are several possible methods to rapidly assess a prognosis when an animal is ill. However, none of these methods are perfect which is why scientists are constantly looking for biomarkers capable of telling us more about an individual's general condition. A biomarker should objectively work as an indicator for normal biological processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a therapeutic intervention. Chromogranin A is a molecule whose properties and functions has been investigated extensively, for example its potential as a biomarker. There are few animal studies done, however, human studies has shown that CgA-concentrations increase at several medical conditions; e.g. heart diseases, burn injuries and patients with neuroendocrine tumours. Moreover, CgA is elevated in other situations as well; for example high-intensity exercise and psychological stress. Therefore, the purpose of this study is to investigate CgA:s properties and function. Moreover, to analyse in which situations CgA is elevated and what this could indicate. Does CgA have the potential of a prognostic biomarker and, in that case, does this also apply for dogs?

Chromogranin A was found in 1967 and is a member of the Granin family, a group of acidic, soluble secretory proteins. CgA is distributed in neuroendocrine cells from which it is secreted by exocytosis together with hormones of that tissue. The same is true for dogs and studies has shown that neuroendocrine tumours of dogs, as in humans, contain CgA.

For instance, CgA is released from sympathetic nerve endings and chromaffin cells in the adrenal medulla along with epinephrine and norepinephrine. These are transmitter substances in the sympathetic nervous system (SNS) which is activated in so-called "fright-fight-flight-situations". In several studies CgA-concentrations are elevated along with increased sympathetic activity; e.g. in cardiac arrest, hypoglycemia or psychological stress, which suggests that CgA could be an indicator of sympathetic activity. Something to consider about this increase is that it could interfere with the results when measuring CgA for other reasons. In patients with neuroendocrine neoplasia CgA is also elevated in general. Furthermore, elevated concentrations of CgA has been able to give a prognosis regarding tumour size and if metastasis occur in patients with neuroendocrine tumours. Moreover, CgA have been associated with mortality and poor prognosis in patients with heart diseases and severely ill patients.

In humans CgA seems to possess many features defining a biomarker and has also presented potential as a prognostic biomarker in several situations. This molecule is stable and measurable in blood or saliva in both humans and dogs. There are also studies demonstrating several similarities between human and canine CgA. However, even though CgA has a potential as a prognostic biomarker in humans, this cannot yet be said for dogs. More research and consequently evidence considering dogs and their CgA are required first. Another important question to be answered is whether CgA contributes to something more than the traditional prognostic methods already do.



## **INLEDNING**

För att försöka analysera aktuell status när ett djur uppsöker vård tar vi idag till olika metoder som alla innefattar mer eller mindre omfattande och invasiva undersökningar. Det finns ett stort behov av att i tidigt skede få fram en tillförlitlig prognos för att korrekt prioritera, bedöma och därmed ta till rätt behandling i tid. Många gånger kan detta dock vara svårt och inga perfekta metoder finns. Därför forskas det idag på olika biomarkörer som ska kunna berätta mer om en individs allmäntillstånd, bland annat skilja sjuka från friska och kanske tidigt kunna ge oss en första prognos utan att vi utsätter djuret för onödigt stress eller lidande.

Chromogranin A (CgA) upptäcktes år 1967 och har sedan dess studerats för att försöka klargöra dess egenskaper och huvudsakliga funktion i kroppen (Winkler & Fischer-Colbrie, 1992). Idag finns få studier gjorda på djur men humanstudier visar att CgA-koncentrationer i kroppen kan öka och minska kraftigt vid en rad olika tillstånd. Exempelvis ökar koncentrationerna hos patienter med neuroendokrina tumörer (Campana et al., 2007; O'Connor & Bernstein, 1984), allvarliga brännskador (Lindahl et al., 2013), hjärtsjukdomar (Ceconi et al., 2002; Jansson et al., 2009) och vid högintensiv träning (Røsjø et al., 2013; Takiyuddin et al., 1990). Syftet med denna studie är därför att undersöka CgA:s egenskaper och funktion i kroppen med målet att analysera dess lämplighet som biomarkör. Det ska även utredas vid vilka situationer CgA-koncentrationerna ökar och vad kan detta indikera? Kan CgA fungera som en prognostisk markör hos människa och, i så fall, kan paralleller dras till hund och anta att detsamma gäller för dem?

## **MATERIAL OCH METODER**

De databaser som användes för att söka olika vetenskapliga artiklar var i huvudsak Sciencedirect, PubMed och Google Scholar. Först gjordes en mer övergripande sökning för att få en uppfattning om Chromogranin A som molekyl, därefter söktes artiklar där CgA var inblandad i olika sjukdomstillstånd. De sökord som användes var exempelvis "Chromogranin A", "dog", "canine", "role", "marker", "disease" och "function" i olika kombinationer. Det som hittades var mestadels humanmedicinska artiklar då få studier finns gjorda på djur. Därför har många humanstudier använts, vilka kompletterats med studier på hund då sådana fanns för att få en uppfattning om eventuella likheter. Då det var svårt att hitta rätt typ artiklar genom sökning på olika databaser användes till stor del referenser, samt referenser till referenserna, till de få funna artiklarna. Därigenom kunde fler och lämpligare artiklar hittas vilka behandlade mer specifika ämnen.

Det fanns äldre och yngre artiklar som ibland sa emot varandra och då användes alltid de yngre eftersom dessa bör innehålla mer uppdaterad information från exempelvis nyttillkommen forskning. Det märktes även att de äldre artiklarna sällan hade en lika fullständig bild och spekulerade mer. Dessutom fanns en uppsjö av olika inriktningar och frågeställningar vad gäller CgA och även dess nedbrytningsprodukter som skulle varit intressanta att ta med. Men eftersom det inte är möjligt har arbetet hela tiden begränsats till dess frågeställning, med ett försök att inte sticka iväg för mycket åt något håll utan relevans till denna.

## LITTERATURÖVERSIKT

Då det finns lite forskning gjord på djur är den mesta informationen tagen ur studier gjorda på människor. Om inget annat nämns refererar därför texten nedan till humanstudier.

### Graniner

År 1967 bestämde man att de lösliga proteiner som hittats i bovina chromaffinceller från binjuremärgen skulle kallas för graniner (Winkler & Fischer-Colbrie, 1992), vilka är en grupp sura, lösliga och sekretoriska proteiner. Dessa finns belägna i membranavgränsade granula i neuron och neuroendokrina celler genom hela kroppen och lagras där tillsammans med andra molekyler såsom peptidhormoner, biogena aminer och neurotransmittorer (Taupenot et al., 2003).

Graninerna delades senare upp i tre klassiska grupper; Chromogranin A som också först isolerades från binjuremärgens chromaffinceller, Chromogranin B som först upptäcktes i en cellinje råttor med pheochromocytom (tumör i binjuremärgen) och till sist Sekretogranin II (som ibland går under namnet Chromogranin C) som först hittades i hypofysens främre lob. Det finns även fyra andra medlemmar i denna familj vilka tillkom lite senare och kallas sekretogranin III, IV, V och VI (Taupenot et al., 2003).

### Allmänt om Chromogranin A

Namnet Chromogranin A (CgA) myntades samma år som graninerna, år 1967, då man upptäckte att CgA var deras huvudsakliga komponent (Winkler & Fischer-Colbrie, 1992). Proteinet väger 68 kDa hos hund (Akiyoshi et al., 2005), vilket är ganska likt den humana molekyllvikten för CgA, som varierar lite beroende på hur den mäts (Taupenot et al., 2003). Dessutom överensstämmer hundars CgA i de 12 första aminosyrasekvenserna med 83,3 % med det humana (Akiyoshi et al., 2005).

Chromogranin A upptäcktes som sagt i bovina chromaffinceller men hittades även i sympatiska nervändar och i hjärnstammen där det är rikt med sympatiska nerver. Senare fann man dock att CgA finns vitt spridd i olika stor mängd i neuroendokrina vävnader i hela kroppen, såsom hypofysen, parathyroidea och pankreas, även om den största mängden finns samlad i binjuremärgen (Winkler & Fischer-Colbrie, 1992). Utöver detta förekommer CgA i neuroendokrina tumörer (Taupenot et al., 2003) och förhöjda koncentrationer kan då ses i plasma (Campana et al., 2007; Nobels et al., 1997; O'Connor & Deftos, 1987; Paik et al., 2013)

Frisättning av CgA från de olika neuroendokrina cellerna sker via exocytos tillsammans med respektive hormon från vävnaden. CgA frisätts exempelvis från parathyroidea tillsammans med parathormon och från pankreas tillsammans med insulin och efter sekretionen når proteinet sedan blodet via kapillärer eller lymfsystemet (Winkler & Fischer-Colbrie, 1992).

Trots att CgA:s funktion inte är helt känd vet man att chromograniner, och därmed CgA, även kan fungera som proproteiner. Detta innebär att CgA processas av endogena proteaser och det bildas därmed olika nedbrytningsprodukter som i sin tur kan ha olika funktioner. Exempelvis pancreastatin som höjer blodets glukoshalt genom att inhibera glukosstimulerad insulinfrisättning från pankreas, eller catestatin som inhiberar frisättning av katecholaminer genom att blockera nikotinreceptorerna som annars triggar sekretion. (Winkler & Fischer-Colbrie, 1992).

Hos hundar upptäcktes i en studie att CgA, även hos denna art, finns i flera olika neuroendokrina vävnader som har en katecholamin- eller peptidhormonproduktion. Man fann även att CgA förekommer i neuroendokrina tumörer och de som innehöll mest var pheochromocytom (tumör i binjuremärgen) och chemodectom (tumör som utgår från kemoreceptorceller i exempelvis arteria carotis). Mängden lagrat CgA skilde sig också hos hund mellan olika vävnader, vilket kan avspegla vävnadens benägenhet att bilda CgA (Doss et al., 1998).

I flertalet studier ses även att CgA:s koncentrationer i blod och saliv kan variera mellan en rad olika tillstånd och situationer och därför finns ett intresse att undersöka dess potential som biomarkör. (Cryer et al., 1991; Jansson et al., 2009; Paik et al., 2013; Røsjø et al., 2013, 2012; Takatsuji et al., 2008; Takiyuddin et al., 1990; Zhang et al., 2008).

## **Biomarkörer**

### ***Vad utgör en bra biomarkör?***

Definitionen enligt Atkinson et al. (2001) för en biomarkör är: ”En egenskap eller ett kännetecken som mäts och bedöms objektivt som en indikator för normala biologiska processer, patogena processer, eller farmakologiska responser efter en terapeutisk åtgärd”. Det finns många användbara egenskaper hos biomarkörer, dessa innefattar bland annat förmågan att:

- Fungera som ett diagnostiskt redskap för att identifiera de patienter med sjukdom eller avvikande hälsa, exempelvis glukos som är förhöjd i blodet hos diabetespatienter.
- Fungera som ett redskap för att hitta sjukdom men även för att utvärdera sjukdomens utbredning och svårighetsgrad, exempelvis vid cancer för att få en uppfattning om tumörens omfattning och eventuell metastasering.
- Fungera som prognostisk indikator vid sjukdom, exempelvis genom anatomisk mätning av tumörer.
- Fungera genom att förutsäga och övervaka de kliniska responserna vid en intervention, exempelvis genom att mäta koncentrationer av kolesterol för att bestämma risk för hjärtsjukdom.

Biomarkörer kan alltså ha ett eller flera olika syften men vitsen är i stora drag att fungera som analytiska redskap genom att bedöma biologiska parametrar, så att risker och fördelar kan värderas. Terapeutiska åtgärder av olika slag kan t ex utvärderas genom att utföra kliniska försök. Vidare kan biomarkörer även hjälpa till vid exempelvis bedömning av terapeutiska strategier samt läkemedelsutveckling.

## **Sympatiska nervsystemet**

Det sympatiska nervsystemet (SNS) är en del av det autonoma nervsystemet som kontrolleras omedvetet. Det består dels av alla sympatiska nerver (Sjaastad et al., 2010) men även av binjuremärgens chromaffinceller som både kan fungera som ett ganglion och som en endokrin körtel (Levy et al., 2005). Medan nerverna går till olika målorgan, med noradrenalin som transmittorsubstans, fungerar cellerna i binjuren som modifierade postganglionära sympatiska neuron utan axoner. Dessa innerveras av sympatiska nerver och frisätter adrenalin och noradrenalin direkt till blodet som sedan har hormonell verkan i hela kroppen (Levy et al., 2005; Sjaastad et al., 2010).

Man brukar tala om att SNS är aktiverat vid så kallade ”fright-fight-flight-situationer” då kroppen blir redo för en nödsituation, till exempel när djuret måste slåss, fly eller vid akut stress. Detta medför att de sympatiska nerverna stimulerar vissa organ samtidigt som andra inhiberas, exempelvis stimuleras hjärtat och luftvägarna vidgas parallellt med att tarmarnas aktivitet minskar. Djurets medvetenhet och fokus ökar i takt med att energi snabbt mobiliseras och glukoshalten i blodet ökar. I och med binjurens aktivitet och frisättning av hormoner med samma effekt fås även en mer spridd verkan i kroppen (Sjaastad et al., 2010). Adrenalin kommer som tidigare nämnts från binjuremärgen medan noradrenalin kan ha sitt ursprung från sympatiska postganglionära neuroner, binjuremärgen eller både och (Cryer et al., 1991). Binjuremärgen innehåller störst mängd CgA och i ett in vitro-försök visades att den innehöll 97 gånger mer CgA än sympatiska nerver (Takiyyuddin et al., 1990). CgA frisätts från chromaffinceller och sympatiska nervändar tillsammans med dessa katecholaminer efter stimulering av SNS, exempelvis via acetylcholins bindning till nikotinreceptorer på sympatiska nerver (Taupenot et al., 2003) eller genom stimulering av binjuren vid bland annat hypoglykemi (Takiyyuddin et al., 1990).

Aktiviteten hos SNS kan uppskattas genom mätningar av exempelvis adrenalin och noradrenalin i blodet (Cryer et al., 1991). Dessa katecholaminer tas dock snabbt upp från extracellulära miljöer och blodet genom upptag till presynaptiska neuron och binjurens chromaffinceller, eller genom katabolism. CgA däremot, förblir intakt i cirkulationen mycket längre än både adrenalin och noradrenalin (Akiyoshi et al., 2005; Kanno et al., 1999; Nakane et al., 1998) och skulle därför kunna fungera bättre som ett mått på sympatisk aktivitet (Cryer et al., 1991) vid exempelvis akut stress (Takiyyuddin et al., 1990; Akiyoshi et al., 2005; Kanno et al., 1999). CgA är dessutom det huvudsakliga protein som frisätts tillsammans med adrenalin och noradrenalin och CgA-koncentrationer korrelerar därmed med dessa katecholaminer i situationer då SNS är aktiverat (Takiyyuddin et al., 1990; Cryer et al., 1991; Dimsdale et al., 1992).

### ***Chromogranin A vid sympatikuspåslag***

Det finns ett flertal studier gjorda där man ser hur CgA-koncentrationer ökar parallellt med ökad aktivitet i SNS (Cryer et al., 1991; Dimsdale et al., 1992; Kanno et al., 1999; O'Connor & Bernstein, 1984), exempelvis frisätts CgA vid högintensiv träning (Røsjø et al., 2013; Takiyyuddin

et al., 1990). Ett starkt samband visades även mellan koncentrationer av CgA och noradrenalin vid hjärtstillestånd (alltså kraftig sympatikusaktivering) men att CgA dock inte är en lämplig markör under fysiologiska förhållanden (Cryer et al., 1991). Detta bevisas även i studien utförd av Takiyyuddin et al. (1990), då högintensiv träning och hypoglykemi orsakad av insulininjektion påverkade CgA-koncentrationerna men däremot inte lågintensiv träning. Ytterligare visades att kroppspositionen påverkar frisättningen av adrenalin och noradrenalin men inte av CgA. När personer som legat på rygg i 30 minuter sedan ställde sig upp steg nämligen koncentrationerna av katecholaminerna i blodet samtidigt som CgA-koncentrationerna var oförändrade.

Även hos hund sker en ökning av CgA-koncentrationen vid insulininducerad hypoglykemi och dessa korrelerar med de förhöjda koncentrationerna av adrenalin och noradrenalin, även lång tid efter insulinadministrering. Katecholaminerna kataboliserades dock snabbare medan CgA-koncentrationer var förhöjda under en längre tid i cirkulationen. Adrenalinkoncentrationerna var nämligen förhöjda från 20-60 minuter efter insulingiva, noradrenalinkoncentrationerna från 30-40 minuter efter givan samtidigt som CgA-koncentrationerna var signifikant förhöjda från 30-120 minuter efter givan (Akiyoshi et al., 2005).

### *Psykologisk stress*

Akademiska examinationer anses vara en av de mest akut stressande situationerna hos studenter. I en studie där 15 friska kvinnliga studenter undersöktes upptäcktes att CgA-koncentrationerna i saliv höjdes signifikant efter en tentamen jämfört med innan. Detta på grund av att CgA kan vara en indikator på stress (Takatsuji et al., 2008). Liknande resultat ses även vid exempelvis muntlig presentation och bilkörning på motorvägen där CgA-koncentrationerna också steg (Nakane et al., 1998). Även i en annan studie, där 20 män utsattes för ljud med 90 dB under 15 minuter syntes en signifikant höjning av CgA-koncentrationerna i saliv under dessa minuter medan de sedan sjönk efteråt (Miyakawa et al., 2006).

### **Mätning av Chromogranin A i blod och saliv**

Mätningar av CgA-koncentrationer kan göras i både saliv och blod och två vanliga mätmetoder som används är så kallad RIA (radioimmunoassay) och ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), där flera olika strategier har utvecklats (Taupenot et al., 2003).

Båda dessa är känsliga in vitro-metoder där man mäter koncentrationen antigen (CgA) med hjälp av antikroppar som binder in till dessa. Vid en ELISA är enzymer kopplade till antikropparna som binder antigen. När ett specifikt substrat sedan tillsätts sker en synbar förändring (t ex en färgskiftning) som indikerar kvantiteten antigen (t ex CgA) i provet. En RIA fungerar ungefär på samma sätt men istället för ett enzym som ger en förändring används radioaktiva molekyler, som exempelvis jod, för att kunna detektera mängden bundet antigen.

### **Stabilitet**

Chromogranin A är en stabil molekyl som därför inte är så ömtålig vid hantering av prover. Dess immunoreaktivitet påverkas varken av att frysas ned och tinas upp flera gånger eller av en förlängd inkubation i 37 grader. Det bevisades att varken inkubering i 25°C eller preinkubering i 37°C i två timmar påverkade CgA-koncentrationerna jämfört med inkubering i 4°C (O'Connor & Frigon, 1984). Halveringstiden för CgA är dessutom 18,4 minuter (O'Connor & Bernstein, 1984) och proteinet kommer därför förbli intakt i cirkulationen en längre tid jämfört med t.ex. noradrenalin som har en halveringstid på  $2\pm 0,4$  minuter (Esler et al., 1981). Samtidigt finns dock flera olika faktorer som kan påverka uppmätta värden.

### **Variation under dygnet**

En viktig fråga är huruvida CgA-koncentrationer förändras under dagen och idag finns studier gjorda på hund avseende både blod- och saliv. I olika försök på beaglar har det visat sig att det inte finns någon signifikant skillnad i CgA-koncentrationer varken i blod eller saliv under dygnet (Akiyoshi et al., 2005; Kanai et al., 2008).

Hos människa har dock skillnader under dagen setts. I en studie på 40 manliga studenter med blod- och salivprovtagning mellan kl. 07:00-22:30 sågs att de högsta koncentrationerna i *saliv* förelåg sent på kvällen och på morgonen när personerna precis hade vaknat, för att sedan sjunka en timme senare. Koncentrationerna förblev låga under hela dagen för att sedan stiga igen till kvällen. I samma studie syntes dock inga signifikanta koncentrationsskillnader av CgA i plasma under dygnet (Den et al., 2007). Däremot såg Takiyyuddin et al. (1991) i sin studie variationer i CgA-koncentrationer i plasma när provtagning skedde var tionde minut under en åttatimmarsperiod (kl. 09:00-17:00). Samtidigt visade dock inte studien några signifikanta skillnader i CgA-koncentrationer då provtagning skedde var tredje timme under ett dygn. Utöver detta syntes inte heller någon skillnad i koncentrationer mellan olika dagar.

### **Fysisk träning**

Vad gäller fysisk träning är resultaten lite varierande avseende hur kort- respektive långvarig och hög- respektive lågintensiv träning påverkar CgA-koncentrationer. I en studie såg man att CgA-koncentrationerna steg lite, men inte signifikant, i både blod och saliv av högintensiv cykling under kort tid (Nakane et al., 1998). I en annan studie såg dock Takiyyuddin et al. (1990) att högintensiv dynamisk träning under kort tid visst orsakade en signifikant, om än liten, ökning av CgA-koncentrationerna. I samma studie upptäcktes även att lågintensiv dynamisk träning under lång tid inte påverkade CgA-koncentrationerna alls.

Ytterligare en studie visade inga signifikanta skillnader i CgA-koncentrationer efter kort intensiv träning. Vid lång intensiv träning under sju dagar steg dock CgA-koncentrationerna successivt och var dag sju signifikant förhöjda (Røsjø et al., 2013).

### ***Korrelation mellan blod och saliv***

Det finns även studier där korrelationen mellan CgA-koncentrationer i blod och saliv studeras, dock med skiftande resultat. Dag et al. (2010) såg nämligen en positiv korrelation mellan blod- och salivkoncentrationer medan Den et al. (2007) inte alls kunde se någon korrelation mellan dessa koncentrationer. Några liknande studier finns inte gjorda på hund ännu.

### **Chromogranin A som prognostisk markör vid olika tillstånd**

#### ***Neuroendokrina neoplasier***

I en studie utförd av (O'Connor & Bernstein, 1984) upptäcktes att alla inkluderade patienter (11 stycken) med pheochromocytom hade förhöjda plasmakoncentrationer av CgA jämfört med de 18 friska kontrollerna. Campana et al. (2007) såg även i sin studie att patienter med neuroendokrina tumörer, men även de med kronisk atrofisk gastrit, hade onormalt och signifikant förhöjda plasmakoncentrationer av CgA. Mellan individerna med neuroendokrin tumör och de med kronisk atrofisk gastrit fanns dock ingen signifikant skillnad i CgA-koncentrationer. Om man dock exkluderade de personer med neuroendokrin tumör, som vid provtagningsstillfället var symptomfria, syntes dock en sådan skillnad och de med neuroendokrin tumör, och därmed sannolikt sämre prognos, hade signifikant högre koncentrationer än de med kronisk atrofisk gastrit. Om det dessutom hade skett metastasering hos de med neuroendokrin tumör hade de högre koncentration av CgA än de utan metastasering. På samma sätt såg Paik et al. (2013) i en annan studie att personer med neuroendokrina tumörer i pankreas hade en signifikant högre koncentration CgA om metastaser fanns, vilket är prognostiskt dåligt.

Campana et al. (2007) upptäckte även att beroende på var tumören fanns belägen i kroppen fanns signifikanta skillnader i CgA-koncentrationer. Till exempel visades att tumörer belägna i lungorna gav de lägsta koncentrationerna i blod medan patienter med Zollinger-Ellison syndrome (ZES), tumör i pankreas, hade de högsta koncentrationerna. Däremot kunde ingen signifikant skillnad ses i CgA-koncentrationer mellan tumörer i magsäck, pankreas och tunntarm.

Nobels et al. (1997) visade i en annan studie en signifikant positiv korrelation mellan CgA-koncentrationer och tumörers massa. En signifikant korrelation mellan CgA-koncentrationer och tumörstorleken har även setts i en annan studie på pheochromocytom av O'Connor och Deftos (1987) som då även noterade allmänt höga koncentrationer av CgA vid karcinoida tumörer.

#### ***Svårt sjuka patienter***

Hos allvarligt sjuka patienter har man i ett flertal studier noterat att CgA fungerar bra som prognostisk markör. I en studie med 232 deltagande personer som utvecklat allvarlig sepsis togs blodprover dels då studien startade men även efter 72 timmar för att bland annat studera CgA-koncentrationer. Resultatet visade då att de med högst CgA-värde vid båda provtillfällena hade både sämre prognos och högre mortalitet. Det syntes dock ingen skillnad i CgA-ökning under studietiden mellan de som överlevde jämfört med de som avled. De med högst koncentrationer vid

studiens start hade även en högre risk att dö på sjukhuset och de 135 personer som fick septisk chock hade högre koncentrationer CgA vid starten av studien (Røsjø et al., 2012).

Ännu en studie har pekat på att högre CgA-koncentrationer i blod kan associeras med mortalitet och fungera som en tidig prognostisk markör hos allvarligt sjuka patienter (Zhang et al., 2008). I studien ingick 120 personer med allvarliga sjukdomstillstånd, bland annat septisk chock och hjärtstillestånd. Då de kom till sjukhuset togs genast blodprover och patienterna följdes sedan upp under tre månader för att studera mortaliteten. Det visade sig då att de som inte överlevde under uppföljningstiden (tre månader) var de som vid provtagningen hade signifikant högre CgA-koncentrationer och att dessa koncentrationer även var omvänt relaterade till överlevnadstiden.

I en annan studie gjord på 51 patienter med minst tioprocentiga brännskador såg man att plasmakoncentrationerna av CgA skilde sig. Den tredjedel patienter med högst CgA-koncentrationer och störst variation var de som var äldre, hade mest utbredda skador, opererades flest gånger under de första sju dagarna och hade sämre organfunktion dag sju. Även om ingen korrelation mellan CgA och brännskadornas storlek kunde påvisas upptäcktes att det istället fanns en korrelation mellan CgA och skadornas utsträckning på djupet - det vill säga desto djupare brännskada ju högre CgA-koncentration. Utöver detta kunde man se att plasmakoncentrationerna av CgA bättre kunde förutsäga organdysfunktion än vad den totala procentutbredningen av brännskadan kunde göra (Lindahl et al., 2013).

### **Hjärt-kärlsjukdom**

I en studie med 1268 patienter utförd av Jansson et al. (2009) upptäcktes att dödligheten kunde förutses hos patienter med akut kranskärlssyndrom. Detta genom att, inom ett dygn efter ankomst till sjukhuset, mäta CgA-koncentrationer i blodet vilken visade sig vara en oberoende prediktor för mortalitet. I uppföljningen av studien, efter korrigering för konventionella riskfaktorer, kunde även CgA associeras med sjukhusvistelse på grund av hjärtsvikt. Dessutom upptäcktes att patienter med höga koncentrationer av både CgA och pro-BNP (pro-B-type natriuretic peptide), en molekyl som frisätts från myokardiet vid volymsöverbelastning (Hall, 2004), kunde associeras med en särskilt dålig prognos.

Även Ceconi et al. (2002) kunde se ett samband mellan mortalitet och CgA-koncentrationer i sin studie där 263 individer deltog, varav 160 med kronisk hjärtsvikt. Resultatet visade att chansen för överlevnad minskade med stigande CgA-koncentration. Patienter med kronisk hjärtsvikt hade högre koncentrationer CgA än friska individer samtidigt som koncentrationerna även kunde relateras till allvarlighetsgrad. Patienter i kraftig hjärtsvikt (NYHA-klass IV), (New York Heart Association-klass IV) hade högst CgA-koncentrationer, vilka kunde mäta sig med de koncentrationer som uppmätts i andra studier hos patienter med pheochromocytom och andra neuroendokrina tumörer. Samtidigt hade asymtomatiska patienter (NYHA-klass I) signifikant lägst koncentrationer CgA.



## DISKUSSION

### Chromogranin A som biomarkör

Som kan ses fungerar CgA teoretiskt sett bra som en objektiv biomarkör i och med dess stabila natur, vilket gör den till en pålitlig och inte speciell känslig molekyl som därför klarar av hantering av prover bra (O'Connor & Frigon, 1984). CgA:s koncentrationer varierar även vid olika situationer och dessa kan lätt mätas genom ett blod- eller salivprov (Dag et al., 2010). Hos djur är det viktigt med en icke stressfylld undersökning och eftersom både blod- och salivprov ofta är ganska snabbt genomförda kan detta vara att föredra istället för flera och kanske mer invasiva eller omfattande undersökningar. Sedan kan även diskuteras vilket av blod- och salivprov som egentligen är minst stressande.

En bra biomarkör bör dock inte variera för mycket naturligt i kroppen då det såklart försvårar mätningar och bedömning av dess koncentrationer. Hos människa verkar det finnas en viss dygnsvariation i saliv och kanske även i blod, även om det inte är helt klarlagt, vilket skulle kunna vara ett problem. Att man hittills inte sett några signifikanta dygnsvariationer i varken saliv eller blod hos hundar (Akiyoshi et al., 2005; Kanai et al., 2008) talar därför positivt för CgA som biomarkör hos hund, i just detta avseende. Då detta grundar sig på endast två studier bör dock fler utföras innan något kan slås fast med säkerhet.

### Chromogranin A – biomarkör för sympatikuspåslag?

Enligt genomgångna studier finns det mycket som talar för att CgA skulle kunna användas som en markör för sympatikuspåslag. Detta eftersom CgA frisätts tillsammans och korrelerar med adrenalin och noradrenalin i både blod och saliv då SNS är aktiverat (Cryer et al., 1991; Dimsdale et al., 1992; Takiyyuddin et al., 1990). Detta verkar även gälla för hund vid åtminstone en av situationerna, nämligen hypoglykemi (Akiyoshi et al., 2005), men utöver detta har inga studier liknande de på humansidan gjorts. Att CgA dessutom har en längre halveringstid än noradrenalin (Esler et al., 1981; O'Connor & Bernstein, 1984) och inte bryts ner eller tas upp lika snabbt från cirkulationen som katecholaminerna (Kanno et al., 1999) gör även att CgA skulle kunna vara en lämpligare markör för sympatikuspåslag än dessa.

Men det som resultaten från dessa studier dock även visar är att CgA-koncentrationerna korrelerar med adrenalin och/eller noradrenalin endast när sympatikus är *kraftigt* aktiverat, exempelvis vid högintensiv träning, hjärtstillestånd eller hypoglykemi (Cryer et al., 1991; Røsjø et al., 2013; Takiyyuddin et al., 1990). CgA korrelerar inte med dessa koncentrationer vid exempelvis lågintensiv träning eller genom att ställa sig upp efter att ha legat på rygg i 30 minuter (Takiyyuddin et al., 1990). I och med detta kan man dra slutsatsen att CgA skulle fungera som en bra markör för sympatikuspåslag men endast när SNS är kraftigt aktiverat. När det inte är det, vid fysiologiska förhållanden, verkar inte CgA vara användbar. Troligen för att det då även är andra faktorer som spelar in och reglerar CgA:s koncentrationer i kroppen.

Det bör även noteras att om CgA-koncentrationer varierar med ändrad aktivitet i sympatiska nervsystemet kan detta störa resultaten när CgA mäts av någon annan orsak. Olika typer av psykologisk stress hos individer har exempelvis yttrat sig genom höga CgA-koncentrationer (Nakane et al., 1998; Takatsuji et al., 2008). Stressupplevelser är något individuellt och ska exempelvis en individs prognos bedömas utifrån CgA-koncentrationer bör man ha noga koll på detta. Om stresskänsligheten varierar väldigt mycket, vilket den kan göra hos hundar, kan nämligen två individer med samma egentliga prognos eventuellt komma att bedömas olika. Detta bör därför undersökas vidare även hos hund för att se om de påverkas på samma sätt av bland annat stress. De kan ju ibland reagera annorlunda och vara stressade vid förhållanden där inte människor är det och tvärtom. Höga ljud kunde exempelvis öka koncentrationerna av CgA hos människa (Miyakawa et al., 2006), sannolikt är så även fallet hos hund. De kan även höra andra ljud än vi, vilket resulterar i att de kan vara stressade vid förhållanden som vi inte märker av.

Viktigt att undersöka i denna fråga är dock hur mycket ett kraftigt sympatikuspåslag faktiskt påverkar CgA-koncentrationerna. Även om de är signifikant förhöjda behöver de nödvändigtvis inte ligga i närheten av de koncentrationer som uppmäts vid olika sjukdomstillstånd och behöver i så fall inte påverka resultaten speciellt mycket. Detta är dock inget som kan tas för givet innan klara bevis finns. Mer forskning krävs därför dels på humansidan, men sedan krävs även specifika hundstudier då det finns många väsentliga skillnader mellan hund och människa som skulle kunna vara av betydelse.

### **Chromogranin A – potential som prognostisk biomarkör**

En prognostisk biomarkör ska ha sådana egenskaper att den skiljer ut de individer med sjukdom och sämre prognos (Atkinson et al., 2001) så att rätt behandling snabbt kan sättas in. Det ska därför gå att upptäcka kraftiga ökning eller sänkningar i CgA-koncentrationer hos sjuka respektive friska och mer respektive mindre allvarligt sjuka individer, vilket verkar vara fallet för CgA hos människa. Bland annat finns flera studier som kopplar signifikant höga CgA-koncentrationer med mortalitet och sämre prognos, exempelvis vid allvarliga hjärtsjukdomar och hos andra svårt sjuka patienter (Ceconi et al., 2002; Jansson et al., 2009; Røsjø et al., 2012; Zhang et al., 2008). Hos patienter med allvarliga brännskador kunde bland annat sämre organfunktion samt brännskadans omfattning och utsträckning på djupet relateras till CgA-koncentrationer.

Utöver detta har CgA även visat sig kunna ge en prognos angående tumörstorlek samt om metastasering skett hos patienter med neuroendokrina tumörer (Campana et al., 2007; Ceconi et al., 2002; Nobels et al., 1997; Paik et al., 2013). Detta innebär att CgA bland annat kan användas för att övervaka dessa tumörer under behandling och se om det sker en progression eller regression av dessa, det vill säga om behandlingen fungerar. Dessutom ses att de patienter med neuroendokrin tumör verkar ha signifikant förhöjda koncentrationer CgA i blodet rent allmänt (Campana et al., 2007; O'Connor & Bernstein, 1984; O'Connor & Deftos, 1987). Att CgA-koncentrationer även ter

sig vara olika beroende på var i kroppen tumören sitter (Campana et al., 2007) är något positivt för CgA:s potential som diagnostisk markör, även om mer forskning behövs inom detta område.

Kortfattat verkar CgA alltså besitta många av de egenskaper som enligt Atkinson et al. (2001) är viktiga för en biomarkör. CgA kan nämligen, enligt ovan, identifiera de patienter med sjukdom, utvärdera en sjukdoms utbredning och övervaka de kliniska responserna vid en behandling. Dessutom kan CgA fungera som *prognostisk* markör vid olika sjukdomstillstånd.

### **Chromogranin A – potential som prognostisk biomarkör hos hund**

Trots den kunskap som finns på humansidan behöver fler studier göras för att få en uppfattning om hur och varför CgA-koncentrationer varierar vid olika tillstånd och situationer även hos hund. För även om likheter finns mellan humant och hundars CgA så behöver dess funktion inte vara identisk och därför kan ännu inga paralleller dras. Utöver det försök avseende hypoglykemi (Akiyoshi et al., 2005), skulle studier kunna göras för att se hur CgA-koncentrationer yttrar sig hos exempelvis:

- Svårt sjuka hundar
- Hundar med olika typer av neuroendokrina tumörer
- Hundar med kraftigt samt svagt sympatikuspåslag
- Hundar utsatta för mental stress

Det skulle självklart vara väldigt positivt om CgA gick att använda som en prognostisk markör även hos denna art. Detta skulle nämligen innebära att man snabbt kan ställa en första prognos, prioritera rätt och sätta in korrekt behandling så snart som möjligt innan det kanske är för sent. Djurägaren kan då även i tidigt skede ta beslut om behandling ska sättas in eller inte vilket kan undvika onödig ekonomisk belastning för dem och onödigt lidande för hunden. Ju mer ett saliv- eller blodprov kan säga oss desto mindre undersökningar krävs och desto mindre stress behöver djuren utsättas för vilket sin tur också minskar onödigt lidande. I och med detta skulle man antagligen spara både tid, energi och pengar som annars gått till mer invasiva och omfattande undersökningar för att få fram samma information, om det ens vore möjligt.

### **Slutsats**

Kort sagt kan man säga att CgA skulle kunna ha möjlighet att användas som en prognostisk biomarkör även hos hund och detta skulle då kunna vara till fördelar för både veterinärmedicinen och djuren själva. Men fortfarande krävs mer forskning liknande den som gjorts på humansidan för att säkerställa att så faktiskt är fallet, då inga slutsatser kan dras angående Chromogranin A och dess funktion hos hund innan klara bevis finns. Viktigt att poängtera är också att även om CgA har sådan potential hos hund, bör den även tillföra något mer än vad tidigare vedertagna prognostiska hjälpmedel redan gör för att få en klinisk betydelse.

## REFERENSLISTA

- Akiyoshi, H., Aoki, M., Shimada, T., Noda, K., Kumagai, D., Saleh, N., Sugii, S., Ohashi, F., (2005). Measurement of plasma chromogranin A concentrations for assessment of stress responses in dogs with insulin-induced hypoglycemia. *American Journal of Veterinary Research*, vol. 66, ss. 1830–1835.
- Atkinson, A.J., Colburn, W.A., DeGruttola, V.G., DeMets, D.L., Downing, G.J., Hoth, D.F., Oates, J.A., Peck, C.C., Schooley, R.T., Spilker, B.A., Woodcock, J., Zeger, S.L., Biomarkers Definitions Working Group, (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, vol. 69, ss. 89–95.
- Campana, D., Nori, F., Piscitelli, L., Morselli-Labate, A.M., Pezzilli, R., Corinaldesi, R., Tomassetti, P., (2007). Chromogranin A: is it a useful marker of neuroendocrine tumors? *Journal of Clinical Oncology*, vol. 25, ss. 1967–1973.
- Cecconi, C., Ferrari, R., Bachetti, T., Opasich, C., Volterrani, M., Colombo, B., Parrinello, G., Corti, A., (2002). Chromogranin A in heart failure; a novel neurohumoral factor and a predictor for mortality. *European Heart Journal*, vol. 23, ss. 967–974.
- Cryer, P.E., Wortsman, J., Shah, S.D., Nowak, R.M., Deftos, L.J., (1991). Plasma chromogranin A as a marker of sympathochromaffin activity in humans. *The American Journal of Physiology*, vol. 260, ss. E243–246.
- Dag, E., Aydin, S., Ozkan, Y., Erman, F., Dagli, A.F., Gurger, M., (2010). Alteration in chromogranin A, obestatin and total ghrelin levels of saliva and serum in epilepsy cases. *Peptides*, vol. 31, ss. 932–937.
- Den, R., Toda, M., Nagasawa, S., Kitamura, K., Morimoto, K., (2007). Circadian rhythm of human salivary chromogranin A. *Biomedical Research*, vol. 28, ss. 57–60.
- Dimsdale, J.E., O'Connor, D.T., Ziegler, M., Mills, P., (1992). Chromogranin A correlates with norepinephrine release rate. *Life Sciences*, vol. 51, ss. 519–525.
- Doss, J.C., Grone, A., Capen, C.C., Rosol, T.J., (1998). Immunohistochemical localization of chromogranin A in endocrine tissues and endocrine tumors of dogs. *Veterinary Pathology*, vol. 35, ss. 312–315.
- Esler, M., Jackman, G., Leonard, P., Skews, H., Bobik, A., Korner, P., (1981). Effect of norepinephrine uptake blockers on norepinephrine kinetics. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, vol. 29, ss. 12–20.
- Hall, C., (2004). Essential biochemistry and physiology of (NT-pro)BNP. *European Journal of Heart Failure*, vol. 6, ss. 257–260.
- Jansson, A.M., Røsjø, H., Omland, T., Caidahl, K., Flyvbjerg, A., Karlsson, T., Hartford, M., (2009). Prognostic value of circulating chromogranin A levels in acute coronary syndromes. *European Heart Journal*, vol. 30, ss. 25–32.
- Kanai, K., Hino, M., Hori, Y., Nakao, R., Hoshi, F., Itoh, N., Higuchi, S., (2008). Circadian variations in salivary chromogranin a concentrations during a 24-hour period in dogs. *Journal of Veterinary Science*, vol. 9, ss. 421–423.
- Kanno, T., Asada, N., Yanase, H., Iwanaga, T., Ozaki, T., Nishikawa, Y., Iguchi, K., Mochizuki, T., Hoshino, M., Yanaihara, N., (1999). Salivary secretion of highly concentrated chromogranin a in response to

- noradrenaline and acetylcholine in isolated and perfused rat submandibular glands. *Experimental Physiology*, vol. 84, ss. 1073–1083.
- Levy, M.N., Stanton, B.A., Koeppen, B.M., (2005). *Berne & Levy Principles Of Physiology*. 4. ed. Philadelphia, PA: Elsevier Mosby.
- Lindahl, A.E., Low, A., Stridsberg, M., Sjöberg, F., Ekselius, L., Gerdin, B., (2013). Plasma chromogranin A after severe burn trauma. *Neuropeptides*, vol. 47, ss. 207–212.
- Miyakawa, M., Matsui, T., Kishikawa, H., Murayama, R., Uchiyama, I., Itoh, T., Yoshida, T., (2006). Salivary chromogranin A as a measure of stress response to noise. *Noise & Health*, vol. 8, ss. 108–113.
- Nakane, H., Asami, O., Yamada, Y., Harada, T., Matsui, N., Kanno, T., Yanaihara, N., (1998). Salivary Chromogranin A as an index of psychosomatic stress response. *Biomedical Research*, vol. 19(6), ss. 401–406.
- Nobels, F.R., Kwekkeboom, D.J., Coopmans, W., Schoenmakers, C.H., Lindemans, J., De Herder, W.W., Krenning, E.P., Bouillon, R., Lamberts, S.W., (1997). Chromogranin A as serum marker for neuroendocrine neoplasia: comparison with neuron-specific enolase and the alpha-subunit of glycoprotein hormones. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 82, ss. 2622–2628.
- O'Connor, D.T., Bernstein, K.N., (1984). Radioimmunoassay of chromogranin A in plasma as a measure of exocytotic sympathoadrenal activity in normal subjects and patients with pheochromocytoma. *The New England Journal of Medicine*, vol. 311, ss. 764–770.
- O'Connor, D.T., Deftos, L.J., (1987). How sensitive and specific is measurement of plasma chromogranin A for the diagnosis of neuroendocrine neoplasia? *Annals of The New York Academy of Sciences*, vol. 493, ss. 379–386.
- O'Connor, D.T., Frigon, R.P., (1984). Chromogranin A, the major catecholamine storage vesicle soluble protein. Multiple size forms, subcellular storage, and regional distribution in chromaffin and nervous tissue elucidated by radioimmunoassay. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 259, ss. 3237–3247.
- Paik, W.H., Ryu, J.K., Song, B.J., Kim, J., Park, J.K., Kim, Y.-T., Yoon, Y.B., (2013). Clinical usefulness of plasma chromogranin a in pancreatic neuroendocrine neoplasm. *Journal of Korean Medical Science*, vol. 28, ss. 750–754.
- Røsjø, H., Nygård, S., Kaukonen, K.-M., Karlsson, S., Stridsberg, M., Ruokonen, E., Pettilä, V., Omland, T., (2012). Prognostic value of chromogranin A in severe sepsis: data from the FINNSEPSIS study. *Intensive Care Medicine*, vol. 38, ss. 820–829.
- Røsjø, H., Opstad, P.-K., Hoff, J.E., Godang, K., Christensen, G., Stridsberg, M., Omland, T., (2013). Effect of short- and long-term physical activities on circulating granin protein levels. *Regulatory Peptides*, vol. 185, ss. 14–19.
- Sjaastad, Ø.V., Sand, O., Hove, K., (2010). *Physiology of Domestic Animals*. 2. ed. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Takatsuji, K., Sugimoto, Y., Ishizaki, S., Ozaki, Y., Matsuyama, E., Yamaguchi, Y., (2008). The effects of examination stress on salivary cortisol, immunoglobulin A, and chromogranin A in nursing students. *Biomedical Research*, vol. 29, ss. 221–224.

- Takiyyuddin, M.A., Cervenka, J.H., Sullivan, P.A., Pandian, M.R., Parmer, R.J., Barbosa, J.A., O'Connor, D.T., (1990). Is physiologic sympathoadrenal catecholamine release exocytotic in humans? *Circulation*, vol. 81, ss. 185–195.
- Takiyyuddin, M.A., Neumann, H.P., Cervenka, J.H., Kennedy, B., Dinh, T.Q., Ziegler, M.G., Baron, A.D., O'Connor, D.T., (1991). Ultradian variations of chromogranin A in humans. *The American Journal of Physiology*, vol. 261, ss. R939–944.
- Taupenot, L., Harper, K.L., O'Connor, D.T., (2003). The Chromogranin–Secretogranin Family. *The New England Journal of Medicine*, vol. 348, ss. 1134–1149. Review.
- Winkler, H., Fischer-Colbrie, R., (1992). The chromogranins A and B: the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience*, vol. 49, ss. 497–528. Review.
- Zhang, D., Lavaux, T., Voegeli, A.-C., Lavigne, T., Castelain, V., Meyer, N., Sapin, R., Aunis, D., Metz-Boutigue, M.-H., Schneider, F., (2008). Prognostic value of chromogranin A at admission in critically ill patients: a cohort study in a medical intensive care unit. *Clinical Chemistry*, vol. 54, ss. 1497–1503.