



ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ENDOCRINOLOGIA

**Списание
на Българското дружество
по ендокринология
към СНМД в България**

**Journal
of the Bulgarian Society
of Endocrinology
(BSE)**

Гл. редактор: Боян Лозанов
Зам гл. редактор: Драгомир Коев
Научен секретар: Филип Куманов

Editor-in-Chief: Bojan Lozanov (Sofia)
Deputy Editor: Dragomir Koev (Sofia)
Scientific Secretary: Philip Kumanov (Sofia)

Редакционна колегия:

М. Андреева, Г. Дашев,
Л. Дянков, С. Захариева,
К. Коприварова, Ив. Мендизов,
М. Протич, Вл. Христов

Editorial Board:

М. Andreeva (Sofia), V. Christov (Sofia),
G. Dachev (Sofia), L. Diankov (Sofia),
K. Koprivarova (Sofia), I. Mendizov (Sofia),
M. Protich (Sofia), S. Zacharieva (Sofia)

Редакционен съвет:

П. Ангелова-Гатева, Б. Василева,
Г. Кирилов, Л. Коева,
Ст. Миланов, Хр. Нончев,
Н. Овчарова, Т. Сечанов,
С. Симеонов, Ив. Цинликов

Advisory Board:

P. Angelova-Gateva (Sofia), G. Kirilov (Sofia),
L. Koeva (Varna), S. Milanov (Sofia),
Chr. Nonchev (Sofia), N. Ovcharova (Sofia),
T. Sechanov (Sofia), S. Simeonov (Plovdiv),
B. Vassileva (Sofia), I. Tzinlikov (Pleven)

Международен научен съвет:

М. Бергер (Дюселдорф), А. Булатов (Москва),
Ф. Деланж (Брюксел), К. Жафиол (Монпелие),
А. Изидори (Рим), С. Имамоглу (Бурса),
Б. Каранфилски (Скопие), П. Кендъл-Тейлър
(Нюкасъл на Тайн), Х. Кийн (Лондон),
И. Климеш (Братислава), М. Кокулеску (Букурещ),
П. Корвол (Париж), Д. А. Кутрас (Атина),
Дж. Лазарус (Кардиф), Ж. Метелко (Загреб),
Е. Нишлаг (Мюнстер), А. Пинкера (Пиза),
М. Серрано Риос (Мадрид), Й. Фьовени
(Будапеща)

International Scientific Board:

M. Berger (Düsseldorf), A. Bulatov (Moscow),
M. Coculescu (Bucharest), P. Corvol (Paris),
F. Delange (Brussels), J. Fovenyi (Budapest),
S. Imamoglu (Bursa), A. Isidori (Rome),
C. Jaffiol (Monpellier), B. Karanfilski (Scopie),
H. Keen (London), P. Kendall-Taylor
(Newcastle upon Tyne), I. Klimes (Bratislava),
D. A. Koutras (Athens), J. H. Lazarus (Cardiff),
Z. Metelko (Zagreb), E. Nieschlag (Münster),
A. Pinchera (Pisa), M. Serrano Rios (Madrid)

Списание

ЕНДОКРИНОЛОГИЯ

том III, кн. 2, 1998

Съдържание

Обзори

- А. С. Александров:** Хронобиологични аспекти в ендокринологията 4
С. Захариева: Артериална хипертония при менопаузни жени.
Хормоналното заместително лечение в комплексната антихипертензивна терапия . . . 16

Оригинални статии

- Р. Савова, К. Калинов, С. Чавръкова, К. Коприварова, Г. Попова, С. Горанова:**
Заболеваемост от инсулинозависим захарен диабет сред децата
от Западна България (1989–1994) 23
Р. Кочич: Хиперинсулинемия и отношението ѝ към хиперлипидемията
и контрарегулаторните хормони при болни с миокарден инфаркт 31
М. Боянов, М. Петкова, М. Протич: ДНК-анализ на гена за инсулинрецепторния
субстрат-1 у болна с вродена тежка инсулинова резистентност 40
Н. Ненчев, Е. Маринова, А. Джамбазова, К. Тодоров: Определяне на общата
телесна вода и промените в нея по време на хемодиализа при диабетно болни . . . 46
П. Ангелова-Гатева, М. Петкова, Я. Владимирова, В. Крумова:
Нов показател в липидологията за почистване на тъканите от пероксидирани липиди
при болни със захарен диабет и при здрави лица 52
Л. Даковска, Б. Лозанов, Р. Ковачева, Р. Иванова, Хр. Вълкова, Г. Кирилов, И. Атанасова:
Честота и клинично значение на автоантителата срещу ретроорбитални мускулни
антигени при болни с Тиреоид-Асоциирана Офталмопатия (ТАО) 59

Рецензия

- И. Карагъзов:** Том IV: „Лекарствени средства, повлияващи пикочо-половата
система, и хормонални препарати“ от многотомника „Index Pharmacorum
Bulgaricus“ 66

- Съобщения 66
Указания за авторите 67
Талон за абонамент 71

**Contents****Reviews**

- A. S. Alexandrov:** Chronobiological Aspects in Endocrinology 4
S. Zaharieva: Arterial Hypertension in Menopausal Women.
 Hormone Replacement Therapy in Complex Antihypertensive Treatment. 16

Original Articles

- R. Savova, K. Kalinov, S. Chavrakova, K. Koprivarova, G. Popova, S. Goranova:**
 Incidence of Type I (Insulin Dependent) Diabetes Mellitus among Children
 in Western Bulgaria (1989-1994) 23
R. Kocić: Hyperinsulinemia and its Relationship with Hyperlipidemia
 and Counterregulatory Hormones in Patients Surviving Myocardial Infarction. 31
M. Boyanov, M. Petkova, M. Protich: DNA Analysis of the Insulin-Receptor
 Substrate-1 Gene in a Patient with Severe Congenital Insulin Resistance 40
N. Nenchev, E. Marinova, A. Djambazova, K. Todorov: Determination of Total Body
 Water and its Changes during Haemodialysis in Diabetic Patients 46
P. Angelova-Gateva, M. Petkova, Y. Vladimirov, V. Krumova: New Index in Lipidology
 for Tissues Scavenging from Peroxidised Lipids in Diabetics and Healthy Persons 52
G. Dakovska, B. Lozanov, R. Kovatcheva, R. Ivanova, Hr. Vulkova, G. Kirilov, I. Atanasova:
 Prevalence and Clinical Significance of Autoantibodies against Retroorbital
 Eye Muscle Antigens in Patients with Thyroid Associated Ophthalmopathy (TAO)59

Book Review

- I. Karagiozov:** Index Pharmacorum Bulgaricus, Vol. IV. Sex Hormones and Drugs,
 Affecting the Urogenital System. 66

- New Items** 66
Instructions to Authors 67
Subscription Form 71

Хронобиологични аспекти в ендокринологията

А. С. Александров

Институт по биофизика, Българска академия на науките – София

Chronobiological Aspects in Endocrinology

A. S. Alexandrov

Institute of Biophysics, Bulgarian Academy of Sciences – Sofia

Резюме

Биоритмите са присъщи на всички живи организми и представляват необходимо условие за нормалната им жизнена дейност. През последните години се наблюдава бурно развитие на методиките за тяхното изследване.

Изучаването, обяснението, систематиката и използването в практиката на тези явления са обект на клон от биологията, наречен хронобиология. Тя трябва да отговори на следните въпроси: какъв е принципът за измерване на времето в биосистемите; съществуват ли „биологични часовници“; къде точно е разположен „часовниковият механизъм“; по какъв начин той изпраща своите сигнали до изпълнителните органи на организма; какви са молекулните механизми на неговото действие? Днес тези въпроси са далече от своя окончателен отговор, макар че изследванията през последните години хвърлиха значителна светлина върху тях.

В настоящия обзор са разгледани основните характеристики на биологичните ритми като период, фаза, акрофаза, амплитуда, относителна амплитуда и т. н. Представена е систематичната терминология на биологични-

Abstract

Biological rhythms are inherent to all life organisms and are a necessary condition for their normal life activity. During the last years is observed a rapid development of the methods for their study.

The study, explanation, taxonomy and using in practice of this phenomenon is a part of the science of biology called chronobiology. Its aim is to answer some of the following questions: Which is the principle for measuring the time in biological systems? Do „biological clocks“ exist? Where is the „clock mechanism“ situated? How „biological clocks“ transfer their signals to the executive organs of the organism? What are the molecular mechanisms of their activity?

Nowadays these questions are far from their final answer though the studies during the last years have highlighted some of the mechanisms of their action.

The current review describes the main characteristics of biological rhythms such as period, phase, acrophase, amplitude, relative amplitude, etc. The systematic terminology of biological rhythms is shown based on their periodicity, particularly the peculiarities of the cir-

те ритми, основана на тяхната периодичност, и по-специално характерните особености на циркадните (денонощните) ритми. По-подробно в обзора са описани биологичните ритми при гонадотропните хормони.

Авторът се надява, че в този обзор читателят може да открие стимул, който да предизвика интерес към науката хронобиология, необходим за постигане на по-динамично разбиране на ендокринологията като цяло, доколкото тя има отношение освен към човешкото здраве – и към околната среда.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: хронобиология, ендокринология, циркаден ритъм, биологичен ритъм, осцилация, пулсативно.

ВЪВЕДЕНИЕ

Още преди 2500 г. в работите на гръцкия поет Arhilohu намираме думите: “*γυγ-ωσκε δοιος ρυθμος αυδρτους εχει*” – „познай какъв ритъм имат хората“ (4).

За рождена година на хронобиологията (chronos – време, bios – живот) се смята 1729 (не 1927 г.!), когато De Mairan (10) открива ритми в растенията (циклично движение на листата на растението хелиотроп) с продължителност едно денонощие. Тази ритмика се запазва и при поставянето на растенията в тъмна стая, без да има редуване на деня с нощта. Според De Mairan в растенията съществуват някакви вътрешни механизми за възприемане на времето.

През 1814 г. в дисертацията си френският студент по медицина Virey употребява израза „horloge vivante = biological clock“ (жив часовник) за описване на денонощните ритми (36).

Терминът „циркаден“ (приблизително денонощен) ритъм е въведен едва през 1969 г. от F. Halberg (15) и произлиза от латинските думи „circa“ – около, и „dies“ – ден.

Хронобиологията е наука, обективно определяща и изследваща механизмите на биологично временни структури, включително ритмичните прояви на живота. Във физиологични термини хронобиологията взема основ-

ни променливи концепции и техники за решаването, при които може да предскаже цикли в организмите и за изолирани околности ефекти от основни ендогенни механизми. Тези основни свойства на ритмите са важни за обрзаванието, екологията и медицината.

Хронобиологията включва следните дялове:

KEY WORDS: chronobiology, endocrinology, circadian rhythms, oscillatio, pulsatile.

а) *хронофизиологията* е дял, описващ времевите прояви във физиологичните цикли; дава оценка на нервните цикли, **ендокринните**, метаболитните и други взаимодействия в организма, които са в основата на биологичните характеристики на времето и техните взаимодействия с околната среда;

б) *хронопатологията* е дял, описващ изменението в биологичните характеристики на времето като определящи, резултиращи или съпътстващи статуса на болните – психопатии, ракови заболявания, **ендокринопатии**, язви, хипертонии и др.

в) *хронофармакологията* е дял, описващ резултатите от хронобиологичния подход при фармакологични явления; хронобиологичната методология предлага по-малък риск от грешки и/или погрешна информация отколкото общоприетите хомеостатични подходи; хронофармакологията се разделя още на *хронотоксикология* и *хронотерапия*.

Ендокринната система играе важна роля в регулирането на ритмичните процеси.

Така например, падащата светлина върху ретината на окото предава възбудата върху хипоталамуса, който е свързан с хипофизата – основен регулатор на жлезите с вътрешна секреция. През последните години се стигна до заключението, че хипоталамусът е висш ръководен център на вегетативните функции, който осъществява връзка с парасимпатиковата и симпатиковата нервна система. Допуска се, че хипоталамусът има пряко отношение към съществуването на еногенни механизми в регулацията на ритмичните процеси и на биологичния часовник (biological clock). Счита се, че в предните ядра на хипоталамуса се намират механизмите на биологичния часовник и ядрата в отделните дялове са свързани с регулирането на половите функции, на телесната температура, кръвното налягане, имунните реакции, водно-електролитния баланс и др.

В настоящия обзор са представени основните характеристики на биологичните ритми; разгледани са биологичните ритми при хормоните и по-подробно тези на гонадотропните хормони.

ОСНОВНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА БИОЛОГИЧНИТЕ РИТМИ

Осцилациите, характеризиращи биологичните ритми, независимо от класификацията, се наблюдават на всички нива на биологичната организация. Понятието произлиза от латинската дума „oscillatio“ и буквално означава колебливо движение, трептене, т. е. осцилацията е един многократно повтарящ се колебателен процес. Тя е пример за динамично равновесие, към което системата се стреми (33). В противен случай, когато няма повторение или има само приблизително повторение, говорим за затихващо, усилващо се или аperiодично трептене.

Тъй като нерядко се случва поради несъгласуваност в терминологията да се стига и до противоречия, а осцилаторният характер на биологичните ритми позволява да се употребяват същите термини, използвани за описване на колебанията във физиката, ще разгледаме някои основни понятия, дефини-

рани в Циркадният речник на Aschoff et al., 1965 (2) и възприети днес:

Според вътрешните си качества осцилиращите системи биват: активни – способни на свободно затихващи осцилации или да извършват самоподдържащи се осцилации (ендогенни ритми); крайно пасивни – неспособни на свободно затихващи осцилации.

Според външните условия осцилиращите системи биват автономни и неавтономни в зависимост от това, дали са под влиянието на периодичен източник на енергия.

Трябва да се отбележи, че в биологичните експерименти е необходимо да се спомене каква фаза е използвана за определяне на периода, тъй като терминът период в тесен смисъл на думата е приложим, ако която и да е избрана фаза води до същата стойност на периода. Когато различни фази дават различни стойности на периода, е необходимо специално обяснение.

Акрофаза – времето, с което максимумът на косинусоидата на ритъма изостава спрямо началото на отчитане на времето. За начало на отчитане на времето се приема по правило 00.00 часа местно астрономическо време. Измерва се в единици време или в единици за измерване на ъгъл (градуси) като един цикъл е равен на 360° . Амплитуда – половината от разликата между максимума и минимума на косинусоидата. Мезор от MESOR (Midline Estimating Statistics of Rhythm) – средно ниво на изследвания показател за времето на един пълен цикъл.

Състоянието, в което две или повече осцилации имат еднакви честоти в резултат на взаимни или едностранни влияния, се нарича синхронизация.

Външна синхронизация – синхронизация на ритъма с ритъм (периодичен процес) в околната среда или друг организъм.

Вътрешна синхронизация – синхронизация на ритъма с друг ритъм в същия организъм.

През 1969 г. Franz Halberg (15) предлага систематична терминология на биологичните ритми (биоритми), основана на тяхната периодичност (таблица 1) (13, 15). От таблицата се вижда, че биологичните ритми имат твър-

Таблица 1. Честота и период за термини, описващи биологичните ритми (по Halberg, 1969)
Table 1. Frequency and period range for terms describing biologic rhythms (from Halberg, 1969)

Английски термин / Български термин	Интервал / Interval
Ultradian / ултрадианен (ултрадневен)	$\tau < 20 \text{ h}$
Circaduohoran / циркадуохоран (двучасов)	$\tau = 1.7 \pm 1 \text{ h}$
Circasemidian / циркасемидианен (полудневен)	$\tau = 12 \pm 1 \text{ h}$
Circadian / циркаден (приблизително денонощен)	$28 \text{ h} \geq \tau \geq 20 \text{ h}$
Dian / дианен (денонощен)	$24.4 \text{ h} \geq \tau \geq 23.8 \text{ h}$
Infradian / инфрадианен (по-голям от денонощие)	$\tau > 28 \text{ h}$
Circaduodian / циркадуодианен (двудневен)	$\tau = 2 \pm 0.5 \text{ d}$
Circaseptan / циркасептанен (седмичен)	$\tau = 7 \pm 3 \text{ d}$
Circadiseptan / циркадисептанен (двуседмичен)	$\tau = 14 \pm 3 \text{ d}$
Circavigintan / циркавигинтанен (триседмичен)	$\tau = 21 \pm 3 \text{ d}$
Circatrigintan / циркатригинтанен (месечен)	$\tau = 30 \pm 5 \text{ d}$
Circannual / циркануален (годишен)	$\tau = 1 \text{ y} \pm 2 \text{ m}$

τ = период; h = час; d = ден; m = месец; y = година
 τ = period; h = hour; d = day; m = month; y = year

де широк честотен спектър с периодичност от 10^{-3} до $10^7 \div 10^8$ sec. При изучаване на биологичните ритми е важно да се анализира спектърът им, да се намерят максимумът и минимумът на функциите. Halberg et al. (14) посочват, че една от характерните особености на биоритмите е нестабилността на амплитудата, периода, фазата и формата на колебаещата се вълна. Биоритмите варират както при различните индивиди, така и при един и същ човек. Това е резултат от въздействието на комплекс от фактори – наслявяване на бавни ритми върху по-бързи, въздействие на случайни фактори и т. н.

Биологични ритми с период, по-малък от 30 минути, са високочестотни. Те са известни в литературата като циркахорални (circahoral) или пулсативни (pulsatile). Към тази група спадат различни процеси, свързани с дейността на сърцето, дишането, колебания на някои биохимични реакции и т. н. Средночестотни са ритмите с продължителност от 30 минути до 6 дни. Към тази група спадат циркадните ритми, т. е. биоритми с период, равен на денонощието. Те са ендогенни по своята природа, обикновено представляват устойчиви колебания и са вродено свойство на организ-

ма. Цикълът сън-бодърстване може да бъде причислен към циркадните ритми. Нискочестотни са седмичните, лунните и годишните ритми, чиято продължителност е от една седмица до една година. Менструалният цикъл е добре известен пример за ритъм с нискочестотни колебания.

Особен интерес представляват циркадните (денонощните) ритми, чиито характерни особености Pittendrigh обобщава, както следва:

1. Циркадните ритми са биологични ритми с период, приблизително равен на този на въртенето на Земята около оста ѝ (27).
2. Съществуват неизменно в живите системи (26).
3. Ендогенни са (27).
4. Представляват устойчиви закономерни колебания (26).
5. Наследствено обусловени са.
6. Присъщи са за всички нива на организация – от клетка до организъм (26).
7. Периодът на циркадните ритми се характеризира с голяма стабилност на поддържане. При обичайни условия отклоненията са по-малки от 1–2 минути за денонощие, т. е. от порядъка на 0.1%.

8. Периодите на циркадните ритми са характерен вид белег. У нощноактивните видове те са обикновено по-къси от 24 часа, а у дневноактивните – по-дълги от 24 часа (5).

9. Периодът на циркадните ритми почти не се променя при химически въздействия (17) и от промени в температурата.

10. Периодът на циркадните ритми зависи от интензитета на осветлението (3), като у нощноактивните видове се увеличава с нарастване на интензитета, а у дневноактивните намалява с нарастване на интензитета (правило на Aschoff).

11. При определени условия (синхронизация) периодът на циркадните ритми се изменя в дадени граници за всеки биологичен вид и всеки организъм.

12. Под влияние на някои периодични явления във външната среда (външни синхронизатори), най-важен от които е цикълът на осветление, циркадните ритми могат да променят периода и фазата си.

13. В отсъствие на периодични промени в околната среда (външни синхронизатори) се проявява ендогенният, генетично обусловен период на циркадните ритми, който е видово специфичен – т. нар. „свободно протичане“ на ритъма.

14. Фазата на свободно протичащ ритъм може да се промени при еднократно светлинно въздействие. Промяната зависи от интензитета и продължителността на стимула, но най-вече от момента (собствена фаза), в който е приложено въздействието (27).

15. Новото устойчиво състояние не се постига веднага, а след определено време, през което се развиват т. нар. преходни явления (27).

БИОЛОГИЧНИ РИТМИ ПРИ ХОРМОНИТЕ

През последното десетилетие развитието на техниката за високочестотни кръвни проби, чувствителните и специфичните радиоимуноанализи направиха възможно демонстрирането на спонтанни времеви флукуации в нивата на хипофизната плазма на различни хормони. Според Van Cauter and Honinckx (35) при нормални условия се идентифицират

два типа изменения в секрецията на повечето хормони:

1. Периодичен компонент, синхронизиран или определен от светлинния цикъл денощ и/или други екзогенни фактори, свързани с денонощните промени на околната среда. Този периодичен компонент се нарича „циркаден ритъм“, независимо от формата на неговата вълна и ендогенния или екзогенния му произход.

2. Епизодични флукуации с променлив период и амплитуда, за които в литературата се говори като за секреторни „episodes – епизоди“, „spikers – върхове“, „pulses – пулсации“, „bursts – взривове“. Повтарянето на такива „епизоди“ се означава като „ултрадианен ритъм“ (таблица 1). Те възникват с честоти, много по-големи от един цикъл от 24 часа. Трябва обаче да отбележим, че независимо от използването на думата „ритъм“ това явление не е строго периодично. От това следва, че термините „episodic – епизодичен“ и „pulsatile – импулсен“ могат да се употребяват като синоними.

Епизодичните изменения в плазмените нива се наблюдават за всички хипофизни хормони и за голям брой други хормони. Независимо от това техният произход и физиологично значение остават до голяма степен неясни.

Хормонално-рецепторното взаимодействие има съществено значение за функционирането на ендокринната система. В основата на денонощните ритми на чувствителните рецептори лежат както рецепторните взаимодействия с концентрацията на хормоните, така и цикличните промени в способността им да „познават“ и се свързват с хормоните. Тези ритми изпълняват ролята на универсален акцептор на цялата система, регулираща функциите на една или друга ендокринна жлеза. Цикличността в колебанията на концентрацията на хормоните води до съответните изменения в нивото на метаболитите, в крайното метаболитно действие на хормона и съответно в активността на определена физиологична функция.

Интерпретацията на колебателните процеси в организма е синхронна, йерархична и има редица времеви фази, при които

преобладават едни или други хормонални и метаболитни процеси.

Секрецията на различните хормони не се извършва непрекъснато с една и съща интензивност, а в постоянно променящи се количества в зависимост от времето на денонощието, както и от постоянно променящите се стимули за даден хормон. Не е безразлично в какъв момент се определя нивото им, дали това става сутрин, вечер или в друго време от денонощието.

На фигура 1 е показан денонощният ритъм на соматотропния хормон (СТХ). Около 90 min след заспиване секрецията на СТХ се повишава и достига 30–40% от общата денонощна продукция.

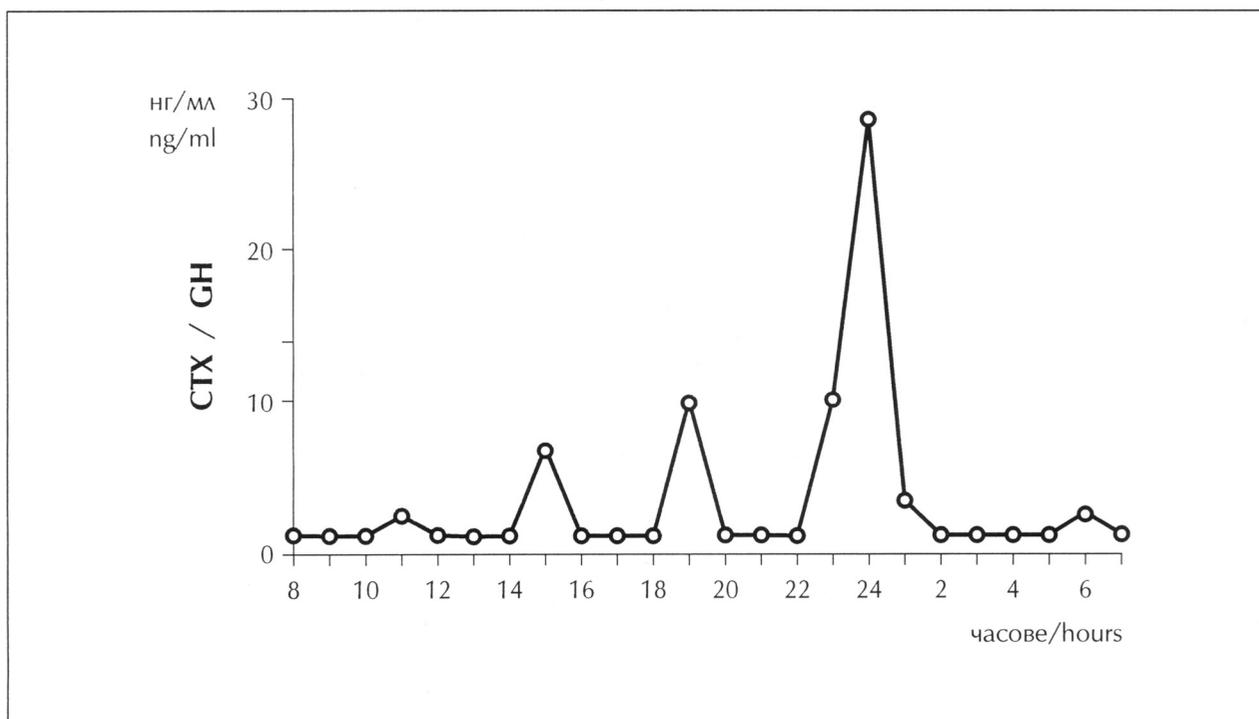
При мъжете и жените се наблюдава обща закономерност на увеличаване съдържанието на тиреотропния хормон в кръвта през нощта или рано сутрин (от 23 до 07 часа) и намаляването му през деня (от 11 до 22 часа). Амплитудата на денонощните колебания в концентрацията на тиреотропния хормон при

жените е по-голяма, отколкото при мъжете.

При здрави лица адренокортикотропният хормон (АКТХ), измерен по радиоимунологичния метод на Berson-Yalow, има най-ниска стойност от 18 до 23 часа, а най-висока – сутрин между 06 и 08 часа.

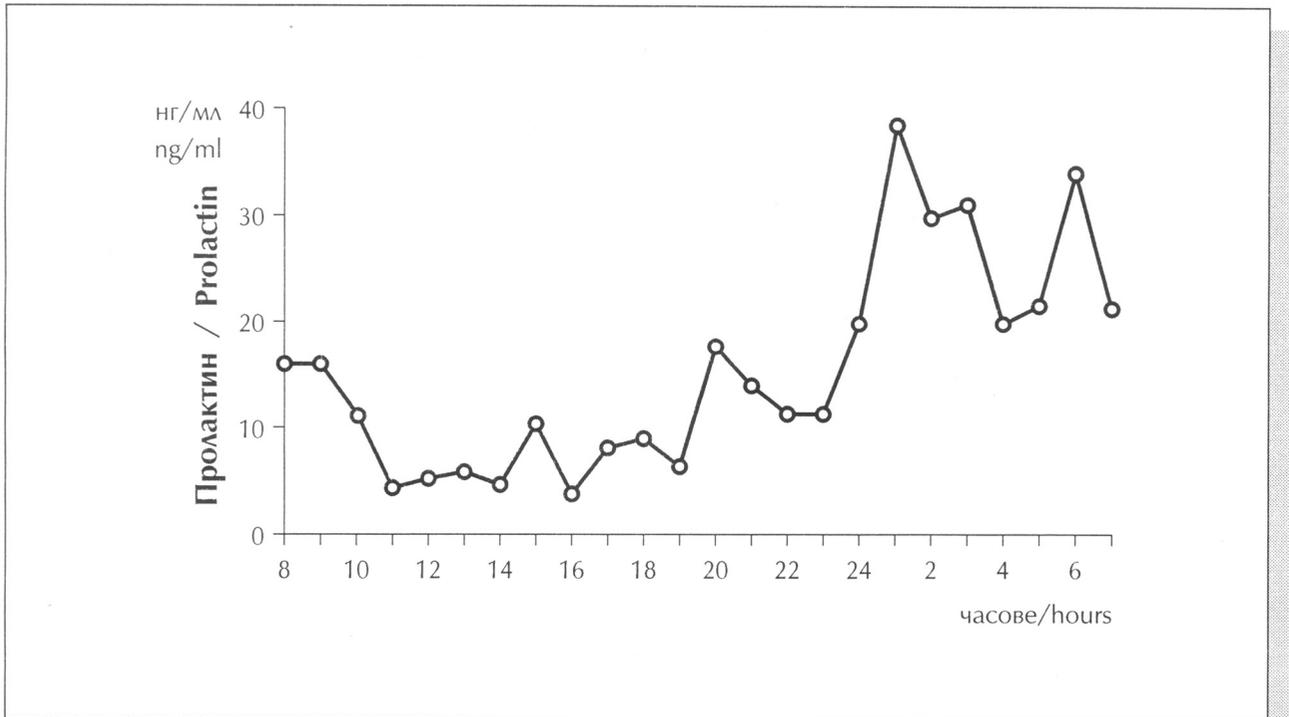
Приема се, че ритъмът на секреция на пролактина има вид на вълнообразна крива с максимум на секрецията в първите часове след заспиване (21) (фигура 2). Повишаването на концентрацията на пролактина се предизвиква от различни фактори като физическо натоварване, операция и др.

Секрецията на тестостерон от тестисите се извършва също ритмично. Този ритъм, макар че не е подчертан, е както денонощен, така и сезонен. Секрецията на тестостерон през нощта е по-голяма. От друга страна, през есенните месеци тази секреция се повишава. През последните години са открити редица лунни ритми, най-често свързани с размножаването. Продължителността на тези ритми е 29.53 земни денонощия и е равна на



Фиг. 1. Денонощен ритъм на соматотропния хормон (СТХ) (по Malarkey, 1974)

Fig. 1. Circadian rhythm of growth hormone (GH) (from Malarkey, 1974)



Фиг. 2. Денонощен ритъм на секрецията на пролактина (по Malarkey, 1974)
Fig. 2. Circadian rhythm of prolactin secretion (from Malarkey, 1974)

сидеричния лунен месец (времето за пълна обиколка на Луната около Земята), като максимумите съвпадат с фазите на пълнолуние, а минимумите – с фазите на новолуние.

Типичен пример за инфрадианна периодичност е менструалният цикъл. Освен синхронизирана периодичност във фазите на хормоналната регулация на всички ендокринни нива (гонадотропин освобождаващ хормон – GnRH, гонадотропините и яйчните хормони) по време на менструалния цикъл се променят много соматични и вегетативни функции в организма на жените, което подчертава взаимовръзката и взаимоотношеността на ритмичната дейност. Липсата на правилен ритъм в секрецията на хипофизните гонадотропни хормони и в хормоналната секреция на яйчника води до липса на овулация и до невъзможност за забременяване, независимо от циклично настъпващото кръвотечение. Това води до практическия извод, че нарушенията в менструалния цикъл, следователно и на функциите на размножаване, са предизвикани не само

от количествени изменения в отделните етапи на хормоналната регулация, но и от качествени измествания, т. е. десинхронизация в ритмите на цикличния процес.

Секрецията на лутеинизиращия хормон (ЛХ) и фоликуло-стимулиращия хормон (ФСХ) е различна през цялото денонощие (32). При различните възрастови групи, както при мъжете, така и при жените, базалното ниво на ЛХ е различно.

Dierschke et al. (1970) първи съобщават за импулсен (пулсативен) характер на концентрацията на ЛХ в плазма на овариектомирани резус маймуни. По-късно импулсен отговор на ЛХ е доказан и при хора (30, 38). При тях секреторните импулси на ЛХ са малки и често по време на фоликулната фаза, а по време на лутеалната фаза са големи и редки.

При някои видове животни, например плъхове (20), са открити доказателства за това, че механизмът, лежащ в основата на импулсното освобождаване на ЛХ, вероятно се намира в хипофизната клетка. Други изследва-

ния *in vitro* (25) и *in vivo* (7, 31) показват, че този механизъм е локализиран в мозъка. Изучаването *in vitro* на хипофиза от животни с отстранени гонади (пльхове) сочи, че по време на късите едночасови инжектирания на постоянни нива GnRH освобождаването на ЛХ има неепизодичен характер, а импулсното освобождаване на ЛХ е резултат от импулсното освобождаване на GnRH (25). Съществуват предположения, че импулсното освобождаване на хипофизни хормони се регулира и от центрове в централната нервна система (ЦНС). Стероидите също участват в регулацията на импулсното освобождаване на хипофизни хормони, като при някои условия прогестеронът може да изпълнява ролята на инхибитор.

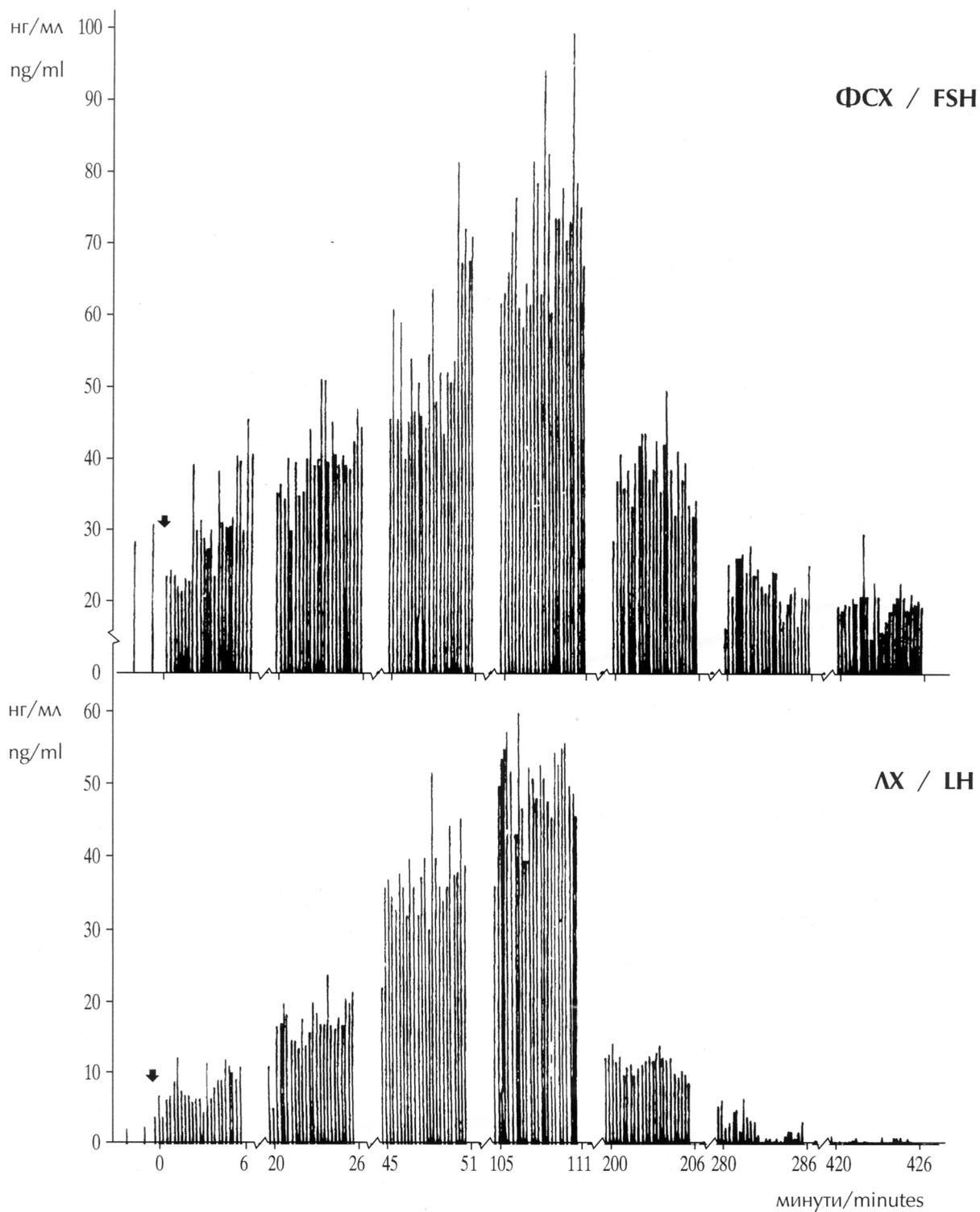
Импулсното освобождаване на GnRH от хипоталамуса изглежда е главният фактор, определящ синтеза и съответното импулсно освобождаване на ЛХ и ФСХ (22) от хипофизната жлеза. Постоянното инжектиране на големи дози GnRH води до краткотрайно повишаване на ЛХ в кръвта, но за 2–3 дни секрецията на хипофизните гонадотропини намалява до ниски базисни нива (19). Обратно, импулсната секреция на ЛХ може да се поддържа в продължение на много дни, когато GnRH се подава на импулси през 20–30 минути (6, 23). Установено е, че ЛХ в пъхове се освобождава на импулси с период 20–30 минути, като честотата и амплитудата на импулсите се запазват постоянни в продължение на 24-часов ден (34). Нещо повече, тези ритмични изменения на нивата на ЛХ в кръвта не са резултат от вариации в метаболитната скорост на хормона (1), нито са повлияни от някаква възможна инхибиторна къса обратна връзка на циркулиращия ЛХ (8). През 1984 г. Kanchev et al. (18) наблюдават високочестотни затихващи осцилации в кръвния серум на ЛХ (фиг. 3 – долната част) след двукратно инжектиране на синтетичен GnRH от 1 μg и 50 μg при анестезирани овце. Измерванията са направени през 15 секунди в първите 15 минути след инжектирането, а периодът на високочестотните осцилации е 1–3 минути. Осцилациите затихват по-бързо при отговора на ЛХ на голяма доза GnRH. Високочестотни затихващи осци-

лации са наблюдавани и при ФСХ (фиг. 3 – горната част) (19). По-късно Negro-Vilar et al. (1987) наблюдават подобни високочестотни осцилации в отговора на ЛХ в пъхове при многократно стимулиране с GnRH (3 последователни дози по 10 ng през 40 min и 2 други дози по 50 ng през 100 min, като пробите за ЛХ са вземани през 30 sec) (както при 18, 19). Освен това те показват, че има приблизително линейно увеличение в отговора на ЛХ при доза 10 ng и че двата отговора при 50 ng не се различават по форма и големина. Така обвивката на максималните отговори на ЛХ образува крива на насищане. Negro-Vilar et al. (1987) обясняват този стимулиращ ефект с повишаване чувствителността на рецепторите на GnRH в мембраните на хипофизните клетки.

През последните години продължават изследванията, свързани с импулсното освобождаване на ЛХ. Така например според Vizcarra et al. (1997) импулсната секреция на ЛХ е необходима за фоликулния растеж при кравите. Импулсното третиране с GnRH, което стимулира фоликулния растеж и лутеалната активност, незначително променя секрецията на серумния ФСХ или концентрацията на FSH β mRNA (37).

Измененията във времевите характеристики при патология, например някои тумори, показват нарушаване на периодичността при повишена и намалена концентрация на кортизола, адренкортикотропния хормон и соматотропина. Хронобиологична методология е приложена за изследване на времевите въздействия на прогестерона върху параметрите, характеризиращи циркадните ритми на умората, оралната температура, сърцебиенето, силата на грипа и др. (29).

Промените в параметрите на ритъма на циркадни и циркануални честоти са представени в таблица 2. Десинхронизацията на ритмите при ендокринната регулация е свързана не само с нарушаване (отсъствие) на секрецията на ендогенния инсулин (С-белтък) и неговия краен метаболитен ефект, но и с индуциране на нов изкуствен ритъм при болните от диабет – ежедневно (понякога и многократно) въвеждане на екзогенен инсулин.



Фиг. 3. Високочестотни осцилации в кръвния серум на ФСХ (горе).
 Високочестотни осцилации в кръвния серум на ЛХ (долу) (по Kanchev et al., 1987)

Fig. 3. High frequency oscillations in blood serum of FSH (top).
 High frequency oscillations in blood serum of LH (bottom) (from Kanchev et al., 1987)

Таблица 2. Денонощни и годишни характеристики на хормони по възрастови различия при хора
Table 2. Hormones characterized by age-related differences in one to several circadian and circannual characteristics in human subjects

Ритъм / Rhythm	Хормон (пол) / Hormone (sex)	Литература / References
Циркаден (денонощен)/ Circadian	пролактин (ж, м) / prolactin (f, m)	Cugini et al., 1982,
	Circadian	Descovich et al., 1974
	C-белтък (ж, м)/C-peptide (f, m)	Descovich et al., 1974
	инсулин (м) / insulin (m)	Descovich et al., 1974
	C-белтък/инсулин (ж) / C-peptide insulin (f)	Descovich et al., 1974
	алдостерон (ж) / aldosterone (f)	Cugini et al., 1982,
		Descovich et al., 1974
	кортизол (ж) / cortisol (f)	Descovich et al., 1974
	естрон (ж) / estrone (f)	Cugini et al., 1982
	естрадиол (ж) / estradiol (f)	Cugini et al., 1982
	17-ОН прогестерон (ж) / 17-OH progesterone (f)	Cugini et al., 1982
	свободен тироксин (ж) / free thyroxine (f)	Descovich et al., 1974
	СТХ (ж) / GH (f)	Descovich et al., 1974
	ФСХ (ж) / FSH (f)	Descovich et al., 1974
	ЛХ (ж) / LH (f)	Cugini et al., 1982,
		Descovich et al., 1974
	епинефрин (ж, м) / epinephrine (f, m)	Halberg, 1980
ноеепинефрин (ж, м) / noepinephrine (f, m)	Halberg, 1980	
Циркануален (годишен)/ Circannual	алдостерон (ж) / aldosterone (f)	Cugini et al., 1982
	17-ОН прогестерон (ж) / 17-OH progesterone (f)	Cugini et al., 1982
	естрон (ж) / estrone (f)	Cugini et al., 1982
	естрадиол (ж) / estradiol (f)	Cugini et al., 1982
	пролактин (ж) / prolactin (f)	Cugini et al., 1982
	ЛХ (ж) / LH (f)	Cugini et al., 1982
	T ₃ (ж) / T ₃ (f)	Cugini et al., 1982

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Съвременните представи за функционалната динамика на различните ритми в ендокринната система, които характеризират състоянието на организма като цяло и спрямо околната среда, в норма и патология, могат да се обединят с понятието „хроноендокринология“.

Може с пълна увереност да се говори за това, че всяко заболяване води до нарушаване ритъма на функциониране на хормоните, че механизмите на десинхронизация на ендокринните функции са в основата на развитието на много патологични процеси или заемат важно място в тяхната патогенеза. Същ-

ността на болестта от гледна точка на хроноендокринологията може да се определи като нарушаване на функцията на нормалните „биологични часовници“ или появата на ново (патологично) циклично явление.

В хроноендокринологията терапията с хормонални препарати придобива особено важно значение от гледна точка на хронобиологията – екзогенното въвеждане на хормон трябва максимално да имитира нормалния (естествен) ритъм на неговата секреция и метаболизъм. Затова е необходимо системно изследване на хормоналния профил на ритъма на всеки болен, както и определянето на профила на основните метаболитни показатели, регулиращи дадения хормон.

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Akbar, A. N., T. M. Nett, G. D. Niswender. Metabolic Clearance and Secretion Rates of Gonadotropins at Different Stages of the Estrous Cycle in Ewes. *Endocrinology*, 94, 1974, 1318–1324.
2. Aschoff, J., K. Kloter, R. Wever. Circadian Vocabulary. A Recommended Terminology with Definitions. In: Circadian Clocks. Proc. Feldafing Summer Session Sept. 7–18, 1964. (Ed. J. Aschoff). North Holland, Amsterdam, 1965.
3. Aschoff, J. Gold Springer Harbor Symp. on Quant. Biol. 25, 1960.
4. Aschoff, J. Speech after Dinner. In: Chronobiological Aspects of Endocrinology. (Eds. J. Aschoff, F. Ceresa and F. Halberg). *Chronobiologia*, 1 (suppl. 1), 1974, 473–496.
5. Aschoff, J. Tierische Periodik unter dem Einfluss von Zeitgebern. V. *Tierpsychol*, 15, 1958, 1–30.
6. Belchetz, P.E., T. M. Plant, Y. Nakai, E. J. Keogh, E. Knobil. Hypophysial Responses to Continuous and Intermittent Delivery of Hypothalamic Gonadotropin-Releasing Hormone. *Science*, 202, 1978, 631–633.
7. Carmel, P. W., S. Akari, M. Ferin. Pituitary Stalk Portal Blood Collection in Rhesus Monkeys: Evidence for Pulsatile Release of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH). *Endocrinology*, 99, 1976, 243–248.
8. Coppings, R. J., P. V. Malven. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 148, 1975, 64–68.
9. Cugini, P., D. Scavo, F. Halberg, A. Schramm, H. J. Pusch, H. Franke. Methodologically Critical Interactions of Circadian Rhythm, Sex and Aging Characterize Serum Aldosterone of the Female Adrenopause. *J. Geront.*, 37, 1982, 403–411.
10. De Mairan. *Observation Botanique. Histoire de l'Academie Royale des Sciences. Paris, 1729*, 35.
11. Descovich, G. C., N. Montalbetti, J. F. W. Kükl, S. Rimondi, F. Halberg, C. Ceredi. Age and Catecholamine Rhythms. *Chronobiologia*, 1, 1974, 163–171.
12. Dierschke, D. J., A. N. Bhattacharya, L. E. Atkinson, E. Knobil. Circadian Oscillation of Plasma LH Levels in the Ovariectomized Rhesus Monkey. *Endocrinology*, 87, 1970, 850–853.
13. Halberg, E., F. Halberg, F. Carandente. From an Autopsy or Biopsy to the Physiologist's Chronopsy. *Chronobiology*, 8, 1981, 145–164.
14. Halberg, F., W. L. Nelson, E. Haus. Biologic Rhythms, Hormones and Aging. In: Hormones in Development and Aging. (Eds. A. Vernadakis, P. S. Timiras). Spectrum Publications, New York, 1981, 451–476.
15. Halberg, F. Chronobiology. *Ann. Rev. Physiol.*, 31, 1969, 675–725.
16. Halberg, F. Chronobiology: Methodological Problems. *Acta Med. Rom.*, 18, 1980, 399–440.
17. Hasings, J. W. Gold Springer Harbor Symp on Quant. Biol., 25, 1960.
18. Kanchev, L. N., H. Dobson, B. M. Stankov. Early Pituitary LH Response to Injections of GnRH in Ewes. *Theriogenology*, 21, 1984, 407–417.
19. Kanchev, L. N., B. M. Stankov, H. Dobson. Early Pituitary FSH Response to Injections of GnRH in Ewes. *Theriogenology*, 28, 1987, 435–444.
20. Kao, L. W. L., G. L. Gunsalus, G. H. Williams, J. Weisz. Response of the Perfused Anterior Pituitaries of Rats to Synthetic Gonadotropin-Releasing Hormone: A Comparison with Hypothalamic Extract and Demonstration of a Role for Potassium in the Release of Luteinizing Hormone and Follicle-stimulating Hormone. *Endocrinology*, 101, 1973, 1444–1454.
21. Malarkey, W. In: Review of Endocrinology. Eds. L. M. Ernest, H. Huber. Berlin, Stuttgart, Vienna, 1974.
22. Marshall, J. C., R. P. Kelch. Gonadotropin-Releasing Hormone: Role of Pulsatile Secretion in the Regulation of Reproduction. *N. Engl. J. Med.*, 315, 1986, 1459–1468.
23. Nakai, Y., T. M. Plant, D. L. Hess, E. J. Keogh, E. Knobil. On the Sites of the Negative and Positive Feedback Action of Estradiol in the Control of Gonadotropin Secretion in the Rhesus Monkey. *Endocrinology*, 102, 1978, 1008–1014.
24. Negro-Vilar, A., M. D. Culler, M. M. Valenca, T. B. Flack, G. Wisniewski. Pulsatile Peptide Secretion: Encoding of Brain Messages Regulating Endocrine and Reproductive Functions. *Environmental Health Perspectives*, 75, 1987, 1145–1155.
25. Osland, R. B., R. V. Gallo, J. A. Williams. In Vitro Release of Luteinizing Hormone from Anterior Pituitary Fragments Superfused with Constant or Pulsatile Amounts of Luteinizing Hormone-Releasing Factor. *Endocrinology*, 96, 1975, 1210–1216.
26. Pittendrigh, C. S., V. G. Bruce. An Oscillator Model for Biological Clocks. In: Rhythmic and Synthetic Processes in Growth. (Ed. K. Rudnik). Princeton Univ. Press, Princeton, 1957, 75–109.
27. Pittendrigh, C. S. Perspective in the Study of Biological Clocks. Symposium on Perspectives in Marine Biology. Berkeley, Calif. Univ. of Calif. Press, 1958, 239–268.
28. Plant, T. M., L. C. Krey, J. Moosay, J. T. McCormack, D. L. Hess, E. Knobil. The Arcuate Nucleus

and the Control of Gonadotropin and Prolactin Secretion in the Female Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology*, 102, 1978, 52–62.

29. Reinberg, A. Chronopharmacology in Man. *Chronobiologia*, 1 (suppl. 1), 1974, 157–185.

30. Santen, R. J., C. W. Bardin. Episodic Luteinizing Hormone Secretion in Man: Pulse Analysis, Clinical Interpretation, Physiological Mechanism. *J. Clin. Invest.*, 52, 1973, 2617–2628.

31. Schuiling, G. A., H. P. Gnodde. Site of Origin of the Pulsatile Secretion of Luteinizing Hormone in Longterm Ovariectomized Rats. *J. Endocr.*, 70, 1976, 97–104.

32. Schwartzstein, L., N. P. de Laborde, N. J. Aparicio, D. Turner, A. Markin, A. Rodrigo, F. R. Lhullier, J. M. Rosner. Daily Variations of FSH, LH and Testosterone Response to Intravenous Luteinizing Hormone-releasing Factor (LRF) in Normal Men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 40, 1975, 313–317.

33. Sollberger, A. Biological Rhythm Research. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York, 1965, 123–127.

34. Soper, B. D., R. F. Weick. Pulsatile Discharges of Luteinizing Hormone in the Ovariectomized Rat during the 24-hour Day. *Neuroendocrinology*, 23, 1977, 306–311.

35. Van Cauter, E., E. Honinckx. Pulsatility of Pituitary Hormones. Experimental Brain Research, suppl. 12. Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg, 1985, 41–60.

36. Virey, J. J. Ephémérides de la vie humaine ou recherches sur la révolution Journalière et la périodicité de ses phénomènes dans la santé et les maladies. Thèse Fac. Méd., Paris, 23 April 1814.

37. Vizsarra, J. A., R. P. Wettemann, T. D. Braden, A. M. Turzillo, T. M. Nett. Effect of Gonadotropin-releasing Hormone (GnRH) Pulse Frequency on Serum and Pituitary Concentrations of Luteinizing Hormone and Follicle-stimulating Hormone, GnRH receptors, and Messenger Ribonucleic Acid for Gonadotropin Subunits in Cows. *Endocrinology*, 138, 1997, 594–601.

38. Yen, S. S. C., C. C. Tsai, F. Naftolin, G. Vanderberg, L. Ajabar. Pulsatile Patterns of Gonadotropin Release in Subjects with and without Ovarian Function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 34, 1972, 671–675.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Д-р А. С. Александров
Институт по биофизика
Българска академия на науките
ул. „Акад. Г. Бончев“ бл. 21, 1113 София

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Dr A. S. Alexandrov
Institute of Biophysics
Bulgarian Academy of Sciences
Acad. G. Bonchev Str., Bldg. 21, 1113 Sofia, Bulgaria
E-mail: alex@iph.bio.acad.bg

Артериална хипертония при менопаузни жени. Хормоналното заместително лечение в комплексната антихипертензивна терапия

С. Захариева

Клиничен център по ендокринология и геронтология
Медицински университет – София

Arterial Hypertension in Menopausal Women. Hormone Replacement Therapy in Complex Antihypertensive Treatment

S. Zacharieva

Clinical Center of Endocrinology and Gerontology
Medical University – Sofia

Резюме

Менопаузата, т. е. спирането на менструацията, представлява съществена физиологична промяна в живота на жената и обикновено настъпва на около 51-годишна възраст. Поради очакваната повишена продължителност на живота към 2000 г. жените на възраст 45 и повече години ще съставляват 1/4 от населението на земята. Това определя нарастващия интерес към групата на жените в пре- и постменопауза и към проблемите, свързани с тяхното здраве. Сърдечно-съдовите заболявания са основна причина за смърт при жените и тяхната честота се повишава драматично след настъпване на менопаузата. Артериалната хипертония се среща по-рядко при жени-

Abstract

The menopause constitutes an important physiological change in women's life and usually takes place around 51 years of age. Because of the increasing life expectancy, by the year 2000 the women aged 45 and more will constitute about 1/4 of the world population. This fact accounts for the growing interest in women in pre- and postmenopause and their health problems. The cardiovascular diseases are the main cause of death in women and their incidence increases dramatically after the menopause sets in. Arterial hypertension is less common in women than in men before the time of the menopause thereafter its prevalence in women increases. Whether the menopause „per

те в сравнение с мъжете преди менопаузата; след това честотата и при жените нараства. Дали менопаузата „per se“ допринася за повишаването на артериалното налягане с напредване на възрастта при жените, е дискуссионен въпрос. Трансверзалните проучвания намират по-високо артериално налягане при менопаузни жени в сравнение с пременопаузни на същата възраст, докато лонгитудиналните проучвания не потвърждават тези резултати.

Хормоналното заместително лечение е основа на съвременната профилактика на сърдечно-съдовите заболявания. Механизмите на неговия вазопротективен ефект са комплексни и включват промени в ендотелната функция, пролиферацията на съдовите гладкомускулни клетки, съдовата реактивност и липидния метаболизъм. По-нататъшни изследвания са необходими за оптимизирането на диагностиката и лечението на артериалната хипертония при жени в менопауза.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: артериална хипертония, менопауза, хормонално заместително лечение.

Климактериумът е физиологичен процес, свързан с възрастта, и представлява постепенен преход от репродуктивния към нерепродуктивния период от живота на жената. Приема се, че жената е в менопауза, ако е налице аменорея поне една година след последната спонтанна менструация. Менопаузата настъпва на възраст около 51 години след един по-кратък или по-продължителен период на менструални нарушения. Понастоящем около 95% от жените в развитите страни доживяват периода на менопаузата. Допуска се, че към 2000 г. около една четвърт от населението на земята ще се пада на жените на възраст над 45 години. Поради повишената продължителност на живота периодът на менопаузата обхваща почти една трета от живота на жената. Това определя нарастващия интерес към групата на жените в пре- и постменопауза и към проблемите, свързани с тяхното здраве.

Сърдечно-съдовите заболявания са ос-

se“ contributes to the age-related increase in blood pressure in women is controversial. Cross-sectional studies have established higher blood pressure among post-menopausal than premenopausal women at a certain age, while longitudinal studies have not confirmed these findings.

Hormone replacement therapy is the basis of current prevention of cardiovascular diseases. The mechanisms of its vasoprotective effect are complex and involve alterations in endothelial function, smooth muscle cell proliferation, vascular reactivity and in lipid metabolism. Further studies are needed to optimize the diagnosis and treatment of arterial hypertension in menopausal women.

KEY WORDS: arterial hypertension, menopause, hormone replacement therapy.

новна причина за смърт при жените в менопауза. Смъртността от сърдечно-съдови заболявания превишава общата смъртност от онкологични заболявания и два пъти – смъртността от рак на гърдата (9). Артериалната хипертония (АХ) играе главна роля за развитието на исхемична болест на сърцето, сърдечна недостатъчност, мозъчно-съдова болест и е основен рисков фактор за смърт от сърдечно-съдови заболявания (3). По данни на СЗО 8–18% от населението на земята страда от АХ. В развитите страни честотата ѝ достига 20%. У нас броят на хипертониците е около 1 500 000 (18% от населението).

Протичането на АХ и отговорът на болните към лечението с антихипертензивни средства показват големи индивидуални особености, както и различия по пол и раса. Повечето ръководства по хипертензиология, в т. ч. VI доклад на Обединения национален комитет на САЩ (JNC VI) (10) не отчитат достатъчно ясно разликите, свързани с пола, в ди-

агностиката и лечението на АХ. Във всички етнически групи мъжете показват по-високо кръвно налягане в сравнение с жените (2). Разликата по пол се изяснява в юношеския период, запазва се в зряла възраст, а след шестата декада почти изчезва (8, 30). Редица трансверзални проучвания показват дори „преобръщане“ на честотата на АХ с напредване на възрастта в полза на жените (2, 13). Данните от 30-годишно лонгитудинално проучване (Framingham Study) не потвърждават тази теза. Те показват, че с напредване на възрастта систоличното кръвно налягане при жените се доближава до това на мъжете, но не го превишава. Диастоличното кръвно налягане остава по-ниско при жените в сравнение с мъжете при всички възрастови групи и се понижава и при двата пола след 65-годишна възраст (27). Въпреки че АХ превалява при мъжете, абсолютният брой на жените хипертонички е по-висок поради по-голямата продължителност на живота им (1). АХ е важен проблем за възрастните жени, тъй като честотата и при тях достига до 80%.

Влиянието на менопаузата „per se“ върху артериалното налягане е недостатъчно проучен въпрос и е обект на дебати. Отново лонгитудиналните проучвания (16, 26) не отчитат повишение на кръвното налягане с настъпването на менопаузата, докато при трансверзалните проучвания (24, 29) то е значимо повишено при менопаузни жени. Staessen et al. (24) установяват 4 пъти по-висока честота на АХ при менопаузни жени в сравнение с тези в репродуктивна възраст.

В друго проучване резултатите от 24-часовото амбулаторно мониториране на артериалното налягане при нормотонички показват, че то е по-високо при жените в менопауза в сравнение с тези в пременопауза (18).

Повишението на артериалното налягане в периода на менопаузата се отдава на различни фактори (3, 11):

- естрогенов дефицит;
- активиране на хипоталамо-хипофизно-надбъбречната ос;
- недостатъчно контрабалансиране на ефекта на надбъбречните андрогени;

- увеличение на телесното тегло, съпътстващо менопаузата;

- повишени еритроцити, хемоглобин, кръвен вискозитет, кръвен обем след спиране на менструалните кръвотечения;

- комбинация от тези и други неизяснени неврохуморални фактори.

Няколко клинични проучвания, проведени при различни етнически групи, дават основания да се допусне, че при менопаузните жени нивото на артериалното налягане е в по-голяма степен зависимо от натриевия хлорид в сравнение с мъжете на същата възраст (17, 25).

Tominaga et al. (25) намират обратна корелационна зависимост между плазмените нива на пролактина, естрадиола и прогестерона и чувствителността на кръвното налягане към натриев хлорид. Тези резултати дават основание на авторите да допуснат, че зависимостта на артериалното налягане от натриев хлорид и понижената секреция на яйчникови хормони са взаимно свързани и заедно участват в генезата на АХ при менопаузни жени.

Хормоналното заместително лечение (ХЗЛ) е основа на съвременната профилактика срещу сърдечно-съдовите заболявания при жени в менопауза. Метаанализите показват намаление с 40–50% на риска от сърдечно-съдови и с 30–50% на риска от мозъчно-съдови усложнения при жени в менопауза на ХЗЛ (4). Въпросът за показанията и противопоказанията на ХЗЛ при менопаузни жени с АХ се дискутира много – поради неправилната аналогия, която се прави с оралните контрацептивни средства.

Контрацептивните медикаменти са съставени от синтетични естрогени във високи дози с цел блокиране на овулацията. Те са противопоказани при хипертонички във фертилна възраст. Трябва се отбележи, че новите орални контрацептивни средства са с по-ниски дози на естрогените, не повишават кръвното налягане и нямат неблагоприятен ефект върху сърдечно-съдовата система. За разлика от контрацептивите ХЗЛ се провежда с естествени естрогени (конюгирани естрогени – САЩ, или 17-β естрадиол – Европа).

ВАЗОПРОТЕКТИВЕН ЕФЕКТ НА ЕСТРОГЕНИТЕ (5, 22, 23)

Директни ефекти:

- намаляват пролиферацията на съдовите гладкомускулни клетки;
- инхибират образуването на екстрацелуларен матрикс;
- инхибират навлизането на калций в съдовите гладкомускулни клетки;
- активират калиевите канали;
- потискат активността на конвертиращия ензим;
- намаляват съдовата контракция;
- намаляват агрегацията на тромбоцитите;
- понижават нивото на инхибитора на плазминогенния активатор (PAI-1);
- стимулират освобождаването на азотен окис и простаглицин от съдовия ендотел;
- повишават ангиогенезата.

Индиректни ефекти:

- повишават високоплътностните липопротеини (HDL);
- намаляват нископлътностните липопротеини (LDL);
- понижават липопротеин А (LpA);
- имат антиоксидантни свойства.

Понастоящем се приема, че високото кръвно налягане не е противопоказание за започване на ХЗЛ (10).

Какви са условията, които трябва да се спазват, при включване на жени с АХ на ХЗЛ (20):

- добре контролирано артериално налягане с обичайните антихипертензивни средства;
- преценка на рисковете, свързани със скорошно усложнение на АХ;
- ХЗЛ е противопоказано при нелекувана и малигна АХ;
- в хода на ХЗЛ е необходим контрол на артериалното налягане – отначало един път месечно, след това – на всеки три месеца през първата година, а по-нататък – един път годишно.

Лечението с перорални форми води до по-висока концентрация на естрогените в сис-

темата на *vena portae* в сравнение със системното кръвообращение. Естрогените стимулират синтеза на различни чернодробни протеини (ангиотензиноген, фибриноген), които променят профила на съдовия риск и параметрите на хемостазата. Теоретично идеалното ХЗЛ трябва да осигури пременопаузно ниво на естрадиола и избягване на ефекта на първото преминаване през черния дроб (first-pass effect). По тази причина повечето ръководства препоръчват ХЗЛ при хипертонички да се провежда с парентерални форми на естрогените, чрез които се заобикаля ентерохепаталното кръвообращение – трансдермални пластири, субдермални пелети, вагинални кремове и т.н. Други данни показват, че при продължително ХЗЛ *per os* повишеното ниво на ангиотензиногена не се придружава с повишение на артериалното налягане (6). В следващите години вероятно ще се направи преоценка на индикациите за приложение на пероралните форми на естрогените при менопаузни жени с АХ. Те сигурно ще намерят място в ХЗЛ при хипертонички наред с трансдермалните.

КОИ ПРОГЕСТИНИ ДА ИЗБЕРЕМ?

Колкото повече се отдалечават от естествения прогестерон и се доближават до андрогените, толкова повече се увеличават възможностите за странични ефекти. Основните са повишение на телото (анаболен ефект) и натриева задръжка. И двата фактора благоприятстват повишаването на кръвното налягане. Експериментални данни показват, че прогестеронът и някои синтетични прогестини са артериоконстриктори и венодилатори (14). При жени с допълнителни рискови фактори прогестините могат да задълбочат риска от тромбози на дълбоките вени и ИБС, особено ако естрогенната съставка е недостатъчна.

ЕФЕКТИ НА ХЗЛ ВЪРХУ КРЪВНОТО НАЛЯГАНЕ ПРИ ЖЕНИ С НОРМАЛНО АРТЕРИАЛНО НАЛЯГАНЕ

Проучванията показват, че ХЗЛ:
– само с естрогени,

- естрогени + прогестини,
- перорално,
- трансдермално

не води до повишение на кръвното налягане или го понижава.

ЕФЕКТИ НА ХЗЛ ПРИ МЕНОПАУЗНИ ЖЕНИ С АХ

За съжаление, липсват достатъчно данни за категорични изводи по този въпрос. Трудностите идват и от факта, че в много студии преди 80-те години наличието на АХ е относително противопоказание за включване на ХЗЛ. Оскъдните изследвания върху малки групи болни показват, че ХЗЛ няма неблагоприятен ефект върху артериалното налягане. В ход са контролирани проучвания, резултатите от които се очакват в следващите години.

Те ще дадат отговор на два основни въпроса:

1. Променя ли ХЗЛ ефекта на класическото антихипертензивно лечение?
2. Кои са най-подходящите комбинации на медикаменти от тези два класа?

ОСНОВНИ ПРИНЦИПИ НА ЛЕЧЕНИЕТО НА АХ ПРИ ЖЕНИ В МЕНОПАУЗА

– Жените са по-добре информирани от мъжете за рисковете, които носи високото кръвно налягане.

– Те показват по-голямо сътрудничество при провеждане на лечението.

– При жените се постига по-добър контрол на артериалното налягане в сравнение с мъжете.

Основни принципи на **немедикаментозната терапия**:

- редукция на теглото;
- диета с ниско съдържание на готварска сол;
- намален прием на животински мазнини;
- умерена физическа активност;
- умерен прием на алкохол;
- спиране на тютюнопушенето.

Медикаментозна терапия. Липсват контролирани клинични проучвания, които убедително да показват предимствата на даден антихипертензивен препарат при жени. Жените отговарят на антихипертензивното лечение подобно на мъжете, но някои особености трябва да се имат предвид.

Диуретици: предпочитани медикаменти при жени с нискоренинова, сол-чувствителна и обемен тип АХ. Тиазидните диуретици повишават костната плътност и намаляват риска от фрактури с 20% (5). Комбинацията на тиазидни диуретици + ХЗЛ изглежда интересна перспектива.

Бета-блокери: Налага се становището, че бета-блокери са по-малко ефективни при жените в сравнение с мъжете (15). Липсват данни за кардиопротективен ефект на комбинацията бета-блокери + ХЗЛ. Теоретично ще се предпочитат при менопаузни жени, прекарвали миокарден инфаркт, и такива с мигренозно главоболие.

АСЕ-инхибитори: Експериментални и клинични данни с Moexipril поставят интересни въпроси:

- наличие на тъканна ренин-ангиотензинова система в костите;
- роля на ангиотензин I и ангиотензин II в остеоκласната костна резорбция (28).

Теоретично АСЕ-инхибиторите биха могли да имат остеопротективен ефект. На този етап клиничният опит е показал само неутрален ефект по отношение на костите. Комбинацията Moexipril + thiazide се е оказала по-ефективна при жените в сравнение с мъжете по отношение на кръвното налягане. Обещаваща изглежда комбинацията АСЕ-инхибитор + ХЗЛ (адитивен ефект).

Калциеви антагонисти: Едно скорошно проучване с Amlodipine върху 1084 болни от АХ показва значимо по-добър ефект на медикамента при жените в сравнение с мъжете (12). Добавянето на ХЗЛ не е повлияло съществено антихипертензивния ефект на Amlodipine.

Обобщавайки горните данни, може да се предложи следната схема за лечението на АХ при жени в менопауза:

1. При липса на противопоказания – монотерапия в следния ред:
 - тиазиди;
 - калциеви антагонисти;
 - АСЕ-инхибитори;
 - бета-блокери.
2. При съпътстващи заболявания се предпочитат съответно:
 - ИБС – бета-блокери, калциеви антагонисти;
 - сърдечна недостатъчност – АСЕ-инхибитори, диуретици;
 - захарен диабет – АСЕ-инхибитори;

- ХОББ – калциеви антагонисти;
- дислипидемии – алфа-блокери;
- болест на Raynaud – калциеви антагонисти, АСЕ-инхибитори.

Днес никой не оспорва благоприятния ефект на ХЗЛ върху глобалния сърдечно-съдов риск. Необходимо е натрупване на повече информация за особеностите в протичането и лечението на артериалната хипертония при жени в менопауза, както и за ролята на ХЗЛ при тези болни. Отговор на въпросите ще дадат вероятно резултатите от две големи проучвания, които са в ход: продължението на PEPI Trial (19) и на Women's Health Initiative. Второто включва над 150 000 жени и ще завърши през 2007 г.

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Anastos, K., P. Charney, R. A. Charon et al. Hypertension in Women: What is Really Known? The Women's Caucus, Working Group on Women's Health of the Society of General Internal Medicine. *Ann. Intern. Med.*, 115, 1991, 287–293.
2. Burt, V. L., P. Whelton, E. J. Roccella et al. Prevalence of Hypertension in the US Adult Population. Result from Third National Health and Nutrition Examination Survey 1988–1991. *Hypertension*, 25, 1995, 305–313.
3. Calhoun, D. A., S. Oparil. High Blood Pressure in Women. *Int. J. Fertil.*, 42, 1997, 198–205.
4. Gaspard, U. Impact cardiovasculaire du traitement hormonal substitutif en post ménopause; nouvelles données. *Rev. Med. Liege*, 52, 1997, 224–229.
5. Hanes, D. S., M. R. Weir. Gender Considerations in Hypertension Pathophysiology and Treatment. *Am. J. Med.*, 101 (suppl. 3A), 1996, 10s–21s.
6. Hassager, C., B. J. Riis, V. Strom et al. The Long-term Effect of Oral and Percutaneous Estradiol on Plasma Renin Substrate and Blood Pressure. *Circulation*, 76, 1987, 753–758.
7. Hazzard, W. R. Estrogen Replacement and Cardiovascular Disease: Serum Lipids and Blood Pressure Effects. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 161, 1989, 1847–1853.
8. Himmelmann, A., A. Svensson, L. Hansson. Influence of Sex on Blood Pressure and Left Ventricular

Mass in Adolescents: The Hypertension of Pregnancy Offspring Study. *J. Human Hypertens.*, 8, 1994, 485–490.

9. Jackson, G. Hypertension in Women. Schwarz Pharma Martin Dunitz, London, 1996, 1–81.
10. Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. The Sixth Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. *Arch. Intern. Med.*, 157, 1997, 2413–2446.
11. Kaplan, N. M. The Treatment of Hypertension in Women. *Arch. Intern. Med.*, 155, 1995, 563–567.
12. Kloner, R. A., J. R. Sowers, G. F. Di Bona et al. Sex- and Age-related Antihypertensive Effects of Amlodipine. *Am. J. Cardiol.*, 77, 1996, 713–722.
13. Kotchen, J. M., H. E. MacKean, T. A. Kotchen. Blood Pressure Trends with Aging. *Hypertension*, 4, 1982, III-128–III-134.
14. Kuhl, H. Progestins and Vascular Function. *Drugs of Today*, 32 (suppl. H), 1996, 25–31.
15. Lewis, E. L. Characteristics and Treatment of Hypertension in Women: A Review of the Literature. *A. J. Med. Sci.*, 311, 1996, 193–199.
16. Matthews, K. A., E. Meilahan, L. H. Kuller. Menopause and Risk Factors for Coronary Heart Disease. *N. Engl. J. Med.*, 321, 1989, 641–646.
17. Nestel, P. J., P. M. Clifton, M. Noakes et al. Enhanced Blood Pressure Response to Dietary Salt in Elderly Women, Especially those with Small Waist:Hip Ratio. *J. Hypertens.*, 11, 1993, 1387–1394.
18. Owens, J. F., C. M. Stoney, K. A. Matthews.

Menopausal Status Influences Ambulatory Blood Pressure Levels and Blood Pressure Changes during Mental Stress. *Circulation*, 88, 1993, 2794-2802.

19. The Writing Group for the PEPI Trial. Effects of Estrogen or Estrogen/Progestin Regimens on Heart Disease Risk Factors in Postmenopausal Women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. *JAMA*, 3, 1995, 199-208.

20. Plouin, P. F. Que reste-t-il des contre-indications du traitement hormonale de la menopause dans l'hypertension arterielle? *Rev. Prat.*, 7, 1993, 13-15.

21. Plouin, P. F. Influence des hormones sexuelles sur la pression arterielle. *Rev. Prat.*, 44 (suppl. 13), 1994, 33-35.

22. Schwartz, J., R. Freeman, W. Frishman. Clinical Pharmacology of Estrogens: Cardiovascular Actions and Cardioprotective Benefits of Replacement Therapy in Postmenopausal women. *J. Clin. Pharmacol.*, 35, 1995, 1-16.

23. Scafar, D. F., R. Xu, J. Morales et al. Female Sex Hormones and Cardiovascular Disease in Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82, 1997, 3913-3918.

24. Staessen, J., C. J. Bulpitt, K. Fagard et al. The Influence of Menopause on Blood Pressure. *J. Human Hypertens.*, 3, 1989, 427-433.

25. Tominaga, T., H. Suzuki, Y. Ogata et al. The Role of Sex Hormones and Sodium Intake in Postmenopausal Hypertension. *J. Human Hypertens.*, 5, 1991, 495-500.

26. van Berensteyn, E.C., M. A. van Hof, H. De Waard. Contributions of Ovarian Failure and Aging to Blood Pressure in Normotensive Perimenopausal women: A Mixed Longitudinal Study. *Am. J. Epidemiol.*, 129, 1989, 947-955.

27. Vokonas, P. S., W. B. Kannel, L. A. Cupples. Epidemiology and Risk of Hypertension in the Elderly. The Framingham study. *J. Hypertens.*, 6, 1988, 3-9.

28. Weber, M. A. The Treatment of Hypertension in Postmenopausal Women: Experience with Moexipril. In: Hypertension after Menopause. (Eds. M. Stumpel and A. Zanchetti). De Gruyter, Berlin. New York, 1997, 65-76.

29. Weiss, N. S. Relationship of Menopause to Serum Cholesterol and Arterial Pressure: The United States Health Examination Survey of Adults. *Am. J. Epidemiol.*, 96, 1972, 237-241.

30. Yong, L. C., L. H. Kuller, G. Rutan et al. Longitudinal Study of Blood Pressure Changes and Determinants from Adolescence to Middle Age. The Dormont High School Follow-up Study, 1957-1963 to 1989-1990. *Am. J. Epidemiol.*, 138, 1993, 973-983.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Доц. д-р С. Захаријева
Клиничен център по ендокринология и геронтология
ул. „Д. Груев“ 6, 1303 София

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Assoc. Prof. S. Zacharieva, MD
Clinical Center of Endocrinology and Gerontology
6, D. Gruev Str., 1303 Sofia, Bulgaria

Заболеваемост от инсулинозависим захарен диабет сред децата от Западна България (1989–1994)

Р. Савова¹, К. Калинов², С. Чавръкова³, К. Коприварова¹,
Г. Попова¹, С. Горанова⁴

¹ Държавна университетска болница по педиатрия – София

² Отделение по биостатистика, Национален център по здравеопазване – София

³ Православна поликлиника „Св. Лука“ с диабетен център – София

⁴ Клинико-рехабилитационно отделение за деца с диабет – Баня

Incidence of Type I (Insulin Dependent) Diabetes Mellitus among Children in Western Bulgaria (1989–1994)

R. Savova¹, K. Kalinov², S. Chavrakova³, K. Koprivarova¹,
G. Popova¹, S. Goranova⁴

¹ University Children's Hospital – Sofia

² Department of Biostatistics, National Center of Public Health – Sofia

³ Orthodoxal Polyclinic „Sv. Luka“, Diabetes Center – Sofia

⁴ Department for Clinical Rehabilitation of Children with Diabetes Mellitus – Bankja

Резюме

Цел на настоящото проучване е да се установи заболеваемостта от инсулинозависим диабет сред децата на възраст до 14 години в Западна България. Проучването е осъществено в областите София и Монтана с обща популация 2 807 000. Използвани са два независими източника на информация за децата с диабет: 1. Клиника по ендокринология и диабет, Университетска болница по педиатрия

Abstract

The aim of this study was to determine the incidence of type I (insulin dependent) diabetes mellitus among children aged 0-14 years in Western Bulgaria. The study included the region of Western Bulgaria with total population of 2 807 000. Two independent sources of data were used: 1. Notification of new cases in the Department of Diabetes, University Children's Hospital in Sofia; 2. Diabetes Outpatient Centre

– София; 2. Районни и общински центрове за диспансеризация и снабдяване с инсулин, в т. ч. Православна катедрална поликлиника с диабетен център „Св. Лука“ – София, и две детски рехабилитационни заведения. Степента на достоверност за събраните данни от двата източника е определена чрез capture-recapture метод.

За периода 1989–1994 г. са регистрирани общо 303 новозаболеми деца с инсулинозависим захарен диабет на възраст до 14 години. Процент на достоверност – 97.34%. Стандартизираната по пол и възраст средногодишна заболеваемост е 9.82/100 000 годишно (95% CI 8.72; 10.94). Варирането на същата по години е статистически незначимо ($\chi^2_5 = 4.2$, $p > 0.1$). Заболеваемостта сред момчетата превишава леко тази на момчетата (10.13/100 000 годишно срещу 9.54/100 000 годишно), но разликата е статистически незначима ($p = 0.255$). Пубертетната възраст (10–14 години) влияе значимо за нарастване на заболеваемостта сред двата пола в сравнение с по-малките възрастови групи (0–4 и 5–9 години) ($p < 0.001$). Анализирани по географски райони (бившите окръзи), заболеваемостта варира от 6.31 до 12.03/100 000 годишно, като е най-висока за София-град ($p < 0.1$). Като цяло за проучената област значимо по-висока честота на диабета в детската възраст се установява в градовете, отколкото в селата ($p < 0.004$).

Средногодишната стандартизирана заболеваемост от инсулинозависим захарен диабет при децата на възраст до 14 години за района на Западна България е сравнима със заболеваемостта, съобщена за повечето централноевропейски страни. Пубертетният период и урбанизацията влияят значимо за повишаване честотата на заболяването.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: инсулинозависим захарен диабет, деца, заболеваемост.

in Sofia, local hospitals, outpatient clinics and two sanatoria, providing patients with free of charge insulin. The completeness of ascertainment was done by capture-recapture method. In the period 1989-1994 303 newly diagnosed children with IDDM were registered with total ascertainment rate 97=34%. Mean annual age/sex specific incidence rate was 9.82/100 000/year (95% CI 8.72; 10.94). No significant temporal variation within years was observed ($\chi^2_5 = 4.2$ $p > 0.1$). A slight, but not significant predominance of the incidence rate among females existed (10.13/100 000/year for females vs 9.54/100 000/year for males, $p = 0.255$). Significantly higher incidence of IDDM was found in pubertal age group (10-14 years) compared to younger age groups (0-4 and 5-9 years) ($p < 0.001$). Incidence rate ranged within different geographical districts from 6.31 to 12.03/100 000/year, being higher in Sofia town ($p < 0.1$). Significantly higher incidence rate was found among urban residents compared to these from rural areas ($p < 0.004$). We concluded that the mean annual age/sex incidence rate of IDDM among children aged 0-14 years or under in Western Bulgaria is comparable to those, reported from other Central European countries. Significant influence of pubertal age and urbanisation for increasing of incidence of IDDM was established.

KEY WORDS: Type I (insulin dependent) diabetes mellitus, children, incidence rate.

Това проучване беше осъществено с финансова подкрепа в рамките на проекта EURODIAB, за което изказваме благодарност.

УВОД

Диабетът е хронично заболяване с нарастваща честота в световен мащаб и висока цена, свързана с лечението и социалното осигуряване на засегнатите индивиди. Съвременните епидемиологични студии върху разпространението и клиничната характеристика на диабета имат за цел да хвърлят повече светлина върху неговата етиология, както и да подпомогнат планирането на средствата за неговото лечение и профилактика.

В нашата страна първото национално проучване на честотата на диабета в детската възраст от В. Цанева за периода 1973–1982 г. (2) установява средна за страната заболеваемост от 6.0/100 000 годишно (95% CI 4.85; 7.75) и приблизително същата такава в Западна България.

През последните години много страни съобщават тенденция за нарастване честотата на детския диабет. Значимите географски разлики поставят въпроса за ролята на генетичната предиспозиция и факторите на околната среда. Те са обект на проучване в две многонационални студии – EURODIAB и WHO DIAMOND.

В нашата страна две географски области – Западна и Североизточна България, са включени в тези проекти.

Цел на настоящото проучване е да установи заболеваемостта от I тип (инсулинозависим) захарен диабет (ИЗЗД) при децата на възраст до 14 години в Западна България за периода 1989–1994 г., като се анализира влиянието на пола, възрастта и местоживеенето.

МАТЕРИАЛ И МЕТОД

Проучването включва областите София и Монтана, с обща популация 2 807 000 и площ 30 896 km². Голяма част от населението е концентрирано в София-град – 1 114 900 (включващ няколко прилежащи села). Анализирани са също данните за отделните 7 бивши окръга, както и за градското и селското население като цяло. Използвани са два независими източника за регистрация на децата с диабет:

1. Клиника по ендокринология и диа-

бет към Университетска болница по педиатрия, единственото специализирано стационарно детско заведение за Западна България.

2. Общински центрове за диспансеризация и снабдяване с инсулин, в т. ч. Православна катедрална поликлиника с диабетен център „Св. Лука“ – София, и две детски рехабилитационни заведения (Детски санаториум – Вършец, и Клинико-рехабилитационно отделение – Банкя).

Случаите с DIDMOAD синдром (Wolfram синдром), възрастов тип диабет в детството (MODY, NIDDM) и вторичен диабет при муковисцидоза (общо 8) са изключени от проучването. Данните за детското население са получени от Националния статистически институт. Степента на достоверност (Ascertainment rate) при два независими източника за регистрация на децата с диабет е изчислена чрез capture-recapture метод. Използвана е директна стандартизация с въвеждане на стандартна популация с еднакви по пол и възраст подгрупи (17). Деветдесет и пет процентни доверителни интервали са получени за стандартизирана заболеваемост, използвайки пуасоново разпределение, когато случаите са под 100 (7). Стандартен пуасонов регресионен модел е използван за анализ на различията в зависимост от възрастта, пола и местоживеенето и взаимодействието на тези променливи (8). Оценяването на коефициентите на модела е извършено със статистическия пакет EGRET (21). Точковият тест и тестът на максимално правдоподобното отношение са използвани за оценяване на статистическата значимост на всеки един отделен модел, както и за сравнение между моделите.

РЕЗУЛТАТИ

За периода 1989–1994 г. са регистрирани общо 303 случая на новодиагностициран захарен диабет при децата на възраст 0–14 години, като 295 от тях са лекувани в Клиниката по ендокринология и диабет.

Степента на достоверност при регистрацията на болните варира за различните окръзи между 85.7% и 100% (средно 97.34%). Стандартизираната по пол средногодишна за-

Таблица 1. Стандартизирана по пол заболеваемост с 95% доверителни интервали при момчета и момичета в зависимост от географския район

Table 1. Sex standardised incidence rate with 95% confidence limits among males and females related to the geographical region

Окръг/District	Момчета / Boys		Момичета / Girls		Общо / Total	
	C3/IR	95% CI	C3/IR	95% CI	C3/IR	95% CI
Монтана / Montana	8.14	3.73; 15.45	12.33	6.56; 21.08	10.19	6.38; 15.42
Враца / Vratsa	8.57	4.56; 14.66	7.62	3.80; 13.63	8.11	5.20; 12.06
Видин / Vidin	9.30	3.73; 19.15	11.36	4.90; 22.38	10.29	5.76; 16.96
Кюстендил / Kjustendil	4.09	1.11; 10.46	8.67	3.74; 17.08	6.31	3.26; 11.02
Перник / Pernik	10.08	4.61; 19.12	9.28	4.00; 18.29	9.69	5.64; 15.51
Благоевград / Blagoevgrad	8.52	5.28; 13.03	6.84	3.91; 11.11	7.70	5.52; 10.62
София-град / Sofia-city	11.93	9.42; 14.91	12.14	9.53; 15.24	12.03	10.11; 13.95
София-окръг / Sofia-district	6.63	3.31; 11.86	8.85	4.84; 14.85	7.71	4.99; 11.38
Общо / Total	9.54	8.02; 11.06	10.13	8.52; 11.74	9.82	8.72; 10.94

C3/IR

95% CI

Получер шрифт/Bold

средна заболеваемост на 100 000 за година / incidence rate per 100 000/year

95% доверителни интервали / 95% confidence limits

използвана нормална проксимация за CI / normal approximation was used for CI

болеваемост за целия период 1989–1994 г. е 9.82/100 000 годишно (95% CI 8.72; 10.94) (таблица 1). Няма значима разлика в заболеваемостта в зависимост от пола (момичета – 10.13/100 000 годишно, момчета – 9.94/100 000 годишно, $p=0.255$). Стандартизираната заболеваемост в отделните възрастови групи 0–4, 5–9 и 10–14 години е показана в таблица 2. Постъпковият пуасонов регресионен модел установи значимо по-висока честота в пубертетната възраст (10–14 години) в сравнение с по-малките възрастови групи (0–4 и 5–9 години) както за момчета, така и за момичета ($p<0.001$) (таблица 3). Варирането на заболеваемостта по години (8.14 /100 000 за 1989 г. до 11.88/100 000 за 1991 г.) е статистически незначимо ($\chi^2=4.2$, $p>0.1$) (фиг. 1).

Разликите в заболеваемостта по окръзи са също статистически незначими, но когато

тя се анализира поотделно за градско и селско население в цялата област, се установява значимо по-висока заболеваемост в градовете, най-висока в София-град – 12/100 000 годишно ($p<0.004$) (таблица 3).

Крайният пуасонов регресионен модел установи статистически значимо влияние на пубертетната възраст и урбанизацията за нарастване честотата на инсулинозависимия захарен диабет при децата.

ОБСЪЖДАНЕ

Нарастването на честотата на инсулинозависимия захарен диабет сред децата от Западна България от 6.0/100 000 годишно (1973–1982 г.) (2) до 9.8/100 000 годишно през периода 1989–1994 г. е в съответствие с тенденциите в повечето европейски страни (6).

Таблица 2. Заболеваемост по пол и възрастови групи в отделните окръзи (брой на случаите на 100 000 за година)
Table 2. Incidence rate related to sex and age in different geographical districts (number of cases per 100 000 per year)

Окръг/District	Момчета / Boys			Момичета / Girls		
	Възр. групи / Age groups			Възр. групи / Age groups		
	0-4	5-9	10-14	0-4	5-9	10-14
Монтана / Montana	2.99	13.68	7.41	18.70	5.68	13.11
Враца / Vratsa	4.25	8.04	12.76	2.21	6.34	13.51
Видин / Vidin	8.91	8.18	10.57	14.17	0.00	18.93
Кюстендил / Kjustendil	3.46	3.16	5.36	3.68	3.32	17.16
Перник / Pernik	11.77	6.60	11.93	0.00	6.87	18.42
Благоевград / Blagoevgrad	9.11	7.23	9.24	4.11	6.34	9.76
София-град / Sofia-city	5.15	11.83	17.52	9.84	11.50	14.54
София-окръг / Sofia-distr.	3.94	10.85	5.00	2.10	11.28	11.20
Общо / Total	5.84	9.76	12.39	7.27	8.45	14.00

Нарастването е пропорционално в повечето окръзи с изключение на София-град, където то е почти удвоено (6.77/100 000 годишно до 12.03/100 000 годишно). В границата до 10/100 000 годишно заболяемостта във възрастта до 14 години е съпоставима с тази в повечето централноевропейски и средиземноморски страни (9, 12). Тя е близка със заболяемостта в Белград – 9.7/100 000 годишно (23), но е по-висока от други съседни балкански страни: Букурещ – 3.5/100 000 годишно в началото на десетилетието (1981–1991 г.) (11), Загреб – 7.4/100 000 годишно (16), Словения – 6.5/100 000 годишно (9), Гърция – 6.3/100 000 годишно (4). Изненадващо ниска заболяемост е установена в Македония – 2.45/100 000 годишно за 1985–1991 г. (14), сравнена със съседния Благоевградски окръг, където средногодишната заболяемост през 1973–1982 г. е била 3.31/100 000 годишно (1), а в настоящото проучване е 7.7/100 000 годишно. Не може да се намери лесно обяснение на този факт, като се има предвид съседното географско разположение и етническата близост. За разликата

може да допринасят несъвпадението по време между посочените проучвания или неизвестни фактори на околната среда и бита, увеличаващи заболяемостта в Югозападна България.

За проучения период (1989–1994 г.) варирането на заболяемостта по години е незначимо. Липсата на епидемиологично проучване за периода 1983–1989 г. не позволява да се проследи динамиката в нарастването на заболяемостта. Отбелязаният пик през 1991 г. обаче кореспондира с данните, обобщени от L. G. Braun (3), който регистрира пик на заболяемост в Нова Зеландия и други страни по същото време, както и подобно явление в началото на 80-те години. Този феномен насочва за временно трансгранично действащи фактори на околната среда. Нашите резултати показват леко доминиране на честотата сред момичетата, както и в други страни със средна заболяемост, за разлика от страните с висока такава, където превалява мъжкият пол (3, 9).

Пубертетният пик в нашето проучване съответства на данните, съобщени от останалите страни. Пубертетният растежен скок и

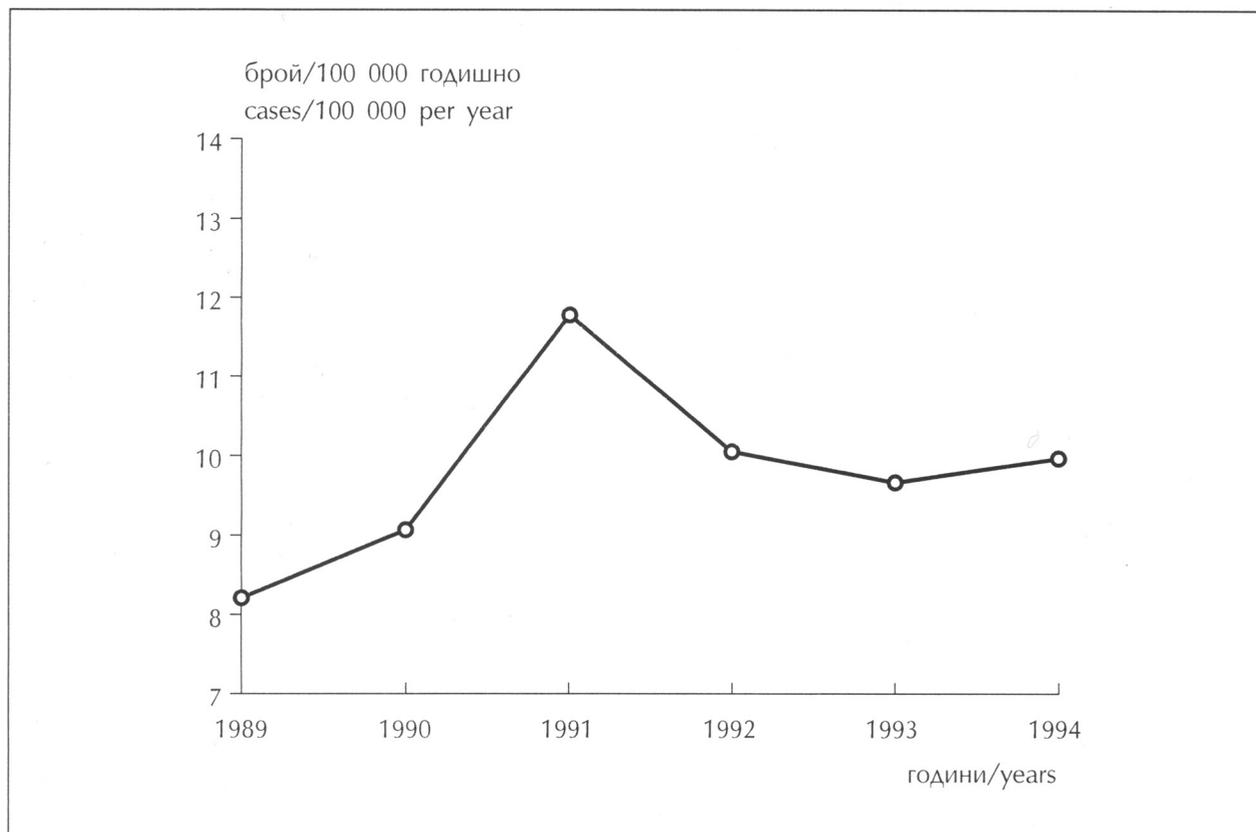
Таблица 3. Постъпков пуасонов регресионен модел
Table 3. Stepwise Poisson regression model

Променлива Variable	Точков тест за значимост Score test for significance	Степен на свобода Degree of freedom (DF)	Ниво на p p-value
Регион/District	6.832	7	0.447
Пол/Sex	1.294	1	0.255
Възраст/Age	19.87	2	<0.001
Град/село Urban/Rural	8.457	1	<0.004
Регион*Пол Region*Sex	3.611	7	0.823
Регион*Възраст Region*Age	13.11	14	0.518
Пол*Възраст Sex*Age	0.2925	2	0.864
(Град/село)*Регион (Urban/Rural)*Region	13.43	7	0.062
(Град/село)*Пол (Urban/Rural)*Sex	2.628	1	0.105
(Град/село)*Възраст (Urban/Rural)*Age	0.224	2	0.894
* Взаимодействие между две променливи / Interaction between two variables			

половото съзряване се осъществяват от хормони с мощен контраинсуларен ефект. Някои от тях, най-вече андрогените, създават и инсулинова резистентност. Така този възрастов период се оказва критичен за клиничната изява на инсулинозависимия захарен диабет. Специфичните фактори на околната среда в урбанизираните райони увеличават риска от развитие на захарен диабет. Данните от епидемиологичните проучвания за влиянието на урбанизацията в други страни са противоречиви. В Гърция се отбелязва нарастване на заболяемостта от селските към градските райони, като за Атина тя е 10.0/100 000 годишно (4). Подобна структура се съобщава за Павиа, провинция на Италия (22), и Западна Австралия (13). В други епидемиологични проучвания (10, 20) не се намира зависимост от големината на населените места. Доколкото много от водещите епидемиологични студии

не разглеждат нещата в този аспект поради твърде комплексния и неизяснен характер на факторите на околната среда, нашите проучвания се нуждаят от по-нататъшно анализиране. Големината на населените места у нас не винаги съответства на степента на индустриализация и замърсяване на околната среда, нито пък напълно охарактеризира бита и хранителните навици на населението. Компактността на населението обаче със сигурност има отношение към разпространението на някои вирусни инфекции. Едни от тях (Сохасі) се обвиняват в директно засягане на островния апарат, т. нар. инсулит, с вторично активиране на автоимунния отговор, докато широко разпространените респираторни и стомашно-чревни инфекции ускоряват клиничната изява на диабета чрез стреса и повишените инсулинови нужди по време на боледуването. Урбанизацията и съвременният стил на

Фиг. 1. Заболеваемост от ИЗЗД в детската възраст по календарни години (1989–1994 г.)
Fig. 1. Annual incidence rate of IDDM among children during 1989–1994



живот предполагат и намаляване на кърменето. Редица студии (5, 15, 18) обсъждат ранното въвеждане на адаптирани млека като причина за индуциране на автоимунния отговор по принципа на кръстосаната чувствителност, предвид сходството на антигени на белтъка на кравето мляко и такива от повърхността на β -клетката. В наши проучвания (19) 53.3% от българските деца с диабет са кърмени над 3 месеца и само 9.8% не са кърмени изобщо. По-съществено е обаче ранното, макар и краткотрайно въвеждане на адаптирани млека още в родилните домове, което е практика у нас.

Резултатите от EURODIAB и DIAMOND, както и нашите собствени бъдещи проучвания, ще хвърлят повече светлина върху

причините за развитие на захарния диабет в детската възраст и ще обяснят географските и расовите разлики в неговото разпространение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Средногодишната стандартизирана заболеваемост от инсулинозависим захарен диабет в детската възраст (0–14 години) за района на Западна България е 9.82/100 000 годишно и е сравнима с тази за другите средноевропейски и средиземноморски страни. Отбелязва се същата тенденция за нарастване през последното десетилетие. Пубертетният период и урбанизацията влияят значимо за нарастване честотата на диабета в детската възраст.

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Цанева, В. Епидемиология на захарния диабет в детската възраст в НР България. Дис. труд, София, 1986.
2. Цанева, В., М. Дамянова. Честота и разпространение на захарния диабет в детската възраст в НРБ. *Педиатрия*, 1986, 25 (4), 30–36.
3. Braun, L. G. Genetics and the Environment: Understanding Geographical Variations in the Incidence of Childhood Diabetes. *New Zealand Geographer*, 1993, 49 (2), 32–39.
4. Dacou-Voutetakis, C., K. Karavanaki, H. Tsoka-Gennatas. The Hellenic Epidemiology Study Group. National Data on the Epidemiology of IDDM in Greece. *Diabetes care*, 1995, 18, 552–554.
5. Dahlquist, G., L. Blom, G. Lonnberg. The Swedish Childhood Diabetes Study – a Multivariate Analysis of Risk Determinants for Diabetes in Different Age Groups. *Diabetologia*, 1991, 34, 757–762.
6. Diabetes Epidemiology Research International (DERI). Secular Trends in Incidence of Childhood IDDM in 10 countries. *Diabetes*, 1990, 39, 858–864.
7. Fisher, L. D., G. van Belle. Biostatistics. A Methodology for the Health Sciences John Willey & Sons, Inc., New York, 1993, 991.
8. Frome, E. L. The Analysis of Rates using Poisson Regression Models. *Biometrics*, 1983, 39, 665–674.
9. Green, A., E. A. M. Gale, C. C. Paterson for EURODIAB ACE Study Group. Incidence of Childhood-Onset Insulin-Dependent Diabetes Mellitus: the EURODIAB ACE Study. *Lancet*, 1992, 339, 905–909.
10. Grzywa, M. A., A. K. Sobel. Incidence of IDDM in the Province of Rzeszow, Poland, 0- to 29-Year-Old Age-Group, 1980-1992. *Diabetes care*, 1995, 18, 542–544.
11. Ionescu-Tirgoviste, C., E. Paterache, D. Cheta, E. Farcasiu, C. Serafinceanu, I. Minku. Epidemiology of Diabetes in Bucharest. *Diabet. Med.*, 1994, 11 (4), 413–417.
12. Karvonen, M., J. Tuomilehto, L. Libman, R. la Porte for the World Health Organisation DIAMOND Project Group. A Review of the Recent Epidemiological Data on the World-wide Incidence of Type 1 (Insulin Dependent) Diabetes Mellitus. *Diabetologia*, 1993, 36, 883–892.
13. Kelly, H. A., M. T. Russel, T. W. Jones, G. C. Byrne. Dramatic Increase in Incidence of Insulin Dependent Diabetes Mellitus in Western Australia. *Med. J. Aust.*, 1994, 161, 426–429.
14. Kosova, M., M. Trucco, M. Konstantinova, J. S. Dorman. A Cold Spot of IDDM Incidence in Europe, Macedonia. *Diabetes care*, 1993, 16, 1236–1240.
15. Mayer, E. J., R. F. Hamman, E. C. Gay, D. C. Lezotte, D. A. Savitz, G. J. Klingensmith. Reduced Risk of Type I (Insulin Dependent) Diabetes Mellitus among Breast-fed Children. *Diabetes*, 1988, 37, 1625–1631.
16. Roglic, G., I. Pavlic-Renar, S. Sestan-Crnek, M. Prasek, M. Kadrnka-Lovrenic, A. Radika, Z. Metelko. Incidence of IDDM during 1988–1992 in Zagreb, Croatia. *Diabetologia*, 1995, 38, 550–554.
17. Rothman, K. J. Modern Epidemiology. Little Brown & Co, Boston/Toronto, 1986, 358.
18. Savilahti, E., H. K. Akerblom, V-M. Tainio, S. Koskimies. Children with Newly Diagnosed Insulin-Dependent Diabetes Mellitus Have Increased Levels of Cow's Milk Antibodies. *Diab. Research*, 1988, 7, 137–140.
19. Savova, R., G. Popova, K. Koprivarova, M. Konstantinova, B. Angelova, M. Atanasova, S. Goranova, V. Christov, K. Kalinov. Clinical and Laboratory Characteristics of Type I (Insulin Dependent) Diabetes Mellitus at Presentation among Bulgarian Children. *Diab. Res & Clin. Practice*, 1996, 34, 159–163.
20. Soltesz, G. IDDM in Hungarian Children: Population-based Clinical Characteristics and their Possible Implication for Diabetic Health Care. Hungarian Childhood Diabetes Epidemiology Study. *Pediatr. Padol.*, 1992, 27930, 63–66.
21. Statistics and Epidemiology Res. Corp. and Cytel Software Corp., EGRET Reference Manual, First Draft, Rev. 3, Seattle, 1992, 305.
22. Tenconi, M. T., G. Devoti, I. Albani, R. Lorini, M. Martinetti, P. Fratino, E. Ferrari, E. Ferrero, I. Severi. IDDM in the Province of Pavia, Italy, from a Population-Based Registry. *Diabetes care*, 1995, 18, 1017–1019.
23. Vlajinac, H., S. Sipetic, B. Adanja, M. Jarebinski. Incidence of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in the Population of Belgrade, 0–19 years of age, from 1990 to 1992. *Med. Pregl.*, 1994, 47 (1–2), 27–29.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Д-р Р. Савова
Държавна университетска болница по педиатрия
ул. „Д. Несторов“ 11, 1606 София

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

R. Savova, MD
University Children's Hospital
11, D. Nestorov Str., 1606 Sofia, Bulgaria

Хиперинсулинемия и отношението ѝ към хиперлипидемията и контрарегулаторните хормони при болни с миокарден инфаркт

Р. Кочич

Клиника по ендокринология към Университета в гр. Ниш,
Сърбия Югославия

Hyperinsulinemia and its Relationship with Hyperlipidemia and Counter-regulatory Hormones in Patients Surviving Myocardial Infarction

Kocić R.

Clinic of Endocrinology, University of Niš, Serbia, Yugoslavia

Резюме

Проучена е асоциацията между плазменото инсулиново ниво на гладно, нивото на серумните липиди и нивата на контрарегулаторните хормони при 42 болни с остър миокарден инфаркт, от които 18 болни с доказан в миналото неинсулинозависим захарен диабет и 24 болни без данни за такъв. Резултатите показват, че при втората група болни инсулиновите нива на гладно през първия и седмия ден от хоспитализацията са значимо по-високи в сравнение с тези при диабетичите. Установява се положителна корелация между инсулинемията и серумните нива на холестерола, LDL-холестерола, триглицеридите, пребеталипопротеините, най-висока спрямо Apoprotein B. Налице е отрицателна корелация спрямо HDL, HDL₂-холестерол и Apoprotein A.

Abstract

The association between free fasting plasma insulin level and myocardial infarction, as well as the correlation of insulin level with hyperlipidemia and the level of counterregulatory hormones was studied in 24 patients surviving myocardial infarction but with no history data of diabetes mellitus and in 18 patients with history of non-insulin dependent diabetes mellitus. The results of the patients surviving myocardial infarction were compared between the first and seventh day of hospitalization. Non-diabetic patients had higher insulin at first and seventh day of surviving of myocardial infarction. Analysing the correlation between insulin and plasma lipids, positive correlation was found between insulin and cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides, prebeta lipoproteins and especially high correlation with apoprotein

Анализът на данните от инсулинемията, отнесени спрямо нивата на контрарегулаторните хормони, показва по-висока положителна корелация с TSH, но негативна такава със серумния кортизол, въпреки повишените нива на последния в острата фаза на миокардния инфаркт.

Получените резултати доказват, че хиперинсулинемията е вероятен рисков фактор за развитие на атеросклероза и на коронарна болест, чийто ефект би могъл да се реализира чрез повлияване метаболизма на липопротеините.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: хиперинсулинемия, инфаркт на миокарда, неинсулинозависим захарен диабет.

INTRODUCTION

Many controversial studies and opinions have been published recently about the importance of insulin for the development of coronary heart disease (10, 19). There is a number of still unresolved questions, but many results support the hypothesis that hyperinsulinemia, reflecting the resistance to insulin-stimulated glucose uptake, as a common phenomenon plays central role in the pathogenesis and clinical course of coronary heart disease (16,20). The insensitivity to insulin has been observed in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus as well as in healthy individuals (5, 8,18). The Paris prospective study (5) revealed and established high insulin level as an independent risk factor for the development of coronary disease and myocardial infarction. Many animal studies have suggested that high insulin level as a potent mitogenic factor could be directly atherogenic (25, 26). Higher insulin level can lead to full development of arterial lesions influencing lipoprotein metabolism by increasing synthesis of arterial lipids (3, 11). Some earlier studies (14) established high insulin and glucose levels during myocardial infarction, but it was explained as a protective mechanism.

B level, but negative with the level of HDL and HDL₂-cholesterol as well as with apoprotein A level. Analysing the level of free fasting insulin with the level of counterregulatory hormones, higher positive correlation was found with TSH, but negative with cortisol level in spite of its increase during myocardial infarction. The results obtained indicated that hyperinsulinemia could not be excluded as a possible risk factor for atherosclerosis and coronary disease, but most probably it may be a factor that could influence other risk factors especially plasma lipoprotein metabolism.

KEY WORDS: hyperinsulinemia, myocardial infarction, non-insulin dependent diabetes.

The Busselton study (27) introduced the concept of sex-related difference of insulin level, with greater prediction of high insulin in men than in women.

The aim of the present study was to establish whether free fasting insulin level was elevated in patients with acute myocardial infarction with no clinically diagnosed diabetes mellitus, as well as in non-insulin dependent diabetic patients and to study the time dependence from the onset of myocardial infarction. The aim was also to establish the correlation between free fasting insulin level and plasma lipoproteins as a known risk factor for development of coronary heart disease and to examine the correlation between insulin and counterregulatory hormones. To avoid the acute stress-induced reactions due to infarct pain, all biochemical analyses were made at first day and after seven days.

SUBJECTS AND METHODS

Clinical Assessment

The present study was carried out on unselected subjects. Patients with acute myocardial infarction (n = 42) were admitted to the hospital with symptoms of severe chest pain. The

delay from onset of symptoms before the admission to hospital varied from 0,5 to 6 hours. They proved to have suffered myocardial infarction documented by long lasting severe precordial pain, subsequent development of Q wave in the electrocardiogram and characteristic changes of the activity of blood enzymes (aspartate aminotransferase, creatine kinase and lactate dehydrogenase). All patients were admitted to a coronary intensive care unit and underwent continuous cardiac monitoring during their stay in the unit. All patients with acute myocardial infarction were divided into four groups (two of men and two of women): without case history data of diabetes mellitus (men and women) and with history of non-insulin dependent diabetes mellitus. All patients with non-insulin dependent diabetes mellitus were taking hypoglycemic agents (sulphonylurea and biguanides).

Biochemical analyses

All blood specimens were taken at admission and at seventh day after 12-hour fasting. Plasma free fasting insulin, C-peptide, cortisol and thyroid hormones were determined by commercial radioimmunoassay methods (Inep-Vinca-Yugoslavia; for T3 cat. number R-T-001; T4; T-002, TSH; T-005, cortisol RIA-M-001, free insulin M-003, C-peptide Novo-Nordisk). Blood glucose level was measured by the glucose-oxi-

dase method (Boehringer Mannheim). The value of cholesterol and HDL-cholesterol was determined by the CHOL-PAP enzymatic method. HDL-cholesterol was measured enzymatically after polyanionic precipitation of low density lipoproteins. HDL₂ subfraction was isolated after precipitation with dextran-sulphate (23). Triglycerides were determined by an exclusively enzymatic method according to Boehringer. Apoproteins A and B were determined by the method of radial immunodiffusion (Behring). Electrophoresis of lipoproteins was performed using Cellomatic electrophoretic strips using Chemetron (Milano) system. The LDL level was calculated mathematically – Friedewald formula (6) as well as the atherogenic index (AI = chol/HDL chol).

RESULTS

Characteristics of the subjects included in the study are shown in table 1. Free fasting insulin had a higher than normal value (4-25 mU/l) in groups of patients with clinically manifested diabetes mellitus and especially in groups with no history data of diabetes. Accordingly in diabetic patients surviving myocardial infarction glucose level was above 10 mmol/l. The level of cholesterol, HDL-cholesterol as well as its subfraction HDL₂-cholesterol

Table 1. Fasting glucose, free fasting insulin and C peptide level in investigated patients on admission (1st day) and 7 days after ($\bar{x} \pm SD$)

Groups	Glucose 1st day	Glucose 7th day	Insulin 1st day	Insulin 7th day	C-peptide 1st day	C-peptide 7th day
M No DM	6.38 ± 1.2	4.87 ± 0.8	37.02 ± 5.08	30.25 ± 4.64	3.18 ± 0.22	3.3 ± 0.63
M NIDDM	10.1 ± 1.9***	10.3 ± 1.0**	29.65 ± 7.2*	27.36 ± 6.16	2.5 ± 0.65	2.1 ± 0.83
F No DM	6.62 ± 1.23	5.03 ± 0.96	31.56 ± 5.03	28.7 ± 2.4	2.17 ± 0.38	2.03 ± 0.26
F NIDDM	11.1 ± 1.8***	7.8 ± 1.1**	28.96 ± 6.16	26.2 ± 2.5	1.9 ± 0.7	1.8 ± 0.6

Glucose (mmol/l) – normal value 3.-6.1 mmol/l; insulin (mU/l) – normal value 4-25 mU/l; C-peptide (pmol/l) – normal value 1.5-3 pmol/l * p<0.05; *** p<0.001 statistically significant compared with the corresponding group.

and LDL-cholesterol is shown in table 2a. The level of cholesterol and LDL cholesterol was significantly above normal value in both groups of men, as well as in women with NIDDM. The level of HDL-cholesterol was especially decreased in groups of women with NIDDM, compared with that of the corresponding group without clinically manifested diabetes mellitus. HDL₂-cholesterol was decreased in all investigated groups, but especially in groups of women with NIDDM. The level of triglycerides as well as pre beta lipoproteins was investigated in non-

insulin dependent diabetic women. It tended to decrease after seven days (table 2b)

Analysing the apoprotein A and B level (table 2c) in our study subgroups it became apparent that the level of apo A was decreased in all investigated groups and the level of apo B was increased in diabetic patients, especially in diabetic women.

The level of cortisol and thyroid hormones is shown in table 3. Most indicative was the increase of cortisol level but it decreased after seven days. Analysing the level of thyroid

Table 2a. Cholesterol, HDL-cholesterol, HDL₂-cholesterol and LDL-cholesterol in investigated groups ($\bar{x} \pm SD$)

Groups	Cholesterol 1st day	Cholesterol 7th day	HDL-cholesterol 1st day	HDL-cholesterol 7th day	HDL ₂ -cholesterol 1st day	HDL ₂ -cholesterol 7th day	LDL-cholesterol 1st day	LDL-cholesterol 7th day
M No DM	7.92 ± 0.61	7.12 ± 0.81	1.17 ± 0.05	1.2 ± 0.06	0.17 ± 0.2	0.19 ± 0.08	5.85 ± 0.39	5.01 ± 0.87
M NIDDM	7.73 ± 0.47	6.95 ± 0.41	0.92 ± 0.04*	0.94 ± 0.04	0.28 ± 0.2	0.21 ± 0.05	5.45 ± 0.54***	5.31 ± 0.68
F No DM	6.28 ± 0.32	5.83 ± 0.27	0.87 ± 0.02	0.9 ± 0.03	0.28 ± 0.4	0.19 ± 0.04	4.48 ± 0.63	4.48 ± 0.67
F NIDDM	7.6 ± 0.43***	6.87 ± 0.83	0.72 ± 0.03	0.74 ± 0.04	0.15 ± 0.1*	0.16 ± 0.05	6.8 ± 0.84***	5.9 ± 0.91

Cholesterol (mmol/l) – normal value 3.5-7.5 mmol/l; HDL-cholesterol (mmol/l) – normal value 0.86-1.5 mmol/l (M) and 1.0-1.7 mmol/l (W); HDL₂-cholesterol (mmol/l) – normal value up to 0.3 mmol/l; LDL-cholesterol (mmol/l) – normal value 2.8-4.6 mmol/l. * p<0.05 and *** p<0.001 statistically significant compared with the corresponding group.

Table 2b. The level of triglycerides, preβlipoproteins and atherogenic index (A) in investigated groups ($\bar{x} \pm SD$)

Groups	Triglycerides 1st day	Triglycerides 7th day	Pre-beta lip. 1st day	Pre-beta lip. 7th day	AI 1st day	AI 7th day
M No DM	1.55 ± 0.18	1.28 ± 0.16	0.23 ± 0.06	0.29 ± 0.05	4.91 ± 0.75	4.87 ± 0.59
M NIDDM	1.59 ± 0.19	1.24 ± 0.21	0.22 ± 0.06	0.20 ± 0.04	6.31 ± 0.63***	5.51 ± 0.61
F No DM	1.46 ± 0.28	1.42 ± 0.19	0.23 ± 0.05	0.23 ± 0.03	6.21 ± 0.36	5.74 ± 0.49
F NIDDM	2.8 ± 0.32	1.93 ± 0.21*	0.29 ± 0.07**	0.27 ± 0.06	9.55 ± 0.63***	8.28 ± 0.6

Triglycerides (mmol/l) – normal value 0.82-1.97 mmol/l; pre-beta lipoproteins – normal value 0.05-0.23; AI – normal value should not exceed 3. * p<0.05 and *** p<0.001 statistically significant compared with the corresponding group of diabetics without complications.

Table 2c. The level of apoproteins A and B in investigated groups ($\bar{x} \pm SD$)

Groups	Apo A 1st day	Apo A 7th day	Apo B 1st day	Apo B 7th day
M No DM	0.73 ± 0.003	0.89 ± 0.04	1.46 ± 0.22	1.53 ± 0.24
M NIDDM	0.56 ± 0.04***	0.74 ± 0.05*	1.91 ± 0.41*	1.99 ± 0.54
F No DM	0.62 ± 0.02	0.67 ± 0.04	1.38 ± 0.33	1.48 ± 0.26
F NIDDM	0.87 ± 0.06***	0.88 ± 0.02	3.13 ± 0.62**	3.04 ± 0.36***

Apo A (g/l) – normal value 1.6-3.3 g/l; Apo B (g/l) – normal value 0.6-1.5 g/l

* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ statistically significant compared with the corresponding group.

Table 3. The level of cortisol, T3, T4 and TSH in investigated groups

Groups	Cotrisol 1st day	Cortisol 7th day	T3 1st day	T3 7th day	T4 1st day	T4 7th day	TSH 1st day	TSH 7th day
M No DM	327.2 ± 11.2	246.2 ± 15.2 ⁺⁺	2.19 ± 0.31	1.99 ± 0.37	143.0 ± 7.2	120.0 ± 2.9	4.63 ± 0.23	3.99 ± 0.36
M NIDDM	384.3 ± 9.2 ^{***}	283.6 ± 13.5 ⁺⁺	1.27 ± 0.23	1.2 ± 0.22	147.5 ± 5.1 ^{***}	140.7 ± 2.6	4.52 ± 0.25 ^{***}	3.87 ± 0.89
F No DM	297.3 ± 12.2	199.2 ± 13.2	1.67 ± 0.25	1.43 ± 0.16	161.8 ± 6.9	144.5 ± 3.9	7.91 ± 0.31	5.48 ± 0.68
F NIDDM	292.3 ± 11 ^{***}	254.4 ± 14.9	1.84 ± 0.11	1.73 ± 0.11	139.7 ± 4.9 ^{***}	126.3 ± 1.9	12.53 ± 0.72 ^{***}	10.78 ± 0.5

Cortisol (nmol/l) – normal value 50-250 nmol/l; T3 (nmol/l) – normal value 1.2-3 nmol/l; T4 (nmol/l) – normal value 55-165 nmol/l; TSH (U/l) – normal value 0-6 U/l; * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ statistically significant compared with the corresponding group; ++ $p < 0.01$ statistically significant difference between 1st and 7th day

hormones it is important to note that the level of TSH was high in patients surviving myocardial infarction and the highest levels were registered in women. There was no consistent association between plasma insulin level and glucose level in men surviving myocardial infarction with no clinically manifested diabetes. But in women the correlation was positive. The correlation between insulin and glucose level was highly positive in men, non-insulin dependent diabetic patients. In non-insulin dependent diabetic women positive correlation was not found. Insulin and C-peptide level correlated positively in all

investigated groups. To investigate whether high fasting insulin level was associated with lipoprotein metabolism, correlations with all investigated lipid parameters were made (table 4). Positive correlation was found between insulin and cholesterol, LDL-cholesterol, tryglicerides, pre-beta lipoproteins and apo B. The highest positive correlation was registered for LDL-cholesterol in women without diabetes as well as for apo B in groups of men and women without diabetes. For diabetics the highest correlation was found with HDL- or HDL₂-cholesterol and negative correlation was found for apo A

Table 4a. Correlation between glucose, C-peptide and cholesterol subfractions and free fasting insulin level

Groups	I/G 1st day	I/G 7th day	I/C 1st day	I/C 7th day	I/Ch 1st day	I/Ch 7th day	I/HDL 1st day	I/HDL 7th day	I/LDL 1st day	I/LDL 7th day
M No DM	-0.1	0.16	0.44	0.38	0.26	0.32	-0.21	-0.21	0.12	0.12
M NIDDM	0.97**	0.46	0.67*	0.56*	0.59	0.47	-0.36	-0.2	0.19	0.19
F No DM	0.47	0.36	0.23	0.36	0.47	0.39	-0.1	-0.18	0.81**	0.54*
F NIDDM	-0.15	-0.12	0.34	0.32	0.16	0.27	-0.1	-0.16	0.23	0.36

* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ statistically significant correlation.
The correlations were made inside the investigated group.

Table 4b. Correlation between triglycerides, pre-beta lipoproteins and apoproteins A and B and free fasting insulin level

Groups	I/Trigl. 1st day	I/Trigl. 7th day	I/pre-beta 1st day	I/pre-beta 7th day	I/ApoA 1st day	I/ApoA 7th day	I/ApoB 1st day	I/ApoB 7th day
M No DM	0.4	0.29	0.18	0.14	-0.19	-0.24	0.86***	0.69*
M NIDDM	0.82**	0.56*	0.54*	0.46	-0.42	-0.36	0.49	0.49
F No DM	0.3	0.29	0.72*	0.56*	-0.24	-0.46	0.78***	0.49
F NIDDM	0.69***	0.49	0.38	0.41	-0.27	-0.41	0.44	0.56*

Table 5. Correlation between cortisol and thyroid hormones (T3, T4 and TSH) and free fasting insulin level

Groups	I/Cort 1st day	I/Cort 7th day	I/T3 1st day	I/T3 7th day	I/T4 1st day	I/T4 7th day	I/TSH 1st day	I/TSH 7th day
M No DM	-0.53*	-0.27	-0.18	0.08	-0.1	-0.12	0.25	0.36
M NIDDM	-0.36	-0.16	-0.42	-0.12	-0.42	-0.24	0.16	0.24
F No DM	0.24	0.32	0.08	0.12	0.8***	0.51*	-0.37	0.14
F NIDDM	-0.1	0.12	-0.38	-0.21	-0.12	0.08	0.14	0.21

* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ statistically significant correlation.
The correlations were made inside the investigated group.

level. Further evaluation of the correlation between the free fasting insulin level and the level of counterregulatory hormones indicated that it tended to be negative with cortisol level, except for women non-diabetics and positive with the level of TSH, except for women non-diabetics (table 5).

DISCUSSION

The main purpose of this study was to determine whether the association between free fasting plasma insulin level and other risk factors for myocardial infarction was similar in non-diabetic and diabetic subjects. To investigate this two types of analyses were made: comparison of obtained biochemical parameters between non-diabetic subjects and groups of men and women with NIDDM and acute myocardial infarction; comparisons of time dependence at first and seventh day after surviving of myocardial infarction. The aim of the study was also to establish whether high fasting insulin level could be an independent risk factor and its incidence. Higher insulin level in patients with myocardial infarction is evident in all investigated groups (table 2). The highest insulin level was observed in groups of men and women without clinically manifested diabetes mellitus and the highest peptide level was also observed in these groups. A slightly increased glucose level was observed in groups with no clinical history of diabetes. Among many metabolic alterations that can be seen during acute myocardial infarction, the most important and frequent is the alteration of carbohydrate metabolism, followed by impaired glucose tolerance (14). Myocardial ischemic injury is considered to be influenced by the balance between myocardial oxygen demand, myocardial oxygen supply and substrate availability. During myocardial injury glucose utilisation tended to be increased, since it is well documented that enhancement of glucose consumption decreases ischaemic injury. In vitro results indicated that the physiological homeostasis and surviving of myocardial cells is better in rich in glucose medium. Insulin can increase myocardial utilisation of carbohydrates, relative to free fatty acids, indicating a

favourable effect on myocardial metabolism. Insulin can also have a positive inotropic effect and can improve myocardial metabolism during acute ischaemic failure (21, 22). But the inverse correlation that was found between insulin level and coronary atherosclerosis, makes a new dimension of this observation with the hypothesis that decreased insulin response could be the first genetic marker of prediabetic state (20). High fasting insulin level could be an independent risk factor for coronary heart disease (17). Hyperglycemia that could be observed in patients with acute myocardial infarction could lead to manifested diabetes and is not a stress-induced phenomenon (13). The increased level of C-peptide in groups of patients with acute myocardial infarction without diabetes possibly reflects a defect in the biological activity of insulin, also preceded by an increased pancreatic secretion. The positive correlation found between insulin level and C-peptide and insulin and glucose confirms the fact that insulin resistance could probably be an underlying factor for the association between high fasting insulin level and coronary disease, i.e. myocardial infarction.

Cholesterol level was higher than normal in groups of patients surviving myocardial infarction. The level of HDL-cholesterol tended to be lower in patients surviving myocardial infarction. The level of HDL cholesterol is a function of its production and catabolic rate probably via LPL activity (1, 7). HDL-cholesterol data emerging from this study showed that as a single variable HDL cholesterol provided better means of discrimination between two groups of patients surviving myocardial infarction than did HDL₂-cholesterol metabolism, since HDL₂-cholesterol level is lower than normal range in all investigated groups. The level of LDL-cholesterol as well as the atherogenic index seems to give a better picture of lipoprotein changes relevant to myocardial infarction. A further evaluation of the correlation between the concentration of cholesterol and LDL-cholesterol with free fasting insulin level indicates a strong positive correlation except for men non-diabetics and negative correlation between insulin and HDL- or HDL₂-cholesterol. The negative correlation between insulin level and HDL- or HDL₂-cholesterol has

already been documented (15).

The apoprotein level appears to be the most sensitive marker of lipid metabolism disturbances. In all investigated groups the level of apo A and apo B and insulin are highly inter-correlated. This probably means that as single variables apoproteins A and B are better discriminators than the level of lipoprotein sub-fractions and that there was a strong similarity between the insulin-induced alterations of lipoprotein metabolism in diabetic and non-diabetic patients. In the group of women with NIDDM surviving myocardial infarction the most common finding was the increase of triglycerides. They could be a significant and independent risk factor for myocardial infarction (2) as well as a reliable marker for diabetes regulation (4, 9, 12). Hyperinsulinemia correlates strongly with VLDL-TG secretion (9). In particular a close correlation exists between serum triglycerides and pre-beta lipoproteins and insulin level in the presented study groups. It is very important to note that there were no significant alterations in the associations between lipoproteins and insulin which may occur during the time between the onset of infarction and the metabolic evolution after 7 days, except for the triglyceride level. Reduction of dietary intake during hospitalization was probably important for the estimation of serum triglycerides. However such alterations are of less importance and generally not severely incapacitated the state of post myocardial infarction. The time of 7 days could be sufficient to allow the temporary effects of acute phase reactions on investigated parameters to disappear.

The counterregulatory hormones exert a potent insulin-antagonistic effect and are capable of rapidly changing metabolism. They can induce insulin resistance and the degree of insulin resistance is a function of the initial

insulin sensitivity and may be dependent on the metabolic control of diabetes. Many studies indicated that stress and coronary disease could induce increased cortisol level, followed by an impaired glucose tolerance and hyperinsulinemia (24). Significant fall after 7 days could indicate that it could be stress-induced. Analysing the level of thyroid hormones it becomes certain that the TSH level was increased especially in women. The level of T3 tended to be lower and seems to be caused by inhibition of 5'-deiodinating process in the peripheral conversion of T4, which can occur during myocardial infarction (28). An increase in plasma T4 could be caused by either a decrease in the metabolic clearance rate or an increase in the production rate. Since the T4 peak is preceded in time by a significant increase in TSH, these findings could suggest that a TSH-mediated secretion of T4 is responsible for the rise in T4. If the T4 rise is TSH-mediated, the question arises as to why the release of TSH is stimulated? Therefore it seems reasonable to propose that the provocative factor can be: lower level of T3, pre-existing hypothyroidism in some of the women, as well as stress-induced phenomenon.

In conclusion, by analysing the predisposing metabolic risk factors, it could become apparent that the increase of free fasting insulin level together with the alteration of serum lipoproteins can be considered as most significant in patients surviving myocardial infarction and pointed out of monitoring insulin level in patients with coronary disease.

These changes were observed in all investigated groups, including those with no clinical signs of diabetes mellitus and with clinical history of diabetes.

The alteration of counterregulatory hormones (thyroid hormones and cortisol) was also significant.

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Abbot R. D., Donahue R. P., Kannel W. B., Wilson P. M. The Impact of Diabetes in Survival following Myocardial Infarction in Men v.s. Women. The Framingham Study. *JAMA* 260, 1988, 3456-3460.
2. Austin M. A. Plasma Triglyceride and Coronary Heart Disease. *Atheroscl. and Thromb.*, 11, 1991, 2-14.
3. Capron L., Fiessinger J. N., Housset E. Effects of Insulin and Hydrostatic Forces on the Metabolism of the Aorta. *Diabetes Metabol.*, 13, 1987, 307-311.
4. De Fronzo R. A., Ferrannini E. Insulin Resistance. A Multifaceted Syndrome Responsible for NIDDM, Obesity, Hypertension, Dyslipidemia, Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Diabetes Care*, 14, 1991, 173-177.
5. Ducimetiere P., Eschwege E., Papoz I., Richard J., Claude G., Rosselin G. Relationship of Plasma Insulin Levels to the Incidence of Myocardial Infarction and Coronary Heart Disease Mortality in a Middle-aged Population. *Diabetologia*, 19, 1980, 205-210.
6. Friedewald W. T., Levy R. I., Fredrikson D. S. Estimation of the Concentration of LDL Cholesterol in Plasma without Use of Preparation Ultracentrifuge. *Clin Chem.* 18, 1972, 499-502.
7. Gordon D. J., Rifkind B. M. High Density Lipoprotein – the Clinical Implications of Recent Studies. *N. Engl. J. Med.* 321, 1989, 1311-1316.
8. Hollenbeck C., Reaven G. M. Variations in Insulin-stimulated Glucose Uptake in Healthy Individuals with Normal Glucose Tolerance. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 64, 1987, 1169-1173.
9. Howard B. V., Lipoprotein Metabolism in Diabetes Mellitus. *J. Lipid Res.* 28, 1987, 613-628.
10. Jarret R. J. Why is Insulin not a Risk Factor for Coronary Heart Disease? *Diabetologia*, 37, 1994, 945-947.
11. Miller R. A., Wilson R. B. Atherosclerosis and Myocardial Ischemic Lesions in Alloxan-diabetic Rabbits Fed a Low Cholesterol Diet. *Atherosclerosis*, 4, 1984, 586-591.
12. Nikkila E. A. High Density Lipoproteins in Diabetes. *Diabetes*, 30 (suppl 2), 1982, 82-87.
13. Oswald G. A., Yudkin J. S. Hyperglycaemia Following Acute Myocardial Infarction: the Contribution of Undiagnosed Diabetes. *Diab. Metabol.*, 4, 1987, 68-70.
14. Peters N., Hales C. N. Plasma Insulin Concentration after Myocardial Infarction. *Lancet*, 1, 1965, 1144-1145.
15. Pollare T., Lithel H., Berne C. Insulin Resistance is a Characteristic Feature of Primary Hypertension Independent of Obesity. *Metabolism*, 39, 1990, 167-174.
16. Pyorala K. Relationship of Glucose Tolerance and Plasma Insulin to the Incidence of Coronary Heart Disease: Results from two Population Studies in Finland. *Diabetes Care*, 2, 1979, 131-141.
17. Pyorala K., Savolainen E., Kaukola S., Haapakoski J. Plasma Insulin as Coronary Heart Disease Risk Factor: Relationship to Other Risk Factors and Predictive Value during 9 1/2-year Follow-up of the Helsinki Policeman Study Population. *Acta Med. Scand.*, Suppl. 701, 1985, 38-52.
18. Rasmussen S. M., Heding L. G., Parbst E. Serum IRI in Insulin-treated Diabetic during a 24-hour Period. *Diabetologia*, 11, 1975, 151-158.
19. Reaven G. M., Laws A. Insulin Resistance, Compensatory Hyperinsulinemia and Coronary Heart Disease. *Diabetologia*, 37, 1994, 948-952.
20. Reaven G. M. Role of Insulin Resistance in Human Disease. *Diabetes*, 37, 1988, 1595-1607.
21. Rodrigues B., McGrath G. M., McNeil J. H. Cardiac Function in Spontaneously Diabetic BB Rats Treated with Low and High Dose Insulin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 67, 1989, 629-636.
22. Rubinstein M., Schaible T. F., Malhotra A., Scheuer J. Effects of Graded Insulin Therapy on Cardiac Function in Diabetic Rats. *Am. J. Physiol.*, 246, 1984, H453-H458.
23. Simpson H. S., Ballantyne F. C., Packard C. J., Morgan H. G., Shepard J. High-density Lipoprotein Subfractions as Measured by Differential Polyonic Precipitation and Rate Zonal Ultracentrifugation. *Clin. Chem.*, 28, 1982, 2040-2043.
24. Smith U., Lager J. Insulin-antagonistic Effects of Counterregulatory Hormones: Clinical and Mechanistic Aspects. *Diabetes & Metabolism Rev.*, 5, 1989, 511-525.
25. Stout R. W., Vallance-Owen J. Insulin and Atheroma. *Lancet*, 1, 1969, 1078-1080.
26. Stout R. W. Insulin as a Mitogenic Factor: Role in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease. *Am. J. Med.*, 90, (suppl. 2A), 1991, 62-65.
27. Welborn T. A., Wearne K. Coronary Heart Disease Incidence and Cardiovascular Mortality in Busselton with Reference to Glucose and Insulin Concentration. *Diabetes Care*, 2, 1979, 154-160.
28. Wiersinga W. M., Lie K. I., Touber J. L. Thyroid Hormones in Acute Myocardial Infarction. *Clin. Endocrinol.*, 14, 1981, 367-374.

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Prof. Radivoj Kocić, MD, MSc, PhD
ul. Nikole Pasica 65/8
18000 Nis, Yugoslavia
fax: +381 18 339600

ДНК-анализ на гена за инсулин-рецепторния субстрат-1 у болна с вродена тежка инсулинова резистентност

М. Боянов, М. Петкова*, М. Протич

Клиника по ендокринология, Медицински университет – София

* Православна поликлиника „Св. Лука“ с диабетен център – София

DNA Analysis of the Insulin-Receptor Substrate-1 Gene in a Patient with Severe Congenital Insulin Resistance

M. Boyanov, M. Petkova*, M. Protich

Endocrinology Clinic, Medical University – Sofia

*Orthodoxal Polyclinic „Sv. Luca“, Diabetes Center – Sofia

Резюме

Инсулиновата резистентност се дължи на генетични причини. Главният инсулин-рецепторен субстрат (ИРС-1) играе важна роля в предаването на инсулиновия сигнал.

Целта на настоящото изследване беше да докажем, че инсулиновата резистентност на пациентка с липоатрофичен диабет може да се дължи на структурни промени в гена ѝ за ИРС-1.

За получаване на геномна ДНК бяха използвани фибробласти на пациентката. Прилагайки специфични условия, ние амплифицирахме отделните фрагменти от гена ѝ за ИРС-1, а след това ги клонирахме. Използвайки класическия и директния секвенционен метод, ние успяхме да прочетем гена в цялата му дължина.

Abstract

Insulin resistance is known to be the result of genetic damage. The Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) plays a major role in the insulin signal transduction.

Aim of this study was to produce clear evidence that the insulin resistance in a patient with lipotrophic diabetes could be the result of structural changes in her IRS-1 gene.

We used cultured fibroblasts from that patient to obtain genomic DNA. Using specific polymerase-chain reaction (PCR) conditions we managed to amplify different fragments of her IRS-1 gene and further to clone them. Applying the classical as well as the direct sequencing methods we were able to sequence her IRS-1 gene in its full length.

При пациентката открихме 5 точкови мутации и 1 делеция в гена ѝ за ИРС-1. Приемайки, че тези промени не се дължат на генетичен полиморфизъм или на реакциите на клониране и секвенциране, ние предполагахме, че те кодират различна аминокиселинна последователност в нейния белтък ИРС-1. Въпреки че не е въвлячено нито едно от познатите места за фосфорилиране, възможно е именно тези отклонения да са причина за наличната инсулинова резистентност.

Нашето изследване ясно показва, че молекулярната медицина в бъдеще може да се превърне в мощно диагностично средство.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: Главен инсулин-рецепторен субстрат (ИРС-1), ген за ИРС-1, ДНК-анализ, мутации, инсулинова резистентност.

We found 5 point mutation sites and a deletion site in her IRS-1 gene.

Under the assumption that those structural changes are not attributable to genetic polymorphism or to the cloning and sequencing reactions themselves, we suppose that they encode a different aminoacid sequence of the patient's IRS-1 protein. Although none of the since known phosphorylation sites are involved, those changes are possibly the cause of the underlying insulin resistance.

The study clearly shows that molecular medicine can in the future become a major diagnostic tool.

KEY WORDS: Insulin-Receptor Substrate-1, IRS-1 gene, DNA analysis, mutations, insulin resistance.

Използвани по-важни съкращения:

ИРС-1 – главен инсулин-рецепторен субстрат; MAP-киназа – митоген-активирана протеинкиназа; PI-3-киназа – фосфатидил инозитол 3-киназа; dNTP – дезоксинуклеотидтрифосфат; DMSO – диметилсулфоксид; YMXM-мотив – последователност от тирозин-метионин-произволна аминокиселина-метионин; YXXM-мотив – последователност от тирозин-2 произволни аминокиселини-метионин

Настоящата работа беше подпомогната финансово от Германската служба за академичен обмен (DAAD) и бе извършена с любезното съдействие на научния екип на Втора клиника по вътрешни болести на Университета в Кьолн, Германия.

Инсулинът е един от най-важните хормони в човешкия организъм. Плейотропните му ефекти върху глюкозната, белтъчната и мастната обмяна, клетъчния растеж и диференциация се опосредстват от втреклетъчни системи. Централна роля при опосредстване на инсулиновия сигнал играе главният инсулин-рецепторен субстрат (ИРС-1). ИРС-1 е описан през 1985 г. при имунопреципитация с антифосфотирозинови антитела на стимулирани с инсулин FAO-хепатомни клетки (11). В началото е обозначаван като pp185 поради движението си по време на електрофореза от типа SDS-PAGE. ИРС-1 е получен в пречистен вид през 1991 г. и е била изучена аминокиселинната му последователност (8, 9). Секвенцирани са и човешкият, и мишият ген за

ИРС-1 и неговите регулаторни елементи (2). Генът, кодиращ ИРС-1, се намира в хромозома 2q36-37 и е съставен само от един екзон (4). ИРС-1 има поне 21 тирозинови остатъка, които подлежат на фосфорилиране (6 YMXM, 3 YXXM и 12 други мотива) (1). Тирозинкиназната единица на инсулиновия рецептор фосфорилира поне 8 тирозинови остатъка в ИРС-1 (460, 608, 628, 939, 987 и др.) (1, 4). Веднъж фосфорилирани, тези участъци свързват молекули с т. нар. SH2-хомология (1, 7), сред най-важните от които са PI-3-киназата (регулатора придвижването на лизозомните ензими и транслокацията на глюкозните транспортери) (6), GRB-2 (адапторна молекула, активираща p21ras и каскадата от MAP-кинази с ефект върху митогенезата и ядрените събития), SHC

(друга адапторна молекула, способна да активира GRB-2 и p21ras), Src (тирозинова фосфатаза) и Nck (участващ в клетъчната трансформация) и др.

Редица изследвания показаха, че ИРС-1 е отговорен за провеждането на повечето ефекти на инсулина (1, 7). Редуцирането на нивата на ИРС-1 в СНО-клетки намалява чувствителността на липогенезата към инсулин (1). Инжектирането в овоцити на конкуриращ фосфорилирания ИРС-1 протеин потиска узряването им (1). При изследване на лишени от ген за ИРС-1 мишки бе открит втори хомоложен на ИРС-1 белтък, наречен ИРС-2 (3). ИРС-1 и ИРС-2 опосредстват отчасти припокриващи се, но различни сигнали (10).

ЦЕЛ

Цел на настоящата работа беше да се докаже наличието на променен ген за ИРС-1 (в резултат на мутация и/или генетичен полиморфизъм) у пациентка с тежка вродена форма на инсулинова резистентност и липоатрофичен захарен диабет от типа Seip-Berardinelli. При тази пациентка е бил изключен дефект в инсулиновия рецептор и каскадата на MAP-киназите (5). Тези данни насочваха към дефект дистално от MAP-киназите, но не изключваха частичен дефект на ИРС-1. Целта на изследването беше с помощта на секвенционен ДНК-анализ да се открият мутации и/или генетичен полиморфизъм в гена за ИРС-1 при тази пациентка, с което да обясним резистентността към действието на инсулина.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Клетъчен материал. Използваха се фибробласти на пациентката, култивирани в среда от DMEM с 10% FKS и антибиотици, при 37 °C, 5% CO₂ и 95% относителна влажност на въздуха.

2. Изолиране на геномната ДНК. При изолирането ѝ се използва готов кит на фирмата Qiagen (Qia-amp-Blood-kit). Фибробластите бяха отделени от културелната среда с PBS (phosphate-buffered saline). Отделените клетки се центрофугираха (5 min, 500хg, 4 °C)

и след това утаената част се ресуспендираше в 200 µl PBS, след което се процедираше според упътването на фирмата производител.

3. Синтез на олигонуклеотиди и полимеразна верижна реакция (PCR) за амплификация на гена за ИРС-1. Тъй като общата дължина на гена за ИРС-1 е около 4300 азотни бази и не позволява секвенциране в една стъпка, той беше изкуствено разделен на 7 припокриващи се участъка с приблизителна дължина от около 600 бази (фиг. 1). За амплифицирането на тези участъци с PCR бяха синтезирани следните специфични олигонуклеотиди – праймери (с цифри е указан номерът на азотните бази в гена):

1. От - 438 до + 68 –
5'-праймер: AGG GGA ACT CAG GAG GGA AGG
3'-праймер: TCT TGG GTT TGC GCA GGT AGC
2. От + 17 до + 656 –
5'-праймер: GAG AGC GAT GGC TTC TCG GAG GT
3'-праймер: GTT TTC CGA GTG GCC ACA GCG
3. От + 611 до + 1350 –
5'-праймер: GGT GCT GCA GCT GAT GAA CAT
3'-праймер: CCA GGG AAT CCG GAG TGA CAC
4. От + 1278 до + 1971 –
5'-праймер: AGT ATG GCT CCA GTC CCT GCG
3'-праймер: CAC TCT CTG GGG ATG GCG TCT
5. От + 1901 до + 2546 –
5'-праймер: CAT GAG CCC CAA GAG CGT ATC
3'-праймер: GCA GCT GTG TCC ACC TTT CGA
6. От + 2472 до + 3273 –
5'-праймер: GCC TTC CAC ATC CCC ACC ATC
3'-праймер: GGT CTG CAC GGA TCA CTT TGG
7. От + 3217 до + 3760 –
5'-праймер: CCC GGG TGA ACC TCA GTC CTA
3'-праймер: CAT GAA ACG ACC TGC TGT GAT

Посочените олигонуклеотиди се синтезираха по твърдофазовата фосфоамидитна методика (Beaucage and Caruthers, 1981) при използване на апарат Gene Assembler и химикали на фирмата Pharmacia. Олигонуклеотидите бяха отделени от колонките с NH₄OH, а след това – центрофугирани (15 000хg, 2 min, 20 °C), утаени с 1/10 част натриев ацетат (рН 4.0) и 3 обемни части абсолютен етанол (30 min при -20 °C), отново центрофугирани и ресуспендирани в 100 µl H₂O bidest. Концентрацията им бе измерена фотометрично.

Полимеразната верижна реакция се

	+17	+656	+1278	+1971	+2472	+3273	
Участък 1 Fragment 1	Участък 2 Fragment 2	Участък 3 Fragment 3	Участък 4 Fragment 4	Участък 5 Fragment 5	Участък 6 Fragment 6	Участък 7 Fragment 7	
-438	+68	+611	+1350	+1901	+2546	+3217	+3760

Фиг. 1. Нуклеотидна последователност на гена за ИРС-1 и фрагменти, амплифицирани с PCR

Фиг. 2. Nucleotide sequence in the IRS-1 gene and fragments, amplified in PCR

провеждаше при подбрани от нас условия с около 100 pmol (0.1 mM) от всеки праймер, 10 µg геномна ДНК, 1xPCR-буфер (10 mM Tris/HCl; 50 mM KCl, pH 8.3), MgCl₂ (2.5 mM), смес от dNTP (0.2 mM), 1x10% DMSO, 8 U Tag-полимераза и H₂O до общ обем от 100 µl. Амплификацията се извърши в амплификатор (термосайклер) в 32 цикъла (94 °C – 1 min, 60 °C – 2 min, 72 °C – 3 min) с последваща реакция на елонгация (72 °C – 7 min).

4. Клонирание на отделните амплифицирани фрагменти. Фрагментите от полимеразната верижна реакция се обработиха с ензима на Klenow, фосфорилираха се с полинуклеотидкиназа и бяха пречистени върху агарозен гел. Така подготвените фрагменти се лигираха във вектора носител pUC 18 при 16 °C, като се използва готовият кит Ready-to-go-rU18/SmaI на фирмата Pharmacia. Така лигираният вектор се използва за трансформация на 100 µl компетентни бактерии (E. coli). Трансформираният бактерии се селектираха върху среда LB с ампицилин. За търсене на подходящи клетъчни клонове се проведоха плазмидни мини-препарации с готов Qiagen Plasmid Kit и колонки Qiagen-tip 20, а за отделяне на голямо количество плазмидна ДНК от положителните клонове (съдържащи фрагментите на гена за ИРС-1) се използваха готови колонки Qiagen Plasmid Kit 500 (за макси-препарации).

5. Секвенциране на ДНК. Определянето на нуклеотидната последователност на клонирания в pUC 18 ДНК-фрагменти се извърши по метода на Sanger - прекъсване на

нарастването на веригата на PCR с дидезоксинуклеотиди. Използван бе готов кит на фирмата Pharmacia – T7-Sequencing-Kit. При секвенцирането се използваха и „вътрешни“ за отделните фрагменти праймери в двете посоки, ограждащи фрагменти от около 150 бази. Радиоактивното маркиране се извърши с 10 µCi [³⁵S] dATPαS.

Като втори секвенционен метод се приложи директно секвенциране на свежия продукт от PCR с маркирани с радиоактивен фосфор ³²P праймери. При директното секвенциране се използва готов кит на фирмата Promega-fmol-Cycle-Sequencing-Systems и се създаде специална програма за PCR (30 цикъла, 30 sec 95 °C, 60 sec 70 °C).

Анализът на продуктите от секвенционната реакция се извърши върху денатуриращи полиакриламидни гелове (5% Polyacrylamid, 0.1% TEMED, 4M урея, 1xTBE). За буфер се използва 1xTBE (89 mM Tris, 89 mM борна киселина, 2 mM EDTA, pH 8.3) и гелът предварително се затопляше до 50 °C. След излизане на маркера (бромфенолово синьо) извън очертаванията на гела той се прехвърляше върху картон, изсушаваше се във вакуум при 80 °C и се експонираше върху стандартен рентгенов филм (за 16 часа).

РЕЗУЛТАТИ

1. В първата фаза на проекта основното внимание бе концентрирано върху намирането на най-подходящи условия за амплификация на ДНК-фрагментите (вж. по-горе). След отделянето на геномната ДНК от фиб-

Таблица 1. Отклонения от оригиналната нуклеотидна последователност на Araki в геномната ДНК на пациентката
Table 1. Abberations from the original nucleotid sequence according to Araki in the patient's genomic DNA

Нуклеотид № Nucleotid No	Вид отклонение/ Type of abberation	Последователност на Araki/ Araki sequence	Последователност при пациентката/ Patient's sequence	Замяна на аминокиселини/ Aminoacids substitution
1542	Точкова мутация Point mutation	A	G	Arg вместо (instead of) Lys
1669–1671	Делеция Deletion	GCC	–	Ala отпада (falls out)
1695	Точкова мутация Point mutation	A	T	Leu вместо (instead of) His
1697	Точкова мутация Point mutation	A	G	Gly вместо (instead of) Ser
2885	Точкова мутация Point mutation	C	T	Ser вместо (instead of) Pro
3522	Точкова мутация Point mutation	G	C	Pro вместо (instead of) Arg

робластите на пациентката желаните 7 фрагмента бяха успешно амплифицирани с PCR (фиг. 2).

2. Във втората фаза на проекта така амплифицираните фрагменти се лигираха във вектора pUC 18 и се клонираха успешно в компетентни бактерии от щамове на *E. coli*.

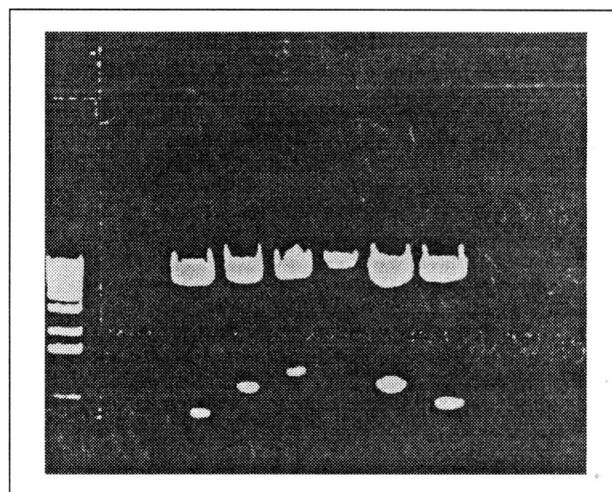
3. В третата фаза на проекта се определи нуклеотидната последователност на клонираните фрагменти чрез индиректно и директно секвенционирание. За сравнение се използваше публикуваната от Araki et al. нуклеотидна последователност (2).

При секвенционирането на отделните фрагменти се намериха следните отклонения от оригиналната последователност на Araki et al., показани в таблица 1.

ОБСЪЖДАНЕ

Изключвайки възможността посочените отклонения да са артефакти в хода на полимеразната верижна или секвенционна реакция (чрез повтаряне на целия цикъл от манипулации), беше доказано, че се касае за промяна

в първичната структура на ИРС-1 при изследваната пациентка. Променените участъци не включват нито едно от известните места за фосфорилиране на тирозинови остатъци, нито пък аминокиселини в непосредствена



Фиг. 2. Разпределение на фрагментите 1, 2, 3, 5 и 6 при електрофореза върху агарозен гел
Fig. 2. Distribution of fragments № 1, 2, 3, 5 and 6 in agarose gel electrophoresis

близост до тях (т. нар. YXXM или YMXM мотиви). С други думи, не се установи промяна в известните места за свързване на PI-3-киназата, GRB-2 и SHC.

Установените дефекти биха могли да обуславят променена функция на ИРС-1 и оттам – тежката инсулинова резистентност при пациентката. Остават открити обаче 2 въпроса, които изискват по-нататъшни проучвания:

1. Не са ли посочените мутации израз на генетичен полиморфизъм?

2. Възможно ли е ИРС-1 да взаимодейства с белтъци от фамилията AP-1, и по-

точно с c-jun и c-fos без посредничеството на p21ras и киназните каскади?

Описаните по-горе експериментални изследвания илюстрират възможността за търсене на биологичния дефект, довел до клиничната изява на дадена болестна единица, с методите на молекулярната медицина. Все още далеч от широко приложение и лесна достъпност, те са част от бъдещето на лабораторната медицина на XXI век. А оттам крачката до повлияване на генетичния дефект посредством вируси-носители и генно инженерство става съвсем реална.

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Митев, В. Инсулинова трансдукционна система. *Молекулярна медицина*, 1, 1996, 2, 4–8.
2. Araki, E., X. Sun et al. Human Sceletal Muscle Insulin Receptor Substrate-1: Characterization of the c-DNA, Gene and Chromosomal Localization. *Diabetes*, 42, 1993, 4, 1041–1054.
3. Araki, E., M. Lipes et al. Alternative Pathway of Insulin Signaling in Mice with Targeted Disruption of the IRS-1 Gene. *Nature*, 372, 1994, 1, 186–190.
4. Cheatham, B., C. Kahn. Insulin Action and the Insulin Signaling Network. *Endocrine Reviews*, 16, 1995, 2, 117–142.
5. Knebel, B. Charakterisierung von Postrezeptordefekten bei Insulinresistenz und neuer Insulin-regulierter Gene. In: Inaugural Dissertation. Uni Koeln, Koeln, 1995, 7–17.
6. Mitev, V., L. Sirakov. Recent Data about Insulin Signaling System and Insulin Resistance States. *Biomed. Reviews*, 5, 1996, 1, 47–55.
7. Myers, M., M. White. New Frontiers in Insulin Receptor Substrate Signaling. *Trends Endocrinol. Metabolism*, 6, 1995, 2, 209–215.
8. Rotenberg, P., W. Lane, A. Karosik et al. Purification and Partial Sequence Analysis of pp185, the Major Cellular Substrate of the Insulin Receptor Tyrosine Kinase. *J. Biol. Chem.*, 266, 1991, 9, 8302–8311.
9. Sun, X., P. Rothenberg, C. Kahn et al. Structure of the Insulin-Receptor Substrate IRS-1 Defines a Unique Signal Transduction Protein. *Nature*, 352, 1991, 1, 73–77.
10. Waters, S. Insulin Receptor Substrate 1 and 2 (IRS-1 and IRS-2): What a Tangled Web we Weave. *Trends in Cell-Biology*, 6, 1996, 1, 1–3.
11. White, M., R. Maron, C. Kahn. Insulin Rapidly Stimulates Tyrosine Phosphorylation of a Mr 185000 Protein in Intact Cells. *Nature*, 318, 1985, 1, 183–186.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Д-р М. Боянов
Клиника по ендокринология,
Александровска болница
ул. „Св. Георги Софийски“ 1, 1431 София

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

M. Bojanov, MD
Endocrinology Clinic, Alexandrov's Hospital
1, Sv. Georgi Sofijski Str., 1431 Sofia, Bulgaria

Определяне на общата телесна вода и промените в нея по време на хемодиализа при диабетно болни

Н. Ненчев, Е. Маринова, А. Джамбазова, К. Тодоров

Клиничен център по ендокринология и геронтология

Медицински университет – София

Determination of Total Body Water and its Changes during Haemodialysis in Diabetic Patients

N. Nenchev, E. Marinova, A. Djambazova, K. Todorov

Clinical Center of Endocrinology and Gerontology

Medical University – Sofia

Резюме

Определянето и достигането на оптималното „сухо“ телесно тегло на еухидратация при болните с терминална бъбречна недостатъчност, провеждащи хронично хемодиализа, е основна задача на тяхното лечение. Това се постига чрез извличане на течности (ултрафилтрация) по време на диализа – процес, свързан с промени в екстрацелуларното и интрацелуларното пространство. Измерването на общия телесен биоелектричен импеданс в широк честотен обхват от 200 Hz до 300 kHz дава информация за протичането на тези процеси.

Измерванията са проведени при 34 диабетно болни на периодична диализа. Установяваме висок коефициент на корелация между общия биоимпеданс, пресметнатата обща телесна вода и осъществената ултрафилтрация

Abstract

Determination and attainment of „dry“ body weight of normohydration is a principal problem in the treatment of haemodialysis patients. This obtained by extraction of fluids (ultrafiltration) during haemodialysis, associated with extracellular and intracellular volume changes. The measurement of total body bioelectrical impedance in wide frequency range 200 Hz – 300 kHz gives the information about these processes.

The measurements have been carried out with 34 diabetic patients on longterm dialysis. We established high correlation coefficient between total bioimpedance, calculated total body water (TBW) and realized ultrafiltration – $r > 0.9$.

We also determined the distribution of extra- and intracellular TBW as well as the

($r > 0.9$). Определяме и разпределението на общата телесна вода – екстра- и интрацелуларно, и настъпващите промени в тези обеми по време на диализа.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: биоелектричен импеданс, импедансна спектроскопия, хемодиализа, захарен диабет.

При болните с терминална хронична бъбречна недостатъчност, провеждащи периодична хемодиализа, клиничен проблем е поддържането на оптимално телесно тегло. Това е предимно теглото на еухидратацията.

Контролът на водния баланс при тези болни е задача на цялостното провеждано лечение, която лекарят трябва да решава ежедневно.

Определянето на оптималното „сухо“ телесно тегло на еухидратацията в рутинната практика се осъществява по клинични белези и по оценка на хода на провежданата диализа. Обикновено това е теглото, което се достига в края на всяка диализа.

Извличането на течности по време на диализа и преминаването им от екстрацелуларното в интрацелуларното пространство и обратно, дължащо се на осмотичното разбалансиране от двете страни на клетъчните мембрани, е процес, който може да доведе до различни клинични усложнения.

Измерването на биоелектричния импеданс на тъкани и цялото тяло в широк честотен обхват, известно като електроимпедансна спектроскопия, се очертава като надежден съвременен метод за определяне и проследяване на течностния баланс.

Предимствата на метода спрямо другите (например радиоизотопни) са в това, че измерванията са неинвазивни и могат да се осъществяват непрекъснато за дълъг период от време (мониторинг).

Методът може да се използва и за разграничаване на двете глобални пространства – екстрацелуларни и интрацелуларни течности (3, 6, 8).

changes taking place in these compartments during haemodialysis.

KEY WORDS: bioelectrical impedance, impedance spectroscopy, haemodialysis, body fluid balance, diabetes mellitus.

ЦЕЛ

Определяне на общото водно съдържание на телесното тегло и промяната му, която настъпва при диализно лечение. Изследване на разпределението на общата телесна вода – екстра- и интрацелуларно, и промените по време на хемодиализа.

КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ И МЕТОД

Обект на проведеното изследване са 34 диабетно болни с терминална хронична бъбречна недостатъчност, провеждащи заместително лечение с периодична хемодиализа. От тях – 20 мъже и 14 жени, на възраст от 23 до 74 години, 15 болни са със захарен диабет I тип (инсулинозависим), а 19 болни – с II тип (инсулинонезависим). Давността на диабета при I тип е 18.1 ± 3.5 г., а при II тип е 6.7 ± 1.8 г.

Продължителността на диализното лечение е от 6 месеца до 11 години, т. е. всички изследвани пациенти са навлезли в стабилния период.

При всички пациенти диализите се провеждат амбулаторно в стандартното диализно време – 3 пъти седмично по 4 часа. Всички са с компенсирана въглехидратна обмяна – кръвна захар преди диализа 10.8 ± 2.1 mmol/l, без хипо- или хипергликемични епизоди в предишното денонощие.

Електроимпедансната спектроскопия се основава на класическите методи за измерване на биоимпеданс, при които през тъканите се пропуска ток с висока честота и постоянна амплитуда и се измерва породеното нап-

режение, от което се съди за реалния биоимпеданс. Работи се в честотна област от няколко херца до няколкокостотин килохерца. Проводимостта на екстрацелуларните течности е независима от честотата на тока за работния честотен диапазон, а проводимостта на интрацелуларните течности може да бъде измерена само при високи честоти. Поради това при по-ниските честоти се определят екстрацелуларните течности, а чрез измервания при ниски и високи честоти могат да се дискриминират интрацелуларните от екстрацелуларните течности (3, 4, 13).

Съвременната електронна елементна база дава възможност и за реализацията на самата апаратура. Доказано е обаче, че колкото и добри технически средства да се използват, ако не се вземат специални мерки, системата пациент-апарат не позволява да се постигне висока точност (1, 2).

Поради тези причини за целите на изследването е използван специализиран модул за електроимпедансна спектроскопия, който е в основата на апарата „МВІ-101“. Предвидена е възможност за работа в обхват от 20 до 1000 Ohm при ток 2 mApp. Работният честотен обхват е от 200 Hz до 300 kHz. Измерват се модулът Z и фазовият ъгъл ϕ на биоимпеданса. Измерванията се правят с избрани честоти от 200 и 500 Hz, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 и 300 kHz (1, 2, 10, 11).

Резултатите са обработени с корелационен анализ.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Измерванията са направени при 34 диабетно болни, провеждащи хронично хемодиализа, след тяхното информирано съгласие. Използвани са стандартни ЕКГ-електроди с диаметър от 1 cm, поставени по двойки (един токов и един напрежителен) на китката на едната ръка, където не е съдовият достъп, и на глезена на срещуположния крак. По този начин се прави оценка на цялостния биоимпеданс и неговото изменение в зависимост от приложената ултрафилтрация (9, 11).

На фиг. 1 е представено изменението на модула и фазовия ъгъл на биоимпеданса в

зависимост от ултрафилтрацията при един пациент. От резултатите се вижда, че изменението на фазата на биоимпеданса в зависимост от ултрафилтрацията е незначимо. При това максималната стойност на измерените фази за всички пациенти не надхвърля 7 градуса. Поради тази причина насочихме нашите изследвания само за модула на биоимпеданса, защото е ясно, че фазата не носи полезна информация при настъпващите промени по време на диализа.

На фиг. 2 са представени коефициентите на корелация на изчисленото по използваните формули изменение на общия обем вода и действително извлечените количества течности при ултрафилтрация в зависимост от избраната работна честота.

Относителното изменение на модула на импеданса за цялата група пациенти е съсредоточено в сравнително тесни граници въпреки нейната нехомогенност – пол, възраст, тегло, ръст, клинично състояние и пр. Това ни позволява да използваме обобщени, статистически изведени формули за изчисляване на общия обем вода на организма (Total Body Water – TBW) (7):

$$TBW = 0.4.H^2/Z + 14$$

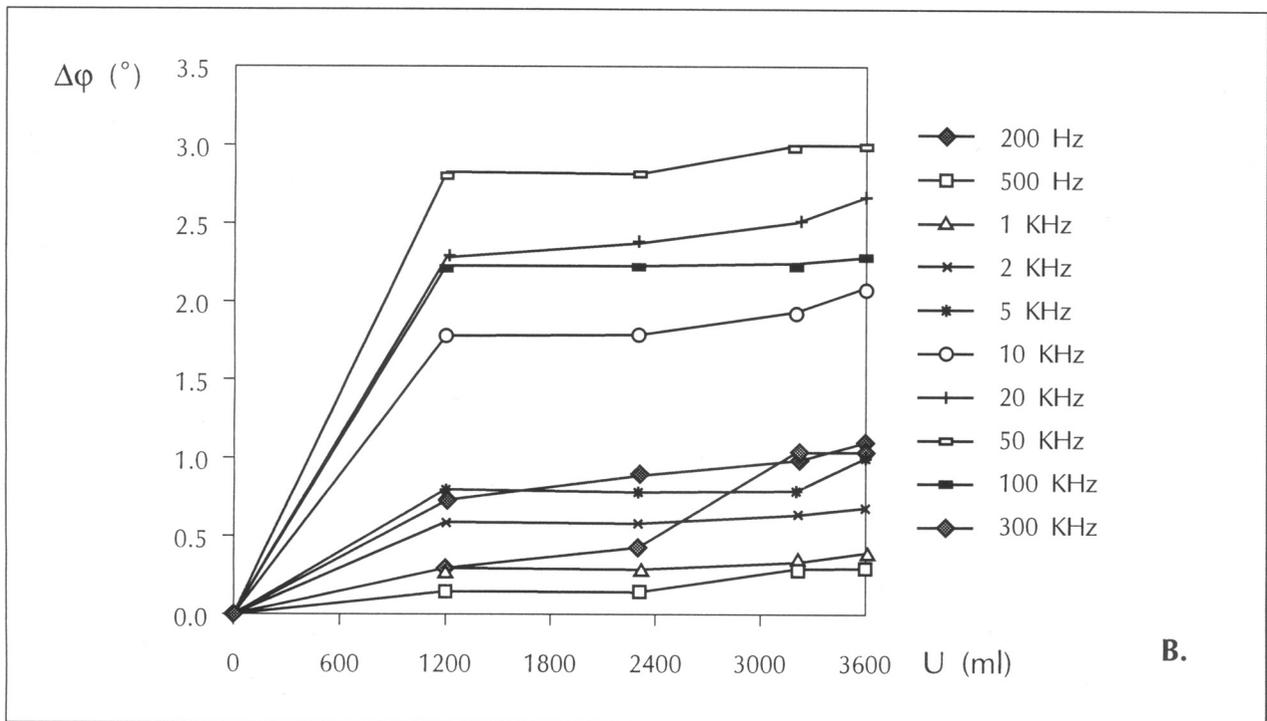
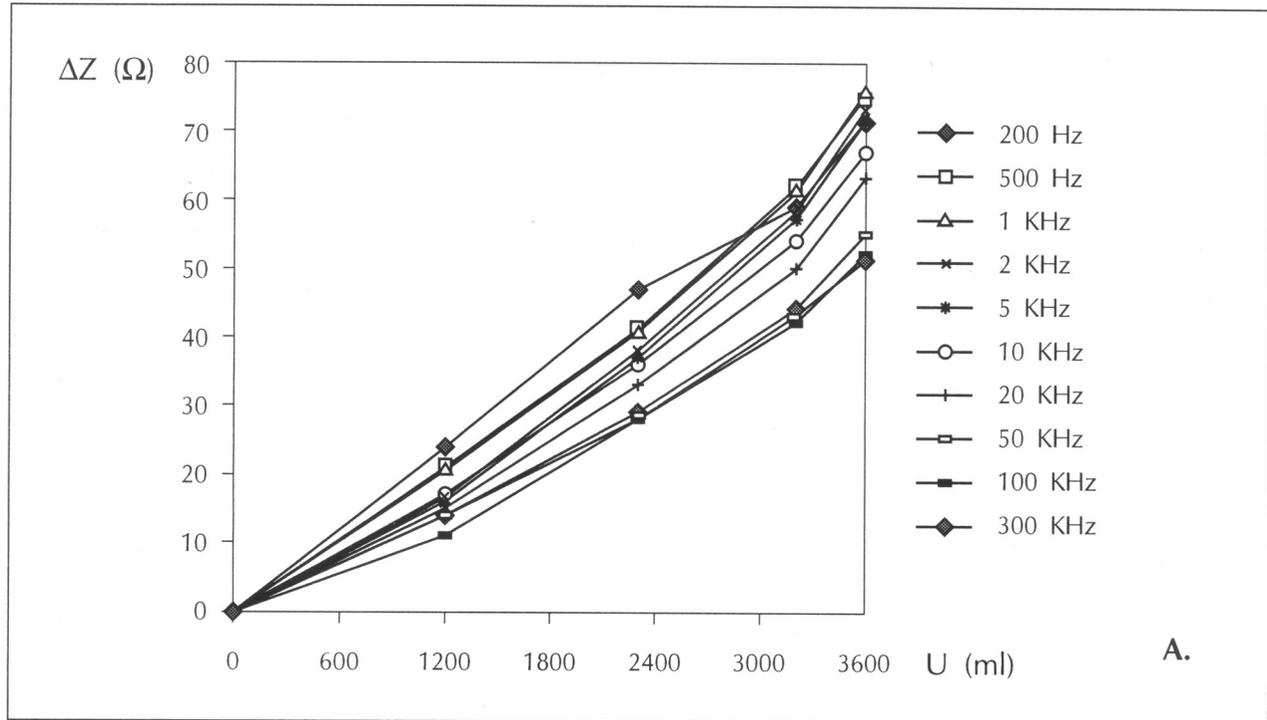
където H е ръстът на пациента в сантиметри.

Графиката на фиг. 2 показва високата корелация между общия обем течност, усреднен от всички пациенти, и средната ултрафилтрация при честоти над 20 kHz. Това означава, че над тази честота токът започва да навлиза в интрацелуларното пространство. Измерените стойности на TBW за честоти, по-високи от 20 kHz, се доближават до реалните стойности на общия обем течности на организма, тъй като при ултрафилтрация се измерва извлеченият общ обем вода.

От изложеното следва, че под честота 20 kHz токът на генератора протича предимно през екстрацелуларното пространство, при което измерените стойности на биоимпеданса за тези честоти съответства на количеството и промяната на екстрацелуларните течности (Extracellular Water – ECW). За изчислението на ECW използваме формулата (5):

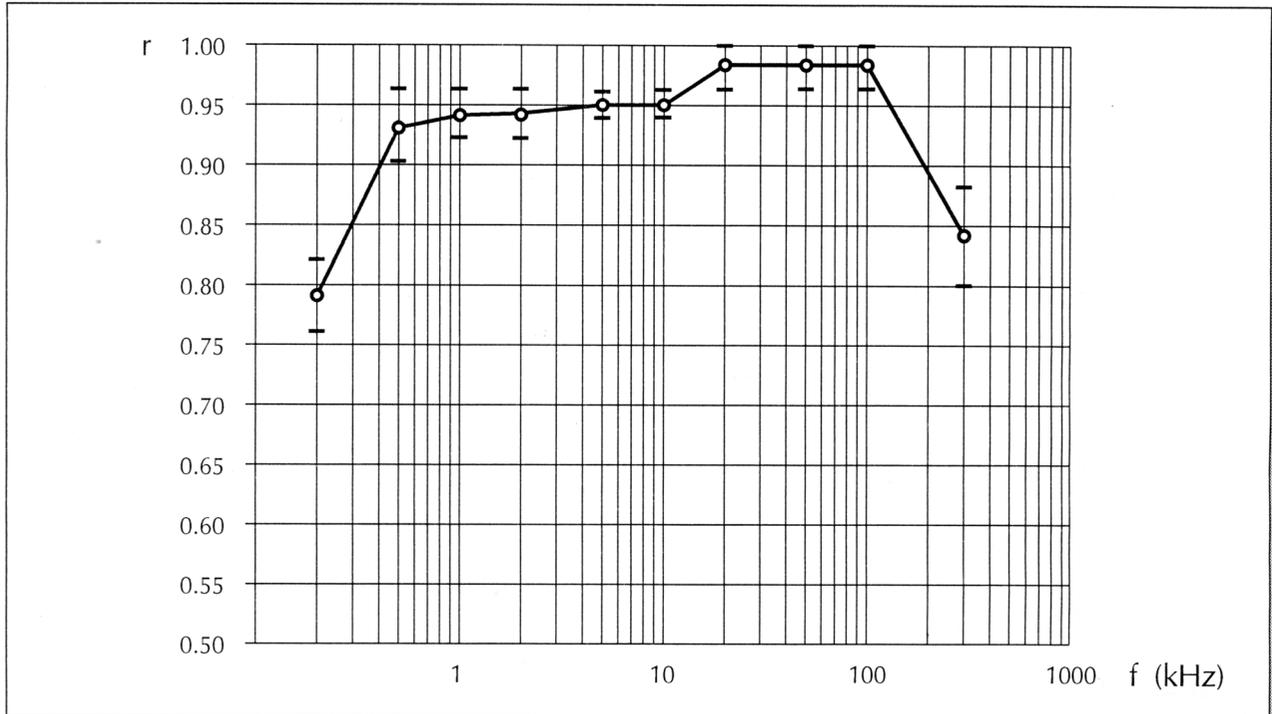
$$ECW = 0.3.H^2/Z + 3.08$$

където H на пациента е в метри.



Фиг. 1. А. Изменение на модула Z на биоимпеданса при всички работни честоти от 200 Hz до 300 kHz в зависимост от осъществената ултрафилтрация U (ml). **Б.** Изменение на фазовия ъгъл φ на биоимпеданса при всички работни честоти от 200 Hz до 300 kHz в зависимост от ултрафилтрацията.

Fig. 1. A. Change of the bioimpedance module Z in all working frequencies 200 Hz–300 kHz according to the realized ultrafiltration U (ml). **B.** Change of the bioimpedance phase angle φ in all working frequencies 200 Hz–300 kHz according to the ultrafiltration.



Фиг. 2. Разпределение на коефициентите на корелация r (промяна на общата телесна вода към приложената ултрафилтрация) при различните работни честоти f (kHz) средно за всички пациенти

Fig. 2. Distribution of the correlation coefficient r (change of the total body water to applied ultrafiltration) in the different working frequencies f (kHz) for all patients

Разликата между TBW и ECW ни дава възможност за изчисление на интрацелуларните течности (Intracellular Water – ICW), чието изменение носи важна клинична информация относно промените по време на диализа:

$$ICW = TBW - ECW$$

Достоверността на тези разсъждения се потвърждава и от клиничното състояние и поведение на пациентите по време на хемодиализа. Отчитани са и моментите на вливания на високомолекулни разтвори по време на диализа (Haemodex, Manitol), стойностите на артериалното налягане, състоянието след диализа.

При пациентите със стабилна хемодинамика по време на диализа промените в двете пространства – екстра- и интрацелуларно, вървят успоредно още от началото на диализната процедура. При други има дисоци-

ция между кривите, отразяващи промените в двете пространства, които корелират с клиничното състояние на пациента, влошаването на хемодинамиката, субективните оплаквания и пр.

В заключение, измерването на общия телесен биоелектричен импеданс, осъществено в широк честотен диапазон, е надежден съвременен метод за проследяване на промените в течностния баланс по време на диализа. Предимствата на метода са, че измерванията са неинвазивни, не са трудоемки и могат да се осъществяват непрекъснато по време на четиричасовата диализа – мониторинг. Това обуславя бърза и адекватна промяна в терапевтичното поведение на лекаря. Методът дава възможност за разграничаване на промените, настъпващи в двете глобални пространства – екстра- и интрацелуларно, което прави възможно индивидуализирането на самата диализа.

ИЗВОДИ

1. Пресметнатата обща телесна вода преди и след диализа и получената разлика показват висок коефициент на корелация с осъществената ултрафилтрация ($r = 0.96 \pm 0.4$).
2. От проведените спектроскопски из-

мервания на TBW се определя и разпределението на нейните екстрацелуларни и интрацелуларни компоненти.

Очертават се различни типове на промените по време на диализа в тези пространства, които корелират с клиничното състояние на пациентите и могат да послужат за определяне на терапевтичната тактика.

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Ал Хатиб, Ф. Влияние на нелинейните изкривявания при биоелектроимпедансни измервания. *Електроника и електротехника*, 1997, 1–2, 6–11.
2. Стамболиев, И., Ф. Ал Хатиб. Анализ на грешките и повишаване на точността при снемане на електроплетизмографски сигнали. *Електроника и електротехника*, 1996, 5–6, 43–47.
3. Boone, K. G., D. S. Holder. Current Approaches to Analogue Instrumentation Design in Impedance Tomography. *Physiol. Meas.*, 1996, 17, 229–247.
4. De Lorenzo, P. Deurenberg, A. Andreoli, G. F. Sasso, M. Palestini, R. Docimo. Multifrequency Impedance in the Assessment of Body Water Losses during Dialysis. *Ren. Physiol. Biochem.*, 1994, 17, 326–332.
5. Deurenberg, P., F. J. M. Schouten. Loss of Total Body Water and Extracellular Water Assessed by Multifrequency Bioelectrical Impedance. *Ann. Nutr. Metab.*, 1992, 46, 247–255.
6. Gerth, W. A., C. M. Watke. Electrical Impedance Spectroscopic Monitoring of Body Compartmental Volume Changes. *J. Clin. Eng.*, 1993, 18, 253–260.
7. Hoffer, E., C. Meador, D. Simpson. A Relationship between Whole Body Impedance and Total Body Water Volume. *Ann. NY Acad. of Sci.*, 1969, 170, 452–461.
8. Macdonald, R. J. Impedance Spectroscopy. *Ann. Biomed. Eng.*, 1992, 20, 289–305.
9. Montgomery, L. D., A. J. Parmet, C. R. Booher. Body Volume Changes during Simulated Microgravity: Auditory Changes, Segmental Fluid Redistribution and Regional Hemodynamics. *Ann. Biomed. Eng.*, 1993, 21, 417–433.
10. Oldham, N. M. Overview of Bioelectrical Impedance Analysers. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1996, 64, 405–412.
11. Scharfetter, H., G. Irnsberger, H. Hutten, H. Holzer. Comparison of Measured and Simulated Volume Shifts between the Intra- and the Extracellular Space in Dialysis Patients. Proc 16th Ann. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. Conf. Baltimore, Nov. 1994, 1142–1143.
12. Segal, K. R., S. Burastero, A. Chun, P. Coronel, R. Pireson, J. Wang. Estimation of Extracellular and Total Body Water by Multiple-Frequency Bioelectrical Impedance Measurement. *Am. Clin. Nutr.*, 1991, 54, 26–29.
13. Smith, D. N. Tissue Impedivity and Electromathematical Modelling of Bioimpedances. *Innov. Technol. Biol. Med.*, 1995, 16, 695–702.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Н. Ненчев
Клиничен център по ендокринология
и геронтология
ул. „Д. Груев“ 6, 1303 София

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

N. Nenchev
Clinical Center of Endocrinology and Gerontology
6, D. Gruev Str., 1303 Sofia, Bulgaria

Нов показател в липидологията за очистване на тъканите от пероксигирани липиди при болни със захарен диабет и при здрави лица

П. Ангелова-Гатева, М. Петкова*, Я. Владимиров, В. Крумова*

Клиничен център по ендокринология и геронтология,
Медицински университет – София

*Православна поликлиника „Св. Лука“ с диабетен център – София

New Index in Lipidology for Tissues Scavenging from Peroxidised Lipids in Diabetics and Healthy Persons

P. Angelova-Gateva, M. Petkova*, Y. Vladimirov, V. Krumova*

Clinical Center of Endocrinology and Gerontology,
Medical University – Sofia

*Orthodoxal Polyclinic „Sv. Luka“, Diabetes Center – Sofia

Резюме

Участието на свободно-радикаловите процеси във възникването на атеросклерозата, респективно на коронарните сърдечно-съдови заболявания, диабета и редица други заболявания, е демонстрирано убедително през последното десетилетие.

Като важни рискови фактори за възникването на тези заболявания се разглеждат високите нива на преокислените липопротеини с ниска плътност (ЛНП), ниските нива на липопротеините с висока плътност (ЛВП) и на холестерола в тях. Малко са изучени преокислените продукти в липопротеините с висока плътност.

Abstract

The data during the last 10 years demonstrated the important role of the free radical processes in the development of atherosclerosis, coronary heart disease, diabetes mellitus, etc. As a very important factor in this direction was accepted the high total serum cholesterol, the peroxidised low density lipoproteins and the low level of the high density lipoproteins cholesterol. There is no information on the content of peroxidised lipids in the HDL.

The aim of this study was to investigate the distribution of the total thiobarbituric acid reacting substances in the fraction of the serum, containing predominantly HDL, and in the pre-

Целта на проучването бе да се изследва количеството на продукти на свързването на тиобарбитуровата киселина с пероксилирани липиди (ТБКРС) в серума и в серумни фракции, съдържащи предимно липопротеини с висока плътност, и преципитат, съдържащ ЛНП+ЛМНП, за да се изясни транспортират ли ЛВП пероксилирани продукти на липидите от периферията към черния дроб.

Получените данни показват, че при здрави лица холестеролът в ЛВП (ЛВП-хол) е около 36% от общия, докато ТБКРС са около 60% от общите. При пациенти с неинсулинозависим захарен диабет (НИЗЗД) ЛВП-хол е около 18%, а ТБКРС са 43% в серумната фракция, съдържаща ЛВП. При здрави лица ЛНП-хол е 52%, ТБКРС – 43%, а при пациентите с НИЗЗД ЛНП-хол е 77%, а ТБКРС – 48% в ЛНП+ЛМНП преципитат.

Данните показват, че при здрави лица ЛВП-хол кореспондира с половината и повече от половината ТБКРС в серума; при пациентите с НИЗЗД този процент е по-нисък, но по-висок на мол.хол.ЛВП, и представлява интерес за допълнителни проучвания.

В заключение ние считаме, че получените данни доказват участието на ЛВП в транспорта на пероксилирани липидни продукти от периферните тъкани до черния дроб, респективно до стомашно-чревния тракт, което може би е основна тяхна биологична функция, и поддържат нивото на пероксилираните продукти в референтни граници при здрави лица.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: липиди, ЛВП, диабет, свободни радикали

В края на нашия век е почти общоприето схващането, че хиперхолестеролемията, пероксилирането на липидите, и специално на липопротеините с ниска плътност (ЛНП), промените в подкласовете на ЛНП и липопротеините с висока плътност (ЛВП) са пряко свързани с развитието на атеросклероза, със стареенето и са рискови фактори за възникването на хипертонията, сърдечно-съдовите заболявания, исхемичната болест на сърцето и др.

cipitate of the LDL+VLDL, answering the question – are HDL scavengers of peroxidised lipids from the tissues to the liver.

The data received demonstrated that the HDL-cholesterol in healthy controls was 36% from the total, but the HDL serum fraction TBARS was 60% from the total TBARS. In the group of NIDDM patients HDL-cholesterol was 18% and the TBARS – 43% from the total serum TBARS. The LDL-cholesterol in the control group was 52% and the LDL+VLDL TBARS was 43%. In the group of NIDDM patients LDL-cholesterol was 77%, and the TBARS – 48% (in the precipitate containing LDL+VLDL).

These data demonstrated that in healthy people the observed about 36% HDL-cholesterol corresponds to more than half of the serum TBARS. In the group of NIDDM patients some difference was observed, which is interesting for future investigations. These data demonstrated the HDL as scavenger for lipid peroxides from the tissues to the liver. That is maybe its main physiological function.

The high level of the HDL-TBARS contributes to the normal level of the total TBARS in the serum.

KEY WORDS: lipids, HDL, diabetes, free radicals

при общата популация и при пациенти със захарен диабет (1–8, 10).

Хипотезата на L. L. Smitt от 1991 г. предлага нова гледна точка в това направление, като се отбелязва, че само пероксилираните форми на холестерола са токсични за съдовете, а нативният холестерол е може би най-широко разпространеният метаболит, който очисти тъканите от токсичните свободни кислородни радикали.

Понастоящем се смята, че липопротеините с висока плътност пренасят холестерола от тъканите в черния дроб, с което се подси- гурява биосинтезата на стероидите, витамин D и т. н. Възниква въпросът, кой пренася перокси- дираните форми на липидите от тъканите до черния дроб.

Редица проучвания са посветени на значението на субкласовете на липопротеините с висока плътност. Високото съдържание на холестерол в тях понастоящем се възприема като показател за висока степен на почистване на тъканите от холестерола и малък риск от възникване на сърдечно-съдови заболявания. Приема се, че намалението на серумните нива на ЛпА-I и на Лп-I:A-II на ЛВП може да бъде диагностичен белег за съществени увреждания на коронарните съдове (2, 3, 4). Тези данни фактически подкрепят схващането за генетичната детерминираност на промените на липопротеиновите фракции и значението на този фактор за възникването на съдови- те промени, водещи до образуването на атеросклеротични плаки и свързаните с това последствия (5, 6, 10).

Многобройни са проучванията върху участието на пероксидираните липиди и други продукти на агресията на свободните кислородни радикали върху тъканите, най-често субстанциите, реагиращи с тиобарбитуровата киселина при загряване, т. нар. ТБКРС (1, 9). ТБКРС са изследвани в серума, в липопротеини с ниска плътност, в тъкани на експериментални животни, за да се характеризира участието на пероксидираните липиди в процеса на атеросклерозата. Не срещнахме проучвания в това отношение, свързани конкретно с липопротеините с висока плътност.

Целта на настоящото проучване е да се изследва съдържанието на пероксидираните продукти на липидите, количествата на ТБКРС в серума, във фракцията на серума, съдържаща предимно липопротеини с висока плътност, и в преципитат, съдържащ предимно липопротеини с ниска плътност и липопротеини с много ниска плътност, при здрави контроли и при пациенти с неинсулинозависим захарен диабет (НИЗЗД). Очакването ни се свързва с изясняване на въпроса за участието на липо-

протеиновите фракции в почистването на тъканите от пероксидираните липиди. За нас представляваше интерес, дали разпределението на тези продукти ще съответства на разпределението на холестерола в липопротеиновите класове: липопротеини с висока плътност (ЛВП) спрямо липопротеини с ниска плътност (ЛНП) + липопротеини с много ниска плътност (ЛМНП), където отношението при здрави лица е около 30:60%, а при болните варира значително (3, 7, 8). Представлява интерес съдържанието на ТБКРС в самите ЛП-класове.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследвани са 32 практически здрави лица със средна възраст 51 години, използвани като контроли, и 86 пациенти с НИЗЗД със средна възраст 56 години. Използван е серум в деня на отделянето му. Общият холестерол в серума (ОХ), триглицеридите (ТГ), холестеролът в липопротеините с висока плътност (ЛВП-хол), холестеролът в липопротеините с ниска плътност (ЛНП-хол) са изследвани с тест-комбинации на Roche, включително преципитиращ разтвор (0.55 mmol/l фосфоволфрамова киселина + 25 mmol/l MgCl₂) за определяне на ЛВП-хол по препоръчаната от фирмата процедура.

Липидните прекиси в серума (ТБКРС), както и тези във фракцията на серума, съдържаща ЛВП-хол, след преципитация на ЛНП-хол + ЛМНП-хол, са определяни в преципитат след третиране с 20% фосфоволфрамова киселина, разтворен с вода (дестилирана), и 0.8% тиобарбитурова киселина (Merck), разтворена в H₂O:CH₃COOH – 1:1, и нагряване на водна баня на 100 °C за 1 час. След центрофугиране Σ на супернатанта се измерва на λ 535 и 580 и разликата в екстинциите се използва за изчисление на количеството на липидните прекиси (9).

Използва се фактор, получен при провеждане на пробата с 0.1, 1.0, 2.0 до 5.0 nmol/l концентрации на малон диалдехид (Merck).

Получените средни стойности са сравнени за значимост на разликите и оценени по Т-критерий и таблицата на Student-Fisher.

РЕЗУЛТАТИ

Получените резултати, процентите на ЛВП-хол и ЛНП-хол от общия холестерол, както и процентите на ТБКРС в супернатанта и преципитата от общите ТБКРС в серума са представени на таблица 1. Отношенията на ТБКРС към ЛП-класове и общия холестерол са показани в таблица 2.

От таблица 1 се вижда, че при контролната група здрави лица средните стойности на общия холестерол (ОХ), триглицеридите (ТГ), холестеролът в ЛВП (ЛВП-хол) и в ЛНП (ЛНП-хол) се вметват в категорията желано ниво според възприетите в света норми за интерпретация на тези показатели. При контролите процентът на ЛВП-хол е 36, а на ЛНП-хол – 52%.

При пациентите с НИЗЗД всички показатели са силно променени при висока степен на достоверност на разликите (в посока на увеличение) и очертават степен на висок риск от възникване на сърдечно-съдови заболявания.

Количеството на ТБКРС в серума на лицата от контролната група е 2.44 ± 1.11 nmol/l, а при болните с НИЗЗД – 3.51 ± 1.05 nmol/l при $p < 0.001$. Средните стойности на ТБКРС в ЛВП са недостоверно различни при двете изследвани групи лица. ТБКРС в ЛНП имат стойност 1.07 ± 0.57 nmol/l при контролите и 1.70 ± 0.55 nmol/l при пациентите с НИЗЗД ($p < 0.001$). При двата показателя процентните съотношения са близки до 50% в двете групи.

На таблица 2 са представени следните съотношения: 1. ТБКРС в ЛВП/ЛВП-хол;

Таблица 1. Съдържание на липидни прекиси в серума, липопротеините с висока, с ниска и много ниска пълнот (ЛВП, ЛНП+ЛМНП), съдържащи фракции на серума

Table 1. Lipid peroxides in the serum, in HDL and LDL+VLDL, containing fractions of the serum

Показател Index	Общ холестерол	Тригли- цериди	ЛВП холест.	ЛНП холест.	ТБКРС в серума	ТБКРС в ЛВП	ТБКРС в ЛНП +ЛМНП	Кръвна глюкоза	HbA _{1c}	
	TSchol	TG	HDLchol	LDLchol	S-TBARS	HDL-TBARS	LDL+VLDL TBARS	Blood glucose	HbA _{1c} %	
	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	nmol/l	nmol/l	nmol/l	mmol/l	%	
Контроли (32)	\bar{x}	4.22	1.28	1.53	2.21	2.44	1.42	1.07	4.21	5.87
Controls (32)	SD	1.42	0.64	0.71	0.95	1.11	0.40	0.57	0.23	0.32
Пациенти	\bar{x}	6.55	1.70	1.16	5.04	3.51	1.52	1.70	10.85	3.41
с НИЗЗД (86)	SD	0.87	0.67	0.27	1.13	1.05	0.85	0.55	4.51	5.20
NIDDM patients (86)										
Сравнение	p	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.05	<0.001	<0.001	<0.001
НИЗЗД/контроли										
Comparison										
NIDDM/controls										
Процент от общ холестерол – НИЗЗД			17.71	76.95						
Percent of the TSchol – NIDDM										
Процент от общ холестерол – контроли			36.25	52.36						
Percent of TSchol – controls										
Процент ТБКРС в серума – НИЗЗД							43.30	48.43		
Percent of the S-TBARS – NIDDM										
Процент от ТБКРС в серума – контроли							58.19	43.30		
Percent of the S-TBARS– controls										

Таблица 2. Съотношения между показателите (nmol/mmol)
Table 2. Indexes relationships (nmol/mmol) ratios

	Контроли/Controls	НИЗЗД/NIDDM
ТБКРС в ЛВП/ЛВП-хол TBARS-HDL/HDL-choI	0.93	1.31
ТБКРС в ЛНП/ЛНП-хол TBARS-LDL/LDL-choI	0.53	0.33
ТБКРС в серум/общ серумен холестерол TBARS-serum/Tchol-serum	0.58	0.54

2. ТБКРС в ЛНП/ЛНП-хол; 3. ТБКРС в серум/ОХ-серум (в nmol/mmol). Съотношение 1 има стойност 0.93 при контролите и 1.31 при пациентите с НИЗЗД. Съотношение 2 има стойност 0.53 при контролите и 0.33 при пациентите с диабет, а при съотношение 3 стойностите са съответно 0.58 и 0.54 nmol/mmol.

Групата показатели, свързани пряко с липидната обмяна, дават възможност за оценка на риска от увреждания на сърдечно-съдовата система според приетите понастоящем в липидологията норми.

Групата показатели, характеризиращи липидните прекиси посредством измерването на ТБКРС, дават възможност да се оцени количеството на тоталните пероксидирани продукти в серума, ЛВП и ЛНП + ЛМНП, както и процентните съотношения на холестерола и липидните прекиси в ЛП-фракции, а също съдържанието на ТБКРС в единица липиди.

ОБСЪЖДАНЕ

Редица мащабни проучвания през последните години доказват по убедителен начин участието на свободно-радикаловите процеси, свързани с окислително модифициране на липидите и на липопротеините с ниска плътност, в атерогенезата (1, 2, 3, 4, 5, 6).

Задълбочени проучвания демонстрират значението на някои липопротеинови класове и техните оксидирани продукти като рисков фактор за възникването на хипертонична бо-

лест, исхемична болест на сърцето, миокарден инфаркт и др. в общата популация и при пациенти с диабет (7, 8, 10).

Понастоящем е известно, че в оксЛНП количеството на ненаситените и наситените мастни киселини остава непроменено, но значително намаляват полиненаситените мастни киселини – основен субстрат на пероксидация. Наблюдавано е натрупване на липидни пероксиди, конюгирани диени, оксистероли, както и ТБКРС и флуоресцентни липофуциподобни продукти. Фосфатидилхолинът намалява до 50–60%, лизофосфатидилхолинът и триглицеридите нарастват (1, 9, 11).

По отношение на ЛВП проучванията са насочени предимно към тяхното холестеролово съдържание, а също към отделните субкласове и техните съотношения – като маркер за прогнозиране на развитието на атеросклероза или различни сърдечно-съдови заболявания.

Не срещнахме проучвания относно съдържанието на субстанции, реагиращи с тиобарбитуровата киселина, при този липопротеинов клас или неговите субфракции.

В нашата лаборатория от редица години се изучава съдържанието на ТБКРС в комплексната оценка на състоянието на окислителен стрес при пациенти с диабет или други заболявания, свързани със свръхобразуване на свободни кислородни радикали (СКР). Опитът ни показва, че този показател може да се използва за надеждна оценка на окислителния стрес, респективно на количеството на перок-

сидираните липиди. Направената справка в литературните източници показва, че при здрави лица холестеролът в ЛВП представлява около 30–40% от общия, а този в ЛНП варира между 60 и 70%. Възникна въпрос, дали и ТБКРС са в същото съотношение при здравите лица и доколко ЛВП транспортират пероксидирани продукти от тъканите към черния дроб, а също – какво е съдържанието на μmol ТБКРС на μmol холестерол.

Изследваните от нас показатели – общ холестерол, холестерол в ЛНП, ЛВП и триглицериди, са в интервала на желаните стойности при здрави лица. При пациентите с диабет значимо нарастват общият холестерол, ТГ и холестеролът в ЛНП, респективно намалява холестеролът в ЛВП. Процентът на холестерола в ЛВП при здравите контроли е 36.25, а при пациентите с НИЗЗД – 17.71%. Получените стойности на тези класически показатели характеризират пациентите с НИЗЗД като лица с висок риск от възникване на коронарни сърдечни заболявания.

Количеството на общите липидни прекурсори (ТБКРС) при контролите е в границите на получавани от нас и на описани в литературата стойности при здрави лица. Те нарастват статистически достоверно при пациентите с НИЗЗД. Нивото на липидните прекурсори в ЛВП при двете изследвани групи се различава малко и недостоверно, а при ЛНП разликата е статистически достоверна, като по-високата стойност е при пациентите с НИЗЗД.

Във основа на данните от изследването на кръвната захар и HbA_{1c} се демонстрира недобър метаболитен контрол при пациентите с НИЗЗД. Изключително силно впечатление прави, че при контролите с около 36% холестерол в ЛВП ние намираме към 60% ТБКРС. При пациентите с НИЗЗД със 17.71% на ЛВП-хол установяваме 43.30% ТБКРС. Високият процент на ЛНП-хол при пациентите с НИЗЗД – 76.95%, кореспондира с 48.43% ТБКРС, а при здравите лица 52.36% ЛНП-хол кореспондира с 43.30% ТБКРС в серумната фракция, носеща предимно ЛНП+ЛМНП.

Изводът от настоящото изследване е, че при здрави лица ЛВП транспортират по-голямата част или около половината от окисле-

ните от СКР липидни продукти от периферните тъкани към черния дроб и стомашно-чревния път, чрез който се отстраняват ежедневно около 1.5 g холестерол и други липидни прекурсори. В контекста на хипотезата на Smitt за холестерола като най-широко разпространен антиоксидант в човешкия организъм ние показваме, че ЛВП са вероятно транспортиращата преокислени продукти на липидите от тъканите към черния дроб единица.

Нашето изследване показва, че ЛВП транспортират не само годен за биосинтеза на стероиди холестерол към черния дроб, но и пероксидирани продукти, подлежащи на отстраняване посредством стомашно-чревния път. Разглеждането на представените отношения между количествата на пероксидираните продукти в серума и липидните пространства, носещи ЛВП и ЛНП+ЛМНП, потвърждава гореизложеното. Отношенията между общите ТБКРС в серума и общият холестерол са доста близки при здравите лица и при пациентите с НИЗЗД. При отношението ЛНП в ТБКРС:ЛНП-хол стойността при пациентите с НИЗЗД е почти двукратно по-ниска в сравнение с контролите, въпреки че ЛНП се свързват предимно с пероксидираните продукти в серума, понастоящем и като изключително важни фактори в атерогенезата.

Отношението ТБКРС в ЛВП:ЛВП-хол има стойност 0.93 при здравите лица и 1.31 при пациентите с НИЗЗД. Би могло да се заключи, че високото съдържание на пероксидирани продукти в ЛВП поддържа фактически нивото на пероксидираните продукти в серума в референтни граници.

ИЗВОДИ

1. ЛВП са основни преносители на пероксидирани продукти от тъканите в черния дроб (ТБКРС) при здрави лица и болни с НИЗЗД.

2. Високото ниво на ТБКРС в ЛВП поддържа нивото на общите ТБКРС в серума в референтни граници при здрави лица и изпълнява изключително важна почистваща функция при пациенти с НИЗЗД по отношение на пероксидираните продукти.

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Бакалова, Р., В. Хаджимитова, М. Милева, С. Рибаров. Участие на свободно-радикаловите процеси в атерогенезата. *Актуална липидология*, 1997, 2, 21–30.

2. Киряков, А., Ю. Кавръкова, Н. Гочева, Я. Димова, И. Томов. Върху информативното значение на субкласовете на липопротеините с висока плътност липопротеин А-I и липопротеин А-I:A-II за оценка на риска от миокарден инфаркт. *Актуална липидология*, 1996, 1, 1–14.

3. Ла Роса, Дж. Роля на понижаващите нивата на холестерола средства за удължаване на продължителността на живота на коронарно болни. *Актуална липидология*, 1996, 1, 15–25.

4. Темелкова-Кюркчиева, Т., М. Ханефелд. Клинично значение на субфракциите на липопротеините. *Актуална липидология*, 1997, 1, 3–15.

5. Торбова, С. Артериална хипертония и дислипидеми:

патогенетични взаимозависимости и терапевтичен контрол. *Актуална липидология*, 1997, 1, 20–30.

6. Торбова, С., А. Бауренски, В. Байчева, М. Керковска. Серумни липиди и риск за исхемична болест на сърцето. *Актуална липидология*, 1997, 2, 3–9.

7. Crepaldi, G., A. Tiengo, E. Manzato. Diabetes, Obesity and Hyperlipidemias. In: The Plurimetabolic Syndrome. Elsevier Science Publishers, 1993.

8. Ferrannini, E., S. M. Haffner, B. D. Mitchel, M. P. Stern. Hyperinsulinemia: The Key Feature of a Cardiovascular and Metabolic Syndrom. *Diabetologia*, 34, 1991, 416–422.

9. Mithara, M. Lipid Peroxidation – its Measurement and Significance. *Analit. Biochem.*, 86, 1978, 211–218.

10. Selby, J. V., M. A. Austin, B. Newman. LDL Subclass Phenotypes and the Insulin Resistance Syndrom in Women. *Circulation*, 88, 1993, 381–387.

11. Smitt, L. L. Another Cholesterol Hypothesis, Cholesterol as Antioxidant. *Free Rad. Biol. Med.*, 11, 1991, 47–61.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

П. Ангелова-Гатева
Клиничен център по ендокринология
и геронтология
ул. „Д. Груев“ 6, 1303 София

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

P. Angelova-Gateva
Clinical Center of Endocrinology and Gerontology
6, D. Gruev Str., 1303 Sofia, Bulgaria

Честота и клинично значение на автоантителата срещу ретроорбитални мускулни антигени при болни с Тиреоид-Асоциирана Офталмопатия (ТАО)

Л. Даковска, Б. Лозанов, Р. Ковачева, Р. Иванова,
Хр. Вълкова*, Г. Кирилов, И. Атанасова

Клиничен център по ендокринология и геронтология,
Медицински университет – София

*Институт по молекулярна биология, БАН – София

Prevalence and Clinical Significance of Autoantibodies against Retroorbital Eye Muscle Antigens in Patients with Thyroid Associated Ophthalmopathy (TAO)

L. Dakovska, B. Lozanov, R. Kovatcheva, R. Ivanova,
Hr. Vulkova*, G. Kirilov, I. Atanasova

Clinical Center of Endocrinology and Gerontology, Medical University – Sofia

*Institute of Molecular Biology, Bulgarian Academy of Sciences – Sofia

Резюме

Общоприето е, че тиреоид-асоциираната офталмопатия (ТАО) е автоимунно заболяване и търсенията са насочени към установяване на диагностични маркери, свързани и отразяващи този процес в клиничен и патогенетичен аспект.

Целта на настоящото проучване бе да изследваме честотата на автоантитела срещу ретроорбитални мускулни мембранни антигени, определени чрез Western blotting при бол-

Abstract

Thyroid Associated Ophthalmopathy (TAO) is considered to be an organ-specific autoimmune disease and many investigations on the markers associated with this process are in progress.

The aim of the present study was to evaluate the prevalence of a serum autoantibodies against pig eye muscle membrane antigens, determined by Western immunoblotting, with respect to their clinical significance in

ни със и без ТАО, за да се прецени тяхната клинично-диагностична значимост.

Изследвани бяха 50 болни с ТАО (39 жени и 11 мъже, клас 3–6 според критериите на АТА) и контролни групи от 16 болни с Болест на Базедов-Грейвс (ББ-Г), 9 с неавтоимунни тиреоидни заболявания (НАТ) и 15 здрави лица, всички без данни за очно заболяване. Серумни антитела срещу антигени от мембранна фракция на свински очни мускули бяха определяни чрез SDS-електрофореза и Western blotting. Тестването на серумите от болните с ТАО показва няколко ивици на антилялова реактивност – срещу 64, 55, 48 и/или 95 kDa протеинни съставки – с различна честота, но тези срещу 64 kDa антиген доминираха като честота и интензитет.

Анти-64kDa-антитела бяха наблюдавани при 34/50 (68%) от болните с ТАО и при 4/16 (25%) от тези с ББ-Г без очни прояви. Не бе наблюдавана антилялова реактивност при здравите и пациентите с НАТ. Позитивността за антитела срещу ретроорбитални мускулни мембранни антигени показва тенденция за корелация с тежестта и активността на ТАО, изразени като офталмичен индекс.

Резултатите от настоящото проучване потвърждават, че антителата срещу ретроорбитални мускулни антигени са диагностичен маркер за специфичния автоимунитет при ТАО.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: ТАО, ретроорбитални мускулни антитела, офталмичен индекс.

Сега е общоприето, че тиреоид-асоциираната офталмопатия (ТАО) е автоимунно заболяване, при което нарушенията са локализирани главно в екстраокуларните мускули – мускулни фибри и перимизиална съединителна тъкан (1, 4, 14, 20). В последните години интересът е насочен към изучаване на важни детайли в комплексната патогенеза на ТАО.

Изясняването на първичния антиген и как той се разпознава от имунната система, остават ключови стъпала в познаването на тази „кръстословица“ (8). В практически аспект особено важно е да се уточнят характерът на

patients with or without ophthalmopathy.

Fifty patients with ТАО (39 w, 11 m, Class 3–6 by АТА) and control groups of 16 patients with Grave's disease (GD), 9 with nonautoimmune thyroid disease (NATD) as well as 15 healthy subjects all of which had no symptoms and signs of ТАО, were investigated. Pig eye muscle membrane fraction was used as antigen for determining the serum autoantibodies (PEMM-Ab) after SDS-electrophoresis and Western blotting.

Tests of the sera from patients with ТАО showed several bands of reactivity – against 64 kDa, 55 kDa, 48 kDa and 95 kDa protein components with different prevalence, but these against 64 kDa antigen were the most expressed as intensity as well as frequency. Anti-64 kDa-PEMM Ab were established in 34/50 (68%) of the patients with severe active ТАО as well as in 4/16 (25%) of those with GD without eye disease. None of the healthy persons as well as those with NATD revealed Ab-positivity. PEMM-Ab positivity tended to correlate with the severity and activity of the eye disease, summarized as Ophthalmic Index.

The results of this investigation confirm the usefulness of PEMM-Ab as marker of the specific autoimmunity in ТАО.

Key words: ТАО, PEMM-Autoantibodies, Ophthalmic index.

имунния отговор и неговите уловими белези на серумно ниво с диагностична цел.

Автоантитела, реагиращи с ретроорбитални мускулни антигени (РОМА-Ат), бяха установени в серуми на болни с ТАО чрез различни техники (7, 10, 12, 15, 19).

Въпреки интензивните проучвания в тази насока в последните години прецизирането на тяхната роля за тъканната увреда при ТАО, диагностичната им стойност, както и природата и значението на таргетните антигени не са изяснени и са предмет на дискусия (3, 17, 18).

ЦЕЛ

Целта на настоящото проучване бе да изследваме честотата на автоантитела срещу ретроорбитални мускулни мембранни антигени, тествани чрез Western immunoblotting, при болни с автоимунни тиреоидни заболявания със или без офталмопатия, при такива с неавтоимунни тиреоидопатии и при здрави лица, като по този начин преценим диагностичната им стойност, както и връзката им с някои клинични характеристики на заболяването.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Проучването обхваща:

1. 50 болни с ТАО – 39 жени и 11 мъже на възраст 19–60 години. Офталмопатията бе свързана с Болест на Базедов-Грейвс (ББ-Г) при 39 от пациентите, с Тиреоидит на Хашимото (ТХ) – при 9, и със субклиничен автоимунен тиреоидит – при 2. Групата включваше болни с клас 3 до 6 според критериите на АТА (6); давността на очните прояви при изследваните пациенти бе от 2 месеца до 9 години. В момента на изследването 24 от болните бяха еутиреоидни, 24 – хипертиреоидни, и 2 – в хипотиреоидно състояние; 42 не провеждаха лечение за офталмопатията, въпреки че при 24 от тях преди са провеждани курсове с кортикостероиди, а при 2 е прилагана телегаматерапия.

2. 16 болни с ББ-Г без прояви на офталмопатия – 12 жени и 4 мъже на възраст 28–62 години; давност на тиреоидното заболяване от 6 месеца до 7 години. По време на изследването 9 от пациентите бяха в хипертиреоидно състояние и 7 – в еутиреоидно.

3. 2 болни с ТХ – жени, еутиреоидни на фона на заместително лечение.

4. 9 болни с неавтоимунни тиреоидопатии (НАТ) – 6 жени и 3 мъже, от които 1 хипертиреоиден и 8 еутиреоидни, без установими титри за антитиреоидни антитела.

5. 15 здрави лица на възраст 22–58 години, без клинични и фамилни данни за тиреоидно заболяване и без отклонения в офталмичния статус.

Диагностичното уточняване на тиреоидния и офталмичния статус при изследваните па-

циенти бе извършено по стандартизиран протокол. Изследванията включваха: ТСХ, fT₃ и fT₄ (Delfia), ТАТ и МАТ (Elisa). Ехография на щитовидната жлеза бе проведена на всички болни, а при показания – ТАБ с уточняване на цитологичната находка. Офталмичният статус бе преценен след клиничен преглед и при част от пациентите бе проведено компютър-томографско изследване на орбитите. Офталмичен индекс (ОИ) бе изчислен за всеки от изследваните болни и бе използван като сборна клинична оценка на тежестта и активността на офталмопатията.

Антитела срещу ретроорбитални мускулни мембранни антигени бяха изследвани с въведена от нас методика, принципно съобразена с описаната от Salvi et al. (15). Накратко изолацията на антигенната фракция включваше хомогенизиране на добре почистени свински очни мускули в TRIS.HCl-буфер, рН 7.6, обогатен с протеазни инхибитори, и центрофугиране при 105 000xg за получаване на мембранния пелет. След това беше провеждана SDS-ELFO в редуциращи условия с 10%-концентриращ и 5%-разделящ гелове при протеиново съдържание на мембранната фракция 2 mg/ml и натоварване на стартовете с 60 µl. Използвана бе стандартна Western blotting техника за пренос на така фракционирания антиген и получените нитроцелулозни стрипове след блокиране с 3% BSA в TBS се инкубираха с пациентски серуми, разредени 1:20. Като второ анти тяло бе използван античовешки IgG-пероксидазен конюгат (ДакoPatt или Sigma) в подходящо разреждане и реакцията бе визуализирана с 3% 4Chlor-1naphtol.

Извършваше се скениране на всяка серия изследвани стрипове и визуално отчитане на реактивните ивици спрямо молекулно-тегловни маркери (BioRad). Контролен серум от здраво лице, PBS и конюгат бяха тествани като контроли във всяка серия.

РЕЗУЛТАТИ

Имуноблотове със серуми на болни с ТАО, тествани срещу РОМА, са представени на фиг. 1. Най-честият наблюдаван спектър на реактивност беше срещу антигенни съставки с

мол.маса 64, 55, 95 и 48 kDa. Качествената преценка на имуноблотовете показва, че в повечето случаи анти64kDa-новите антитела (Аг) доминираха, дори когато едновременно бяха наблюдавани и други ивици на реактивност.

Данните за честотата на позитивна реактивност спрямо споменатите четири основни антигена при болните с ТАО, както и сравнение с установената честота при другите изследвани пациентски групи – без офталмопатия, са представени в таблица 1.

Детайлното разглеждане на показалите позитивност за анти64kDa-Аг болни във връзка с определения при тях клас на офталмопатията показва:

при ББ-Г (n = 39)

Клас 3	8	2 положителни 6 отрицателни
Клас 4	26	22 положителни 4 отрицателни
Клас 5	4	2 положителни 2 отрицателни
Клас 6	1	1 положителен

при ТХ (n = 9)

Клас 3	2	2 отрицателни
Клас 4	5	4 положителни 1 отрицателен
Клас 5	1	1 положителен
Клас 6	1	1 положителен

при субклиничен автоимунен тиреоидит (n = 2)

Клас 3	2	1 положителен 1 отрицателен
--------	---	--------------------------------

Ние не установихме изразена взаимовръзка между реактивностите спрямо другите три РОМА-антигени (55kDa, 48kDa, (95kDa) и клиничната форма на автоимунната тиреоидопатия, нито с класа на офталмопатията. Самостоятелна анти64kDa-нова реактивност наблюдавахме при 17 болни, самостоятелна анти55kDa-нова реактивност – при 2 случая (офталмопатия с 9-месечна давност и проведен един курс на кортикостеронова терапия, в другия случай – офталмопатия от 2 години и 4 месеца, свързана с хронично-рецидивираща ББ-Г), и при

един пациент (ТХ с ТАО клас 3) – самостоятелна анти48kDa-нова реактивност. В голямата част от случаите се наблюдаваше комбинация от реактивност спрямо цитираните антигени.

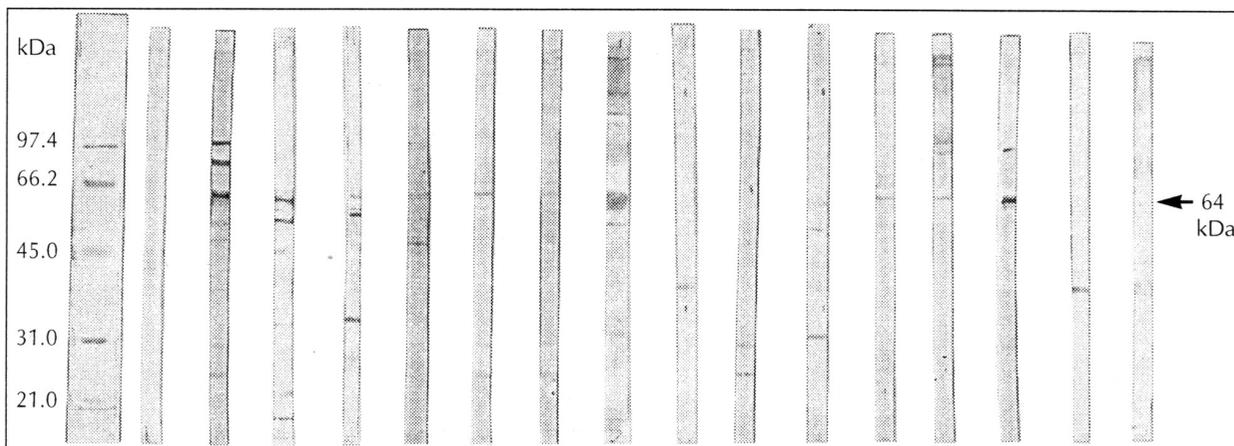
При болните с ББ-Г без ТАО установихме монореактивност срещу 64kDa-протеин при двама и при други двама бе установена комбинация от реактивности спрямо обсъжданите по-горе протеинни съставки, като общо анти-РОМА-Аг положителни бяха 4/16, т. е. 25% от изследваните болни в тази група. Тестването на 2 серума от пациенти с ТХ, 9 с НАГ и 15 здрави лица, всички без клинични данни за офталмопатия, не показва антиРОМА-реактивност, освен в единични случаи слаби ивици без определена системност.

Не бе установена взаимовръзка между резултатите от определянето на РОМА-Аг и хормоналния тиреоиден статус, както и с титъра на ТАТ и МАТ в момента на изследването на пациентите от всички групи.

ОБСЪЖДАНЕ

След началните проучвания в средата на 80-те години на хуморалния имуноен отговор срещу орбитални антигени при ТАО, свързани с разрешаване на методични проблеми, през 1988 г. Salvi et al. (15) за първи път описаха антитялова реактивност срещу 64kDa-нов протеин от мембранна фракция на ретроорбитален мускул в серуми на болни с ТАО. В голям брой проучвания след това бяха докладвани различни страни и подробности за тъканната специфичност на тези антитела (21), връзката им с патогенезата на очното заболяване (9, 18), биологичната им активност (13). Редица съобщения потвърдиха съществуването им при голяма част от болните с ТАО с различна тежест на очните симптоми (2, 5, 9, 18). От друга страна, някои автори поставиха под съмнение значимостта на 64kDa-новата реактивност, тъй като не установяват зависимост между нейната честота и клиничната характеристика на ТАО (17). Същите автори смятат, че тези Аг са от второстепенно значение за патогенезата на заболяването, което най-вероятно е Т-клетъчно медиран процес (11, 20).

Нашите данни потвърждават съществу-



Фиг. 1. Антитялова реактивност, преценена чрез имуноблотинг, срещу антигени от мембранна фракция от свински ретроорбитални мускули при болни с ТАО

Fig. 1. Antibody-reactivity, analysed by SDS-PAGE-Immunoblotting against pig eye muscle membrane fraction in sera of the patients with TAO

Таблица 1. Честота на серумни антитела, реагиращи с антигени от ретроорбитален мускул

Table 1. Prevalence of serum autoantibodies reactive with pig eye muscle membrane antigens as detected after SDS-Page-Immunoblotting

Групи Groups	Брой Number	Позитивна реактивност срещу ретроорбитални мускулни мембранни антигени Positive reactivity against pig eye muscle membrane antigens				
		64kDa	55kDa	48kDa	95kDa	Други/Others
ТАО/TAO	50	34 (68%)	19 (38%)	12 (24%)	10 (20%)	6 (12%)
Болест на Базедов-Грейвс без ТАО Grave's disease without TAO	16	4 (25%)	2 (12.5%)	2 (12.5%)	–	1 (6.2%)
Тиреоидит на Хашимото без ТАО Hashimoto's thyroiditis without TAO	2	–	–	–	–	1 (50%)
Неавтоимунни тиреоидопатии без ТАО NATD without TAO	9	–	–	–	–	2 (22.2%)
Контроли Healthy subjects	15	–	–	–	–	1 (6.7%)

ването на антиялова реактивност срещу 64kDa-нов протеин (с най-голяма честота – таблица 1), както и срещу някои други антигенни съставки на мембранна фракция от ретроорбитален мускул в серуми на болни с ТАО. От представените данни за честотата на Ат-позитивността спрямо РОМА-антигени се вижда, че при изследваните от нас болни с ТАО – предимно активни форми, клас 4 и повече, тя е най-голяма. Същата реактивност липсва при тестване на серуми от здрави лица и болни с тиреоидопатии без данни за офталмопатия. От друга страна, при показаните позитивност серуми доминираха 64kDa-реагиращите Ат, както по честота, така и по интензитет, в сравнение с реактивностите срещу другите съставни мембранни антигени. За последните се предполага, че са конформационно свързани с основния 64kDa-протеин в състава на ретроорбитално-мускулния мембранен антиген (3). От данните на други автори, както и от получените от нас изглежда, че 64kDa-антиген е имунодоминантен епитоп и е най-тясно свързан с възпалителната очномускулна реакция при ТАО. Получените от нас резултати са в съгласие с тези на Barsouk et al. (2), Hiromatsu et al. (9),

Zhang et al. (21), които използват човешки, свински и плъхови очномускулни препарати като антиген при антияловото тестване. Несъответствията с резултатите на Tandon et al. (17) и Weetman (20) могат да се дължат на използването на различни антигенни източници и/или различия в техниките, намаляващи тяхната чувствителност.

Установяването на РОМА-Ат при болните с ББ-Г без видими данни за офталмопатия (4 от 16 изследвани лица в тази група) може да бъде тълкувано в смисъла на връзката им с „ранните събития“ на заболяването (16).

За потвърждаване на такава предиктивна стойност на РОМА-Ат-позитивността болните би трябвало да бъдат системно проследени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Антителя срещу ретроорбитални мускулни антигени, главно 64kDa-нов протеин, бяха установени в серумите на значителна част от болните с ТАО и тяхното изследване е полезен диагностичен маркер за офталмопатията.

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Bahn, R., A. E. Heufelder. Mechanisms of Disease: Pathogenesis of Graves' Ophthalmopathy. *N. Engl. J. Med.*, 1993, 329, 1468-1475.
2. Barsouk, A., S. Wongrowicz, D. Scalise et al. New Assay for Measurement of Serum Antibodies Reactive with Eye Muscle Membrane Antigens Confirm their Significance in TAO. *Thyroid*, 1995, 5, 3, 195-200.
3. Boucher, A., N. F. Bernard, Z. G. Zhang et al. Nature and Significance of Orbital Autoantigenes and their Corresponding Autoantibodies in TAO. *Autoimmunity*, 1992, 13, 89-93.
4. Burch, H. B., L. Wartofsky. Graves' Ophthalmopathy: Current Concepts Regarding Pathogenesis and Management. *Endocrine Rew.*, 1993, 14, 6, 747-793.
5. Chang, T. C., T. J. Chang, Y. S. Huang et al. Identification of Autoantigen Recognized by Autoimmune Ophthalmopathy Sera with Immunoblotting Correlated with

Orbital Computer Tomography. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1992, 65, 2, 161-166.

6. Committees of American, European, Asia, Oceania and Latin America Thyroid Associations. Classification of Eye Changes of Graves' Disease. *Thyroid*, 1992, 2, 235.

7. Farina, M., T. Naumann, A. Gordos. Measurement of Autoantibodies against Human Eye Muscle Plasma Membrane in Graves' Ophthalmopathy. *Brit. Med. J.*, 1985, 290, 191-192.

8. Heufelder, A. E. Pathogenesis of Graves' Ophthalmopathy: Recent Controversies and Progress. *Eur. J. Endocrinol.*, 1995, 132, 532-541.

9. Hiromatsu, Y., M. Sato, K. Tanaka et al. Significance of Anti Eye Muscle Antibody in Patients with TAO by Quantitative Western blotting. *Autoimmunity*, 1992, 14, 9-16.

10. Kendall-Taylor, P., S. Atkinson, M. Holcombe. A Specific IgG in Graves' Ophthalmopathy and its Relation to Retroorbital and Thyroid Autoimmunity. *Brit. Med. J.*, 1984, 288, 1183-1186.

11. McLachlan, S., M. F. Prumel, B. Rapoport. Cell Mediated or Humoral Immunity in Graves' Ophthalmopathy? *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1994, 78, 5, 1070–1074.
12. Mengistu, M., E. Laryea, A. Miller, J. R. Wale. Clinical Significance of a New Autoantibody against a Human Eye Muscle Soluble Antigen Detected by Immunofluorescence. *Clin. Exp. Immunol.*, 1986, 65, 19–27.
13. Nauman, J. A. Biological Activity of Antibodies Circulating in Endocrine Ophthalmopathy. In: Endocrine Ophthalmopathy – Molecular, Immunological and Clinical Aspects (Ed. G. Kahaly). *Rev. Ophthalmol.*, Basel, Karger, 1993, Vol. 25, 29–35.
14. Perros, P., P. Kendall-Taylor. Pathogenesis of TAO. TEM, Elsevier Sci. Publ. Co, 1993, 4, 8, 270–275.
15. Salvi, M., A. Miller, J. R. Wall. Human Orbital Tissue and Thyroid Membranes Express a 64kDa Protein which is Recognized by Autoantibodies in the Serum of Patients with TAO. *FEBS, Lett.*, 1988, 232, 1, 135–139.
16. Salvi, M., D. Scalise, C. Stolarski et al. Upper Eye Lid Retraction in the Absence of Other Evidence for Progressive Ophthalmopathy is Associated with Eye Muscle Autoantibodies. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1995, 74, 1, 44–50.
17. Tandon, N., S. L. Yan, K. Arnold et al. Immunoglobulin Class and Subclass Distribution of Eye Muscle and Fibroblast Antibodies in Patients with TAO. *Clin. Endocrinol.*, 1994, 40, 629–639.
18. Wall, J. R., M. Hayes, D. Scalise et al. Native Gel Electrophoresis and Isoelectric Focusing of a 64kDa Eye Muscle Protein Shows that it is an Important Target for Serum Autoantibodies in Patients with TAO and not Expressed in other Skeletal Muscle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1995, 80, 4, 1226–1232.
19. Wang, P. N., Y. Hiromatsu, F. A. Laryea et al. Immunologically Mediated Cytotoxicity against Human Eye Muscle Cells in Graves' Ophthalmopathy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1986, 63, 316–320.
20. Weetman, A. P. Thyroid Associated Ophthalmopathy Update. *Autoimmunity*, 1992, 12, 215–222.
21. Zhang, Z. G., M. Salvi, A. Miller et al. Restricted Tissue Reactivity of Autoantibodies to 64kDa Eye Muscle Membrane Antigen in TAO. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1992, 62, 2, 183–189.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Д-р Лилия Даковска к. м. н.
Клиничен център по ендокринология
и геронтология
ул. „Д. Груев“, 1303 София

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Lilia Dakovska MD
Clinical Center of Endocrinology and Gerontology
6, D. Gruev Str., 1303 Sofia, Bulgaria

РЕЦЕНЗИЯ / BOOK REVIEW

Том IV: „Лекарствени средства, повлияващи пикочо-половата система, и хормонални препарати“ от многотомника Index Pharmacorum Bulgaricus. Изд. Алис-принт, София, 1997 г.

Ръководител на издателския екип е проф. д-р Христо Мутафов, д. ф. н., редактор – водещият български фармаколог проф. д-р Иван Крушков, д. м. н. Съдържа 386 печатни страници. Най-големият раздел – 216 стр., е пряко свързан с фармакотерапията в акушерството и гинекологията. На урологичните средства са отделени 28 стр., а на хормоналните препарати за системно приложение (с изключение на половите хормони) – 127 стр.

Информацията е представена много прегледно, улесняващо възможността за бърза и същевременно изчерпателна справка в клиничното ежедневие.

Всеки препарат е представен с генеричното си име, като на края на информацията са изброени търговските имена, фирмите производителки и начинът на съхранение. Особено ценни за практиката, изключително инструктивни рубрики са: странични ефекти, режим на дозиране, интоксикации – клиника и лечение, предупреждение – за лекаря и пациента. Така от справочник книгата се превръща фактически във фармакотерапевтичен наръчник на практикуващия лекар.

Възпалителните заболявания на гениталиите са на първо място в структурата на гинекологичната заболеваемост. Затова правилно

първият раздел започва с гинекологичните онкоинфекциозни средства и антисептици.

Добре би било интраутеринните спирали да се дадат в раздела контрацепция – общо.

Изключително добре са представени пероралните хормонални контрацептивни препарати. Много място е отделено за фармакодинамиката, страничните ефекти и противопоказанията.

Същото може да се каже за естрогените, гестагените и комбинираните естроген-гестагенни препарати, както и за гонадотропните хормони. За акушер-гинеколозите е ценен и разделът за урогинекологичните средства, хипоталамичните хормони – агонисти и антагонисти, кортикостероидните хормони и тиреоидните препарати.

Азбучният указател на търговските имена улеснява бързото намиране на желания препарат.

В заключение: Том IV от Index Pharmacorum Bulgaricus е изключително ценен за акушеро-гинекологичната практика у нас, както и за обучението на студенти медици и специализиращи акушерство и гинекология лекари.

Проф. д-р Илко Карагъзов, д. м. н.

СЪОБЩЕНИЯ / NEW ITEMS

● Тематичен курс „Съвременно лечение на остеопорозата“ организира Клиничен център по ендокринология и геронтология на 29 и 30 октомври 1998 г. Желаетелите да се включат в курса да направят писмена заявка до 30 септември 1998 г. до доц. д-р Анна-Мария Борисова.

● Асоциацията по остеопороза, в чийто състав е и Българското дружество по ендокринология, съобщава, че **Втората национална конференция по проблемите на остеопорозата** ще се състои на 6 и 7 ноември 1998 г. в гр. София. Резюмета се приемат до 3 септември 1998 г. За справки и заявки: проф. Й. Шейтанов и д-р Р. Стоилов – ДУБ по ревматология, ул. „Урвич“ № 13, София 1612, тел. 58-10-22.

УКАЗАНИЯ ЗА АВТОРИТЕ / INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Списание

ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ISSN 1310-8131
Българско дружество по ендокринология

Journal

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

Адрес на редакционната колегия:

Клиничен център по ендокринология и геронтология, проф. Б. Лозанов или доц. Ф. Куманов, ул. „Д. Груев“ №6, 1303 София, тел. (02) 987-72-01; факс (02) 874-145

Editorial Board Address for Correspondence:

Clinical Center of Endocrinology and Gerontology Prof. B. Lozanov or Assoc. Prof. Ph. Kumanov 6, D. Gruev Str., 1303 Sofia – BULGARIA Tel: (0359) (02) 987-72-01; Fax:(0359) (02) 874-145

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

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

Обемът на представените работи не трябва да превишава 10 стандартни страници – за оригиналните статии, 12 страници – за обзорните статии, 3–4 страници – за казуистичните съобщения, 4 страници – за информации относно научни прояви в България и в чужбина, както и за научни дискусии, 2 страници – за рецензии на книги (монографии и учебници). В посочения обем се включват книгописът

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

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

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

The abstracts are not included in the size of the paper and should be submitted on

и всички илюстрации и таблици. В същия не се включват резюметата на български и английски, чийто обем трябва да бъде около 200 думи за всяко (25–30 машинописни реда).

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

Структурата на статиите трябва да отговаря на следните изисквания:

Титулна страница

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

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

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

Основен текст на статията

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

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

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

a separate page with 3 to 5 key words at the end of the abstract. They should reflect the most essential topics of the article, including the objectives and hypothesis of the research work, the procedures, the main findings and the principal conclusions. The abstracts should not exceed one standard typewritten page of 200 words.

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

Title page

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

Text of the article

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

Illustrations

The figures, diagrams, schemes, photos should be submitted separately from the text (one original and two copies) in size 9 x 13 cm, all of them described on the back side with: consecutive number (in Arabic figures); titles of the article and name of the first author. These should be listed together with the corresponding and informative text in the legend (title, keys to symbols, etc.) on a separate sheet in consecutive order. The tables should be pre-

Илюстрации и таблици

Илюстрациите към текста (фигури, графики, диаграми, схеми и др. – черно-бели копия с необходимия добър контраст и качество) се представят на отделни листове (без обяснителен текст), в оригинал и две копия за всяка от тях. Текстът към фигурите със съответната им номерация (на български и на английски език) се прилага на отделен лист-опис. На гърба на всяка фигура се надписват с молив съответният номер (с арабски цифри), заглавието на статията и името на водещия автор, като се посочва и положението (горе, долу). Таблиците се представят с готово написани обяснителни текстове на български и английски, които са разположени над тях; номерацията им е отделна (също с арабски цифри). Посочените в таблиците данни не трябва да се дублират с тези във фигурите. В текста не се оставя място за илюстрациите; същото се посочва със стрелка и съответния номер в лявото бяло поле на листа.

Книгопис

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

Примери:

а) статия от списание:

1. McLachlan, S., M. F. Prumel, B.

sent on separate sheets with Arabic numbers and informative text above each table. Please do not leave any empty space in the text for illustrations. Show with an arrow in the left margin of the respective page the recommended space for them.

References

The references should be presented on a separate page at the end of the manuscript. It is recommended that the number of references should not exceed 15-20 titles for the original articles and 30-35 titles for the reviews; 2/3 of them should be published in the last 5 years. References in Cyrillic should be listed first, followed by the Latin ones in the respective alphabetic order. The number of the reference should be followed by the family name of the first author and then his/her initials, names of the second and other authors should start with the initials followed by family names. The full title of the cited article should be written, followed by the name of the journal where it has been published (or its generally accepted abbreviation), volume, year, issue, first and last page. Chapters of books should be cited in the same way, the full name of the chapter first, followed by „In:“, full title of the book, editors, publisher, town, year, first and final page number of the cited chapter.

Examples:

Reference to a journal article:

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

Reference to a book chapter:

2. Delange, F. Endemic Cretinism. In: „The Thyroid“ Eds. L. Braveman and R. Utiger, Lippincott Co., Philadelphia, 1991, 942-955.

Submission of manuscripts

The original and one copy of the complete manuscript are submitted together with a covering letter granting the consent of all authors for the publication of the article as well as a statement that it has not been published previously elsewhere and signed by the first

Rapport. Cell Mediated or Humoral Immunity in Graves' Ophthalmopathy? *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 78, 1994, 5, 1070–1074.

б) глава (раздел) от книга:

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

Адрес за кореспонденция с авторите

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

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

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

author. The Editors will not be responsible for damages or loss of the papers submitted. Papers returned to the authors for revision and not received back in 60 days it shall be treated as newly submitted manuscripts. Manuscripts of articles accepted for publication will not be returned to the authors.

Address for sending of manuscripts and other editorial correspondence:

Editorial Board:
Clinical Center of Endocrinology
and Gerontology
6, D. Gruev Str.
1303 Sofia, BULGARIA
Prof. B. Lozanov (Editor-in-chief)
or Assoc. Prof. Ph. Kumanov
(Scientific Secretary)

Всяка седмица

ФОРУМ

МЕДИКУС

*вестникът
на професионалистите
в медицината*

София 1202, ул. „Ил. Макариополски“ 10
тел./факс: (02) 931 05 37; тел. (02) 931 01 61, 931 05 52

С този талон може да се абонира за списание **ЕНДОКРИНОЛОГИЯ** за 1998 г.
За допълнителна информация – тел. 02/522-342, факс 02/522-393

ТАЛОН ЗА АБОНАМЕНТ

Име..... Презиме..... Фамилия.....
Селище..... Община..... Пощ. код.....
Ул. (кв.)..... №..... Бл..... Вх..... Ет..... Ап.....

Моля да бъде абониран за списание **ЕНДОКРИНОЛОГИЯ**

.....
Стойността на абонамента за 1998 г. е преведена с пощенски запис №.....от..... или по сметка
на Центъра: Банков код 66084219, с-ка 3010030311, БИН 7442010004, ТБ „БИОХИМ“ АД – клон „Батенберг“

Заявител:
(при лични заявки)

Директор:
Гл. счетоводител:
(при служебни заявки)

ЕНДОКРИНОЛОГИЯ



Списание
на Българското дружество
по ендокринология
към СНМД в България
**Journal
of Bulgarian Society
of Endocrinology (BSE)**

Главен редактор
Проф. Боян Лозанов

Научен секретар
Доц. Филип Куманов

Стилов редактор
Багра Делчева

Художествен редактор
Румен Нинов

Първа корица и графичен
дизайн
Румен Нинов

Издателска агенция „Алтенбург“
бул. „Цариградско шосе“ 113А
София, тел./факс 77 52 69

Печат
Издателска компания „К & М“

ТАЛОН ЗА АБОНАМЕНТ

Подател:

.....
.....
.....

Център за информация
по медицина (ЦИМ)
бул. „Г. Софийски“ № 1
София 1431