



# ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ENDOCRINOLOGIA

Списанието се индексира от/The journal is indexed by:

- Elsevier Bibliographic Databases, (SCOPUS) Netherlands
- EMBASE
- Bulgarian Citation Index

## Editorial Board/Редакционна колегия и съвет

**Editor-in-Chief:** Maria ORBETZOVA

**Гл. редактор:** Мария ОРБЕЦОВА

**Honorary Editor-in-chief** Bojan LOZANOV

**Почетен главен редактор** Боян ЛОЗАНОВ

**A.-M. Borissova/**Анна-Мария Борисова **Kiril Hristozov/**Кирил Христозов

**V. Christov/** В. Христов

**Lidia Koeva/**Лидия Коева

**G. Kirilov/**Георги Кирилов

**M. Petkova/**М. Петкова

**D. Koev/**Драгомир Коев

**M. Boyanov/**Михаил Боянов

**J. Gerenova/**Жулиета Геренова

**R. Kovacheva/**Р. Ковачева

**Z. Kamenov/**Захари Каменов

**S. Zacharieva/**Сабина Захариева

**I. Tzinlikov/**Иван Цинликов

**Philip Kumanov/**Филип Куманов

**I. Atanassova/**И. Атанасова

**Tzvetalina Tankova/**Цветалина Танкова

**K. Koprivarova/**К. Коприварова

## International Scientific Board/ Международен научен съвет

**A. Bulatov (Moscow) /** А. Булатов (Москва)

**M. Coculescu (Bucharest) /** М. Кокулеско (Букурещ)

**G. Erdogan (Ankara) /** Г. Ердоган (Анкара)

**J. Fovenyi (Budapest) /** Й. Фьовени (Будапеща)

**A. Isidori (Rome) /** А. Изидори (Рим)

**B. Karanfiski (Scopie) /** Б. Каранфилски (Скопие)

**P. Kendall-Taylor (Newcastle upon Tyne) /** П. Кендъл-Тейлър (Нюкасл на Тайн)

**G. Krassas (Thessaloniki) /** Г. Красас (Солун)

**P. Lauberg (Denmark) /** П. Лауберг (Дания)

**J. H. Lazarus (Cardiff) /** Дж. Лазарус (Кардиф)

**E. Nieschlag (Munster) /** Е. Нишлаг (Мюнстер)

**S. Refetoff (Chicago) /** С. Рефетоф (Чикаго)

**M. Serrano Rios (Madrid) /** М. Серрано Риос (Мадрид)

**Списание ЕНДОКРИНОЛОГИЯ** том XIX, книжка 2, 2014**Съдържание****Обзори**

• Няголова, Пресияна В., Митков, Митко Д., Орбецова, Мария М. Енергиен баланс и невроендокринен контрол на репродукцията	75
• Иванова, Кони., Йонал, Ерман., Гълъбова, Мая. VEGF и карцином на щитовидната жлеза, туморна ангионеза, дендритни клетки	81

**Оригинални статии**

• Лозанов Б., Лозанов А., Колева В., Ванкова М., Горчева Д., Костова Б., Недева Н., Вуков М. Асоциация между метаболитен синдром, затлъстяване и аутоимунни тиреоидни заболявания	88
• Ботушанов, Николай П., Орбецова, Мария М. Костна минерална плътност при пациенти със захарен диабет тип 1	101

**Критичен анализ**

• Коев, Драгомир Ж. Колко стриктен трябва да бъде стриктният гликемичен контрол при лечение на захарен диабет тип 2	113
? Христов, К., Бъчварова, М., Хаджиева, Е., Балева, Б., Красналиев, И., Арnaudов, П. Нискодиференциран, неанпластичен дифузен тиреоиден карцином в съчетание с тиреоидит на Хашимото	119

**Указания за авторите**

126

**Journal ENDOCRINOLOGIA** volume XIX, number 2, 2014**Contents****Reviews**

• Nyagolova, Presiyana V., Mitkov, Mitko D., Orbetzova, Maria M. Energy Balance and Neuroendocrine Control of Reproduction	75
• Ivanova, Koni, Onal, Erkan, Gulubova, Maya VEGF and Thyroid Cancer, Tumor Angiogenesis, Dendritic Cells	81

**Originale articles**

• Lozanov B., Lozanov, L., Koleva, V., Vankova, M., Gorcheva, D., Kostova, B., Nedeva, N., Vukov, M. Association Between the Metabolic Syndrome, Obesity and Autoimmune Thyroid Diseases	94
• Botushanov, Nickolay P., Orbetzova, Maria M. Bone mineral density in patients with type 1 diabetes mellitus	107

**Critical Reviews**

Коев, Драгомир Ж. How Strict Should be the Strict Glycemic Control in the Treatment of Diabetes Mellitus Type 2	113
? Hristozov, K., Bachvarova, M., Hadzhieva, E., Balev, B., Krasnaliev, I., Arnaudov, P. Poorly Differentiated, Nonanaplastic Diffuse Thyroid Cancer in Combination with Hashimoto's Thyroiditis	119

**Указания за авторите**

126



## Енергиен баланс и невроендокринен контрол на репродукцията

Няголова, Пресияна В., Митков, Митко Д., Орбецова, Мария М.

Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Св. Георги“, МУ – Пловдив

## Energy Balance and Neuroendocrine Control of Reproduction

Nyagolova, Presiyana V., Mitkov, Mitko D., Orbetzova, Maria M.

Department of Endocrinology and Metabolic Diseases, UMHAT „SV. Georgi“, MU – Plovdiv

### Резюме

Целта на настоящия обзор е да предостави доказателства за връзката между невроендокринните основи на метаболитното състояние на организма и репродуктивната функция. Пулсативността на гонадотропин-рилизинг хормона (ГнРХ), а следователно и нормалната функция на хипоталамо-хипофизо-гонадата ос зависи от нормалния енергиен баланс, което предполага достатъчен прием на храна и адекватен енергоразход. В случай на енергиен дисбаланс настъпва репродуктивна дисфункция. Хормоните, произведени от мастната тъкан – лептин, адипонектин и резистин, както и чревните пептиди – грелин, са от съществено значение за връзката между енергийния баланс и репродуктивната функция. Понастоящем е ясно, че фертилитетът е тясно свързан с храненето. Счита се, че невропептидите ксипептин, GALP, NPY, NKB, Dynorphin както и деривати на проопиомеланокортина (POMC), напр.  $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -endorphin са включени в този процес.

### Ключови думи:

енергиен баланс, репродуктивна функция, адипоцитокини, невропептиди

### Abstract

The aim of this review is to provide evidence for the interaction between neuroendocrine bases of the metabolic state and reproductive function. The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulses, and therefore the normal function of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis depend on the normal energy balance, which suggest adequate food intake and reasonable energy consumption. In case of energy imbalance reproductive dysfunction may occur. The adipose tissue hormones, such as leptin, adiponectin, resistin, and the gut peptides – ghrelin, are essential for the interaction between energy balance and the reproductive function. It is now clear that fertility is closely linked to the nutritional status of the body. It is believed that neuropeptides, such as kisspeptin, GALP, NPY, NKB, Dynorphin and the derivatives of proopiomelanocortin (POMC), eg.  $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -endorphin are included in this process.

### Key words:

energy balance, reproductive function, adipocytokines, neuropeptides

### Увод

Репродуктивната функция е есенциална за оцеляването на видовете, но не и за оцеляването на отделния индивид. Еволюцията развива сложни механизми, които я повлияват по различен начин. Съществува връзка между енергийната хомеостаза и репродукцията. Форми на мета-

болитен стрес, като енергиен недостиг и болестно затлъстяване се свързват с репродуктивни нарушения, вариращи от забавен пубертет до хипогонадизъм и безплодие. Репродуктивната система е организирана в три нива: хипоталамус, хипофиза и гонади. Тази хипоталамо-хипофизо-гонада ос се дефинира основно от взаимодействието на три главни групи фактори, които са обект на интензивно изучаване през последните няколко декади. Гонадотропин-рилизинг

хормонът (ГнРХ) селективно действа на питуитарните гонадотрофи като активира пулсативната секреция на гонадотропините. Лутеинизиращият (ЛХ) и фо-ликулостимулиращият хормон (ФСХ) активират соматичните клетки в гонадите за синтез на гонадни стероидни и пептидни хормони. Хипофизарните гонадотропини са необходими както в качествен, така и в количествен аспект за нормална гаметогенеза и фертилитет (1).

Основите на невроендокринологията се базират на серия експерименти, проведени от Ернст Кнобил през 60-те и 70-те години на 20-ти век. Неговата концепция за хипоталамичен ГнРХ пулсов генератор остава крайъгълен камък в репродуктивната невроендокринология. Нормалната секреция на ГнРХ е пулсативна с характерна честота и амплитуда. Ефектът на ГнРХ да повишава собствената си секреция се опосредства от „ир“-регулацията на неговите рецептори в хипофизарните гонадотропин-продуциращи клетки, която се проявява само при физиологична цикличност на 60 до 90 минути. Помалката честота причинява ановулация и аменорея поради недостатъчна стимулация. По-високата честота или постоянната експозиция на ГнРХ също води до ановулация поради „down“-регулация на експресията на ГнРХ-рецептор. По този начин се преустановява гонадотропиновия отговор. На вариациите в пулсовата му честота в различните фази на менструалния цикъл се дължат промените в нивата на ФСХ и ЛХ и на овариалната стероидогенеза в тези фази.

Към края на 80-те години се установява, че началото на гаметогенезата по време на пубертета е резултат от повишаване активността на ГнРХ, последвано от стимулирана гонадотропинова секреция. През 1975 г. Грумбах и сътр. описват бифазния модел на ЛХ-ФСХ секреция с повишени нива по време на ранното детство и пубертета и с прекъсване в детска възраст (2, 3). Такова невробиологично потискане сега представлява основен компонент от съвременните модели за началото на пубертета.

Репродукцията е високо чувствителна към състоянието на енергийния резерв и метаболитния статус на организма. Невроендокринните основи за подобна връзка са частично изяснени. Установява се, че различни „метаболитни“ хормони участват в интегрирания контрол на енергийния баланс и репродукцията. Ключов въпрос, на който предстои да се отговори, е какъв е конкретният механизъм, по който метаболитното състояние модулира активността на ГнРХ секрецията (4).

През последните 20 години научихме, че глутаматът, невропептид-У и киспептинът са важ-

ни компоненти на невробиологичната регулация на ГнРХ пулсацията. Мастната тъкан представлява активен ендокринен орган, който синтезира и отделя редица биоактивни субстанции (адипокини), участващи в поддържането на хомеостазата, кръвното налягане, липидната и възлехидратна обмяна, в репродуктивната функция.

### Киспептин – връзка между метаболитния статус и фертилитета

През последните десетина години киспептинът се утвърждава като важен компонент на невробиологичните механизми, регулиращи освобождаването на ГнРХ през постнаталното развитие. Киспептините са кодирани от Kiss1 ген, идентифициран за първи път от учени в Хърши, Пенсилвания през 1996 г. През 2001г. се съобщава, че киспептинът е лиганд на рецептор, известен като GPR54. През 2003 г. киспептин-Kiss1 сигнализирането предизвиква интерес у репродуктивните физиолози, когато две независими групи изследователи едновременно съобщават, че мутации в Kiss1 рецептора са свързани с развитието на идиопатичен хипоталамичен хипогонадизъм (5, 6).

Киспептинът се открива както в централната, така и в периферната нервна система. Най-многобройни са киспептиновите неврони в нуклеус аркуатус и антеровентралното перивентрикулярно ядро. В периферията киспептин е идентифициран в тестисите, яйчниците, предно хипофизарните гонадотрофи, панкреаса и тънките черва. Експресия е засечена и в плацентата, където допринася за регулация на имплантацията (7).

Налице са доказателства, че функцията на системата Kiss1-киспептин-GPR54 е ключова по отношение на регулацията на ГнРХ-невроните и репродуктивната ос. Киспептините директно активират ГнРХ-невроните и индуцират ГнРХ секреция. Сравнителни мета-анализи и публикувани преди тях резултати за други добре познати ЛХ секретозози предполагат, че киспептините са най-силният индиректен стимулатор на ЛХ секрецията при бозайници и хора в различни периоди на постнаталното развитие (8). Предизвиканото освобождаване на гонадотропини, от своя страна, „събужда“ гонадите. Предполага се роля на киспептина и в инициране на пубертета (9). Хипоталамичната експресия на Kiss1 и GPR54 се регулира от гонадните стероидни хормони. Натрупаните данни за участието на антеровентралното перивентрикулярно

ядро в медирането на положителната обратна връзка между естрогена, ГнРХ и ЛХ пиковете, налагат предположението, че Kiss1 невроните са включени в генерирането на преовулаторния гонадотропинов пик (10).

Централната роля на киспептините и GPR54 в контрола на ГнРХ невроните и следователно на ХХГ ос подтиква към анализирането на потенциалната функция на тази система в медирането на действието на добре познати регулатори на репродуктивната ос, различни от половите стероиди. Сред тях основна роля заема лептинът, но участие имат и други хормони – грелин, инсулин, адипонектин (11).

Няколко серии доказателства довеждат до хипотезата, че Kiss1 невроните в предния мозък действат като сензор за променения енергиен баланс и метаболитните нарушения (12). Така, киспептините се явяват ключов посредник за препредаването на информация, отнасяща се до енергийния баланс към центровете, регулиращи гонадотропната ос и допринасят за свързването на репродуктивния капацитет с енергийния баланс и метаболитния статус. Хипоталамичната Kiss1 система е доказано чувствителна на метаболитното състояние на организма, но въпросът, който се налага от тези наблюдения е кои са невроендокринните сигнали, отговорни за предаването на подобна метаболитна информация на Kiss1 невроните. Въпреки че отговорът на този въпрос предстои да бъде напълно изяснен, счита се, че доминантна роля играе лептинът.

**Лептинът** е 16 кДа пептиден хормон, съставен от 167 аминокиселини. В организма се среща в свързана и свободна форма. Последната е отговорна за функциите му на биоактивен хормон. Лептинът се отделя в малки количества от редица тъкани: стомашен епител, плацентата, мускулна тъкан, ЦНС, но се счита, че основната му продукция и секреция е от мастната тъкан (13). Установено е, че плазмените нива на лептина са право пропорционални на количеството мастна тъкан в организма. Те са по-високи при пациенти със затлъстяване отколкото при слаби индивиди, бързо спадат по време на гладуване и нарастват след хранене. Тази регулация на лептиновата секреция се контролира частично от инсулина. Натрупват се доказателства, че лептинът е важен не само за регулацията на енергийния баланс и приема на храна, но и че изпълнява роля на метаболитен и невроендокринен хормон. Той участва в глюкозния метаболизъм, взаимодейства с оста хипоталамус-хипофиза-надбъбрек, щитовидната жлеза и растежния хормон, намесва се дори в хемопоезата и имунната

система, в репродуктивните процеси (14). От натрупаните до момента данни изглежда, че лептинът взаимодейства в мозъка с почти всички известни невропептиди, които се включват в регулацията на енергийния баланс и приема на храна. Лептинът играе есенциална роля в метаболитния контрол на репродуктивната функция. Той е главният сигнал на енергийното натрупване, който стимулира и улеснява активирането на ГнРХ невроните.

Натрупват се доказателства, че Kiss1 невроните са важен компонент на аферентна хипоталамична мрежа, където лептинът индиректно модулира ГнРХ функцията, тъй като около 40% от киспептинергичните неврони в нуклеус аркуатус експресират лептинови рецептори. Вродената липса на лептин, наблюдавана при ob/ob мишки, се асоциира със сигнификантна супресия на нивата на Kiss1-мРНК в нуклеус аркуатус и предполага причинно-следствена връзка между липсата на лептин и потиснатите нива на Kiss1-мРНК (15). Тези данни свидетелстват за невроендокринен лептин-киспептин-ГнРХ път, където достатъчните нива на лептин, действащи чрез Kiss1 неврони, осигуряват правилна матурация и функция на ГнРХ невроните и съответно на хипоталамо-хипофизо-гонадната ос. Този път може да помогне да се обяснят патофизиологичните основи на голям брой репродуктивни нарушения, свързани с енергиен недостиг като анорексия невроза, екстремни физически усилия, поднормено или наднормено тегло.

Нивата на лептина варират по време на менструалния цикъл като рязко се повишават по време на лутеалната фаза. Вариращите му концентрации по време на естрогенния цикъл и пубертетното развитие и неговата асоциация с ЛХ секрецията предполага, че той играе централна роля за метаболитния контрол на невроендокринната регулация на репродуктивната функция (16).

**Инсулинът** също е включен в интеграцията на метаболизма и репродукцията. Той е анаболен хормон, който участва в контрола на метаболизма, енергийния баланс и подържането на нормално телесно тегло (17). Секретира се в отговор на прием на храна и действа върху свои ключови тъкани (скелетна мускулатура, черен дроб, мастна тъкан) като стимулира натрупването на енергия главно под формата на гликоген и мазнини. Въпреки че плазмените нива на инсулина варират периодично, базалните му нива са пропорционални на количеството мастна тъкан. Тъй като това стабилно състояние на инсулина се отразява върху енергийните резерви, циркулиращите инсулинови нива може би преда-

ват информация за дългосрочния метаболитен статус към репродуктивната ос. Инсулинът регулира ГнРХ и ЛХ секрецията. При обезитет е налице инсулинова резистентност, която нарушава инсулиновото действие. Пулсативната ЛХ секреция е потисната при състояния на инсулинов дефицит (например гладуване или диабет), а централното приложение на инсулин може да възстанови ЛХ недостатъчността при тези състояния.

**Грелинът** е идентифициран като лиганд на рецептора за стимулиране на секрецията на растежния хормон. Освобождава се от гастроинтестиналния тракт и циркулира в две основни форми – ацилиран и неацилиран, като неацилираният грелин е стабилната форма и е в по-голямо количество. Чрез ацилиране хормонът осъществява ендокринната си функция – стимулиране на секрецията на РХ, индуциране приема на храна, натрупване на мастна тъкан и регулация на енергийната хомеостаза, а също и участие в репродуктивната функция (18).

Грелинът участва в регулацията на репродуктивната система на различни нива. По отношение на ефектите му върху гонадотропната секреция, съществуват няколко *in vitro* и *in vivo* проучвания върху животни, които показват, че той повлиява негативно гонадната ос (19). При здрава хора ЛХ и ФСХ отговорът към ГнРХ не се променя при експонация с ацилиран грелин. Тези данни не подкрепят хипотезата, че грелинът има директна потискаща роля върху питуитарните гонадотропни клетки (20). Други проучвания показват, че грелинът стимулира, по дозо-зависим начин, базалната ЛХ и ФСХ секреция от хипофизата *in vitro*, което зависи от фазата на менструалния цикъл, тъй като не се наблюдава след овариетомия (3). Всички тези данни илюстрират комплексен начин на действие на грелина върху ХГ ос с преобладаващ инхибиторен ефект спрямо централните (хипоталамични) нива и ГнРХ-индуцираната гонадотропна секреция и директно стимулиращо действие върху базалния ЛХ и ФСХ синтез.

Анализи на грелин-мРНК показват експресия на гена за грелин в тестиси и в яйчници. Виани и сътр. демонстрират, че грелинът сигнификантно инхибира, по дозо-зависим начин, естрадиоловата и прогестероновата секреция от гранулозо-лутеалните клетки (21). Следователно може да се заключи, че подобен ефект може да допринесе за потискането на репродуктивната ос по време на лишението от храна, когато ограничените ресурси са разпределени за осъществяване на главните физиологични процеси (22).

**Невропептид-Y (NPY)** е хипоталамичен невро-

ендокринен протеин, член на семейство структурно свързани протеини – панкреатични полипептиди. NPY се експресира в човешкия мозък като в най-високи концентрации се намира в нуклеус аркуатус. По-голямата част от NPY невроните там коекспресират втори орексигенен невромодулятор, агути-свързан пептид (AgRP). Активността на NPY-AgRP невроните се стимулира от гладуване и се инхибира от лептин и инсулин (23). NPY се секретира от хипоталамуса и стимулира апетита, предизвиквайки хиперфагия, увеличаване на мастните депа, намаление на термогенезата и потискане на симпатиквата активност (24).

NPY повлиява ГнРХ и гонадотропиновата секреция, като ефектите са зависими от стероидната среда. Оказва стимулиращ ефект по отношение на ГнРХ и ЛХ секрецията при интактни яйчници. Това най-вероятно се дължи на способността на естрадиола да стимулира експресията на NPY1 рецептори (25). Натрупват се данни за участието на хормона в медирането на положителната обратна връзка между естрогена, ГнРХ и ЛХ и в генерирането на преовулаторния гонадотропнов пик (26). Централното приложение на NPY стимулира ГнРХ и ЛХ секрецията при овариетомизирани животни. Стимулиращите му ефекти, обаче са ограничени – хроничното му приложение забавя половото съзряване и води до нарушения в менструалния цикъл (27). Предполага се, че секрецията на NPY от нуклеус паравентрикуларис се повишава от сигнали за отрицателен енергиен баланс (напр. ниски циркулиращи нива на глюкоза, мастни киселини, лептин и инсулин), като по този начин се стимулира храненето. Повишените му нива в преоптичната зона обаче потискат освобождаването на ГнРХ (28). В този случай NPY има предимно негативен ефект върху репродуктивната функция. Възможно е NPY да играе значима роля в метаболизма и репродукцията само при състояния на ниски енергийни резерви. Така пептидът вероятно действа като централен интегратор на метаболизма и репродукцията (29).

### Киспептин неврони и регулация на хипоталамо-хипофизо-гонадната ос

**Неврокинин В (NKV)** принадлежи към групата на тахикинините. Невроанатомични проучвания показват NKV-експресия в ключови хипоталамични неврони на инфундибулума и нуклеус аркуатус, които са високо чувствителни към половите стероиди. През 2007г. се установява, че Kiss1

невроните на нуклеус аркуатус коекспресират NKВ, а също и динорфин. Ултраструктурни проучвания на еминенция медиана показват, че NKВ модулира ГнРХ секрецията не чрез синаптично предаване, а директно. Вероятно съществува мрежа от неврони в нуклеус аркуатус, зависими от половите стероиди, коекспресиращи киспептин, неврокинин В, динорфин и естрадиолов  $\alpha$ -рецептор. Те комуникират помежду си ипси- и контралатерално и по този начин синхронизират активността си и изпращат сигнал към ГнРХ-окончанията в еминенция медиана за пулсативна секреция на ГнРХ (30).

Предложен е модел, който включва автосинаптични ефекти на NKВ и динорфин в KNDу (**K**isspeptin, **N**eurokinin B, **D**ynorphin) невроните на нуклеус аркуатус за координирането и формирането на пулсативната секреция на киспептин, а с това и освобождаването на ГнРХ от еминенция медиана (31). Стимулаторната активност на NKВ постепенно нараства и когато преодолее инхибиторното действие на динорфин, KNDу невроните се активират. Това начално активиране се усилва чрез механизъм на обратна връзка, медиран от сигнализиране, разпространяващо сред клетките в мрежата, за да предизвика синхронизирана деполаризация на участващите неврони. Следва забавено инхибиране, медирано от динорфиновото действие чрез неговия рецептор, което отменя NKВ индуцираната деполаризация. Този цикъл се повтаря, пораждайки пулсативно освобождаване на киспептин и ГнРХ (32).

**Галанин-подобен пептид (GALP)** е 60-аминокиселинен неuropeптид, който е изолиран през 1999 г. GALP-експресиращите клетки са ограничени и се откриват главно в нуклеус аркуатус и неврохипофизата. GALP-позитивните неврони в нуклеус аркуатус достигат различни мозъчни участъци, където осъществяват контакт с множество невромодулатори, включени в регулацията на енергийната хомеостаза и репродукцията. Това предполага роля на GALP в тези физиологични функции. В подкрепа на това твърдение, генната експресия на GALP се регулира от различни фактори, които отразяват метаболитното състояние, включително метаболитните хормони лептин и инсулин, тиреоидните хормони и кръвнотехарните нива (33). *In vitro* проведени проучвания предполагат, че именно лептинът стимулира GALP-невроните в нуклеус аркуатус на хипоталамуса. GALP антисерум блокира лептин-индуцираното ГнРХ освобождаване. Потвърждава се, че GALP играе важна роля като междинен невроендокринен сигнал между лептина и хипоталамо-хипофизо-гонадна ос, а това

действие най-вероятно е медирано от нов рецептор (34). Инжектиране на GALP в ц.н.с. стимулира ГнРХ-медираната секреция на ЛХ. Тези наблюдения показват, че GALP е молекулярен сигнал, който свързва метаболизма с невроендокринната репродуктивна система и по този начин регулира репродуктивната активност като функция на енергийното състояние (35).

## Заклучение

Понастоящем е ясно, че фертилитетът е тясно свързан с храненето, но клетъчните и молекулярните механизми, които представляват връзката между енергийните резерви и репродукцията все още не са напълно изяснени. Счита се, че неuropeптидите GALP, NPY, киспептин както и деривати на POMC, напр.  $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -endorphin са включени в този процес. Причините за това предположение са няколко:

- невроните, които експресират тези неuropeптиди се откриват в нуклеус аркуатус на хипоталамуса – важен център, участващ в регулацията както на метаболизма, така и на репродуктивната функция;
- всички тези неuropeптиди се регулират от метаболитните хормони лептин и инсулин;
- повлияват по директен или индиректен път както храненето и метаболизма, така и секрецията на ГнРХ и ЛХ.

Колкото повече нараства броят на идентифицираните адипокيني и пептиди на гастроинтестиналния тракт, които се включват в енергийната хомеостаза, толкова повече нараства и броят на потенциалните връзки между енергийното състояние и ХХГ<sup>ma</sup> ос. И тъй като повечето проучвания, свързани с невроендокринната регулация, са правени при животни, необходими са допълнителни изследвания в тази област при хора, които да прецизират ролята на различните периферни метаболитни сигнали върху активирането и подържането на гонадотропната ос.

1. Michalakis K., Mintziori G., Kaprarab A., Tarlatzis B.C., Goulis D.G. The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: A narrative review. *Metabolism*. 2013; 62(4): 457-78.
2. Conte FA, Grumbach MM and Kaplan SL. A diphasic pattern of gonadotropin secretion in patients with the syndrome of gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1975; 40:670-675.
3. Teles MG, Bianco SD, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, Xu S, Seminara SB et al. A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med* 2008; 358: 709-715.
4. Fernandez-Fernandez R., Martini A.C., Navarro V.M., Castellano J.M., Dieguez C., Tena-Sempere M. et al. Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Mol. Cell Endocrinol*. 2006; 254-255: 127-132.
5. De Roux N., Genin E., Carel J.C., Matsuda F., Chaussain J.L., Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:10972-10976.
6. Seminara S.B., Messenger S., Chatzidaki E.E., Thresher R.R., Acierno J.S. Jr., Shagoury J.K. et al. et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *New England Journal of Medicine* 2003; 349: 1614-1627.
7. Oakley A.E., Clifton D.K., Steine R.A. Kisspeptin Signaling in the Brain. *Endocrine Reviews*. 2009; 30: 713-743.
8. Jayasena C.N., Nijher G.M., Chaudhri O.B., Murphy K.G., Ranger A, Lim A. et al. Subcutaneous injection of kisspeptin-54 acutely stimulates gonadotropin secretion in women with hypothalamic amenorrhea, but chronic administration causes tachyphylaxis. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:4315-23.
9. Roa J. Aguilar E., Dieguez C., Pinilla L., Tena-Sempere M. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front Neuroendocrinol*. 2008; 29(1): 48-69.
10. William H. Colledge. Kisspeptins and GnRH neuronal signalling. *Trends Endocrinol Metab*. 2009; 20(3): 115-121.
11. Bohler H. Jr., Mokshagundam S., Winters S.J. Adipose tissue and reproduction in women. *Fertil Steril*. 2010; 94: 795 -825.
12. Luque R.M., Kineman R.D., Tena-Sempere M.. Regulation of hypothalamic expression of KiSS-1 and GPR54 genes by metabolic factors: Analyses using mouse models and a cell line. *Endocrinology*. 2007; 148(10): 4601-4611.
13. Yan P., Liu D., Long M., Ren Y., Pang J., Li R. Changes of serum omentin levels and relationship between omentin and adiponectin concentrations in type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2011; 119(4): 257-263.
14. Baratta M. Leptin - from a signal of adiposity to a hormonal mediator in peripheral tissues. *Med. Sci. Monit*. 2002; 8(12): 282-292.
15. Hausman G.J., Barb C.R., Clay A. Lents. Leptin and reproductive function. *Biochimie*. 2012; 94(10): 2075-2081.
16. Ludwig M., Klein H.H., Diedrich K., Ortmann O. Serum leptin concentrations throughout the menstrual cycle, *Arch. Gynecol. Obstet*. 2000; 263: 99-10.
17. Kanzaki M., Pessin J.E. Signal integration and the specificity of insulin action. *Cell Biochem Biophys*. 2001;35(2):191-209.
18. Seim I., Herington A.C., Chopin L.K. New insights into the molecular complexity of the ghrelin gene locus. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;20:297-304.
19. Lorenzi T., Meli R., Marzioni D., Morroni M., Baragli A, Castellucci M. et al. Ghrelin: a metabolic signal affecting the reproductive system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;20:137-52.
20. Baragli A, Lanfranco F., Allasia S., Granata R., Ghigo E. Neuroendocrine and metabolic activities of ghrelin gene products. *Peptides*. 2011;32(11):2323-2332.
21. Viani I, Vottero A, Tassi F, Cremonini G, Sartori C, Bernasconi S, Ferrari B, Ghizzoni L. Ghrelin inhibits steroid biosynthesis by cultured granulosa-lutein cells. *Clin. Endocrinol Metab*. 2008;93(4):1476-8.
22. Repaci A, Gambineri A, Pagotto U, Pasquali R. Ghrelin and reproductive disorders. *Mol Cell Endocrinol*. 2011; 340(1):70-79.
23. Hahn, T.M. et al. Coexpression of AgRP and NPY in fastigivated hypothalamic neurons. *Nat. Neurosci*. 1998; 1, 271-272
24. Orbetzova, M.M., Koleva, D.I., Mitkov, M.D., Atanassova, I.B., Nikolova, J.G., Atanassova, P.K., Genchev, G.D. Adipocytokines, neuropeptide Y and insulin resistance in overweight women with gynoid and android type of adipose tissue distribution. *Folia medica*. 2012; 54 (3): 22-29.
25. Hill, J.W. et al. Estrogen induces neuropeptide Y (NPY) Y1 receptor gene expression and responsiveness to NPY in gonadotropenriched pituitary cell cultures. *Endocrinology* 2004; 145, 2283-2290
26. Bauer-Dantoin, A.C. et al. Neuropeptide Y gene expression in the arcuate nucleus is increased during preovulatory luteinizing hormone surges. *Endocrinology* 1992; 131, 2953-2958
27. Toufexis D., Kyriazis D., Woodside B: Chronic neuropeptide Y Y5 receptor stimulation suppresses reproduction in virgin female and lactating rats. *J Neuroendocrinol* 2002; 14: 492-497.
28. Acosta-Martinez M., Horton T, Levine JE. Estrogen receptors in neuropeptide Y neurons: at the crossroads of feeding and reproduction. *Trends Endocrinol Metab*. 2007;18(2):48-50.
29. Crown A, Clifton D.K, Steiner R.A. Neuropeptide Signaling in the Integration of Metabolism and Reproduction. *Neuroendocrinology*. 2007; 86(3):175-82.
30. Topaloglu A.K., Semple R.K.. Neurokinin B signalling in the human reproductive axis. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;346(1-2): 57-64.
31. Navarro, V.M., Castellano, J.M., McConkey, S.M., Pineda, R., Ruiz-Pino, F., Pinilla, L., Clifton, D.K., Tena-Sempere, M., Steiner, R.A. Interactions between kisspeptin and neurokinin B in the control of GnRH secretion in the female rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 2010; 300: 202-210.
32. Wakabayashi, Y., Nakada, T., Murata, K., Ohkura, S., Mogi, K., Navarro, V.M. et al. Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J. Neurosci*. 2010; 30, 3124-3132
33. Lawrence C, Fraley G.S. Galanin-like peptide (GALP) is a hypothalamic regulator of energy homeostasis and reproduction. *Front Neuroendocrinol*. 2011; 32(1):1-9
34. Seth A, Stanley S, Jethwa P, Gardiner J, Ghatei M, Bloom S. Galanin-like peptide stimulates the release of gonadotropin-releasing hormone in vitro and may mediate the effects of leptin on the hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Endocrinology*. 2004; 145(2):743-50
35. Gottsch M.L., Clifton D.K., Steiner R.A. Galanin-like peptide as a link in the integration of metabolism and reproduction. *Trends Endocrinol Metab*. 2004;15(5):215-221

## Address for correspondence:

## Д-р Пресияна Няголова

Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Св. Георги“, МУ- Пловдив  
гр. Пловдив, бул „Васил Априлов“ 15А, 4002  
E-mail: Presiyana\_Nyagolova@abv.bg

## Dr. Presiyana Nyagolova,

Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases  
„Sv. Georgi“, University Hospital, MU - Plovdiv  
Plovdiv, 15A Vasil Aprilov blvd.  
E-mail: Presiyana\_Nyagolova@abv.bg

## VEGF и карцином на щитовидната жлеза, туморна ангиогенеза, дендритни клетки

Иванова, Кони, Йонал, Ерман, Гълъбова, Мая

Катедра по обща и клинична патология, Медицински факултет, Тракийски Университет, Стара Загора

## VEGF and Thyroid Cancer, Tumor Angiogenesis, Dendritic Cells

Ivanova, Koni, Onal, Erkan, Gulubova, Maya

Department of general and clinical pathology, Medical faculty, Trakia University, Stara Zagora

### Резюме

Ракът на щитовидната жлеза представлява едно от най-честите заболявания на ендокринната система. Много фактори, включително и васкуларният растежен ендотелен фактор (VEGF), са свързани с щитовидната туморогенеза. VEGF е цитокин, който играе ключова роля в туморната ангиогенеза и е митоген за съдовите ендотелни клетки и различните дендритни клетки, чиито типове са известни.

Семейството на VEGF включва шест цитокина: а именно VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, плацентен растежен фактор и VEGFE. VEGFA съществува в пет различни изоформи 121, 145, 165, 189 и 206 аминокиселини. Тези изоформи се свързват главно с VEGFR-2, въпреки че VEGF има афинитет главно към VEGFR-1. Няколко проучвания посочват, че VEGF имуноекспресията е интензивна при папиларен (PTC), фоликуларен (FTC), медуларен карцином, онкоцитом, болест на Graves и е слаба в нормалната щитовидна жлеза. VEGF-A индуцира неоангиогенезата в тумора, може да осъществява инхибиторен ефект върху зреенето и диференциацията на дендритните клетки и стимулира туморната прогресия. Доказано е, че VEGF, добавен в туморна среда, потиска зреенето на дендритните клетки, инхибира и експресията на CD80 и CD54, но не и на CD56 и HLA-DR.

Целта на настоящия обзор е да представи ролята на семейството VEGF и неговите цитокини в туморната ангиогенеза, както и ин-

### Abstract

Thyroid cancer is one of the most common diseases of the endocrine system. Many factors including vascular endothelial growth factor (VEGF) are associated with thyroid tumorigenesis. VEGF is a cytokine that plays a key role in tumor angiogenesis and is a mitogen for vascular endothelial cells and certain dendritic cells.

The VEGF family includes six cytokines: VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, placental growth factor and VEGFE. VEGFA exists in five different isoforms: 121, 145, 165, 189 and 206 amino acids. These isoforms are mainly related to VEGFR- 2, although VEGF has affinity mainly to VEGFR- 1. Several studies have shown that VEGF immune expression is intensive in papillary (PTC), follicular (FTC), medullary, carcinomas, Graves' disease, and is low in normal thyroid gland. VEGF-A induces neoangiogenesis in the tumor, may exert an inhibitory effect on the maturation and differentiation of dendritic cells and promotes tumor progression. It has been shown that added to the tumor environment, VEGF inhibits the maturation of dendritic cells and inhibits the expression of CD80 and CD54, but not CD56 and HLA-DR.

The purpose of this review is to present the role of VEGF and its family of cytokines in tumor angiogenesis, as well as its inhibitory effect on the maturation and differentiation of the dendritic cells, and stimulation of tumor progression.

хипоторния му ефект върху зреенето и диференциацията на дендритните клетки и стимулирането на туморната прогресия. Разгледана е възможността за приложение на резултатите от изследването на VEGF сигналния път в диагностиката и прогнозирането на карцинома на щитовидната жлеза.

### Ключови думи:

VEGF, дендритни клетки, карцином, щитовидна жлеза.

Карциномът на щитовидната жлеза е един от петте най-често срещани злокачествени тумори във възрастта между 20 и 50 години. В сравнение с други злокачествени тумори той се свързва с по-дълга преживяемост, особено когато е по-високо диференциран (1). Възрастта, туморната големина, стадият на развитие, екстранодалното разпространение, както и дистантните метастази, са част от добре проучените параметри, но напоследък съвременните автори посочват като важни предиктори и множество клетъчни, молекулни и генетични фактори (2). Връзката между развитието на неоплазмите на щитовидната жлеза и различни молекулни фактори, играещи роля по отношение прогнозата на процеса, продължават да бъдат обект на дискусия в ендокринната онкопатология, тъй като се наблюдава тенденция за увеличаване появата и развитието на злокачествени тумори. Досега не са известни надеждни прогностични маркери, определящи туморната прогресия при този карцином.

Проучени са различни молекулярни механизми, отговорни за развитието на различни хиперпластични и неопластични лезии на щитовидната жлеза. Проучено е активирането на някои прото-онкогени и рецептори за растежни фактори (Braf, ras, ret NTRK, met, gsp, TSH-рецептор), промени в туморно супресорни гени като p53 и Rb, както и генни пренареждания и хромозомни транслокации (ret/PTC, NTRK, Pax-8/PPAR- $\gamma$ ) и други специфични фактори като йодният дефицит и йонизиращата радиация. (2,3).

От друга страна, ангиогенезата се явява като ключов фактор в патогенезата и развитието на неоплазмени процеси, кдето образуването на нови кръвоносни съдове е от особена важност при снабдяването с кислород и други важни хранителни вещества на самия тумор.

Васкуларният ендотелен растежен фактор (VEGF) се явява един от основните потенциални регулатори на ангиогенезата и клетъчната ми-

The opportunity to apply the results of the research on VEGF signaling pathway in the diagnosis and prognosis of thyroid cancer is explored.

### Key words:

VEGF, dendritic cells, cancer, thyroid gland.

грация като потенциален митоген фактор, който оказва влияние върху ендотелните клетки. Освен това VEGF предизвиква повишаване на съдовия пермеабилитет, участва и във фенестрирането на кръвоносните съдове. VEGF играе важна роля в ранния етап на канцерогенезата, като подпомага растежа на тумора чрез образуване на мрежа от нови съдове (4).

Семейството на VEGF включва 6 цитокина: а именно VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD (или FIGF), плацентен растежен фактор и VEGFE (23,25). Всички представители на семейството VEGF стимулират клетъчната реакция чрез свързване с рецепторите на тирозин-киназата, разположени по повърхността на таргетните клетки, чрез димеризация и активиране на трансфосфорилацията. Тези рецептори се характеризират с наличието на 7 имуноглобулин-подобни домена в тяхната екстрацелуларна част, които се разглеждат като част от нова субфамилия на тирозин-киназните рецептори (7). Напоследък е доказано, че VEGF и неговите рецептори се експресират от редица туморни клетки като клетки от панкреасен карцином (8) и клетки от простатен карцином (9) и CRC (8). Няколко проучвания демонстрират експресия на VEGF в нормална щитовидна жлеза, както и в аденони и карциноми на щитовидната жлеза (10-14). Всички тези автори посочват, че VEGF имуноекспресията е интензивна при папиларен (PTC), фоликуларен (FTC), медуларен карцином, онкоцитом, болест на Graves и е слаба в нормалната щитовидна жлеза (14,15).

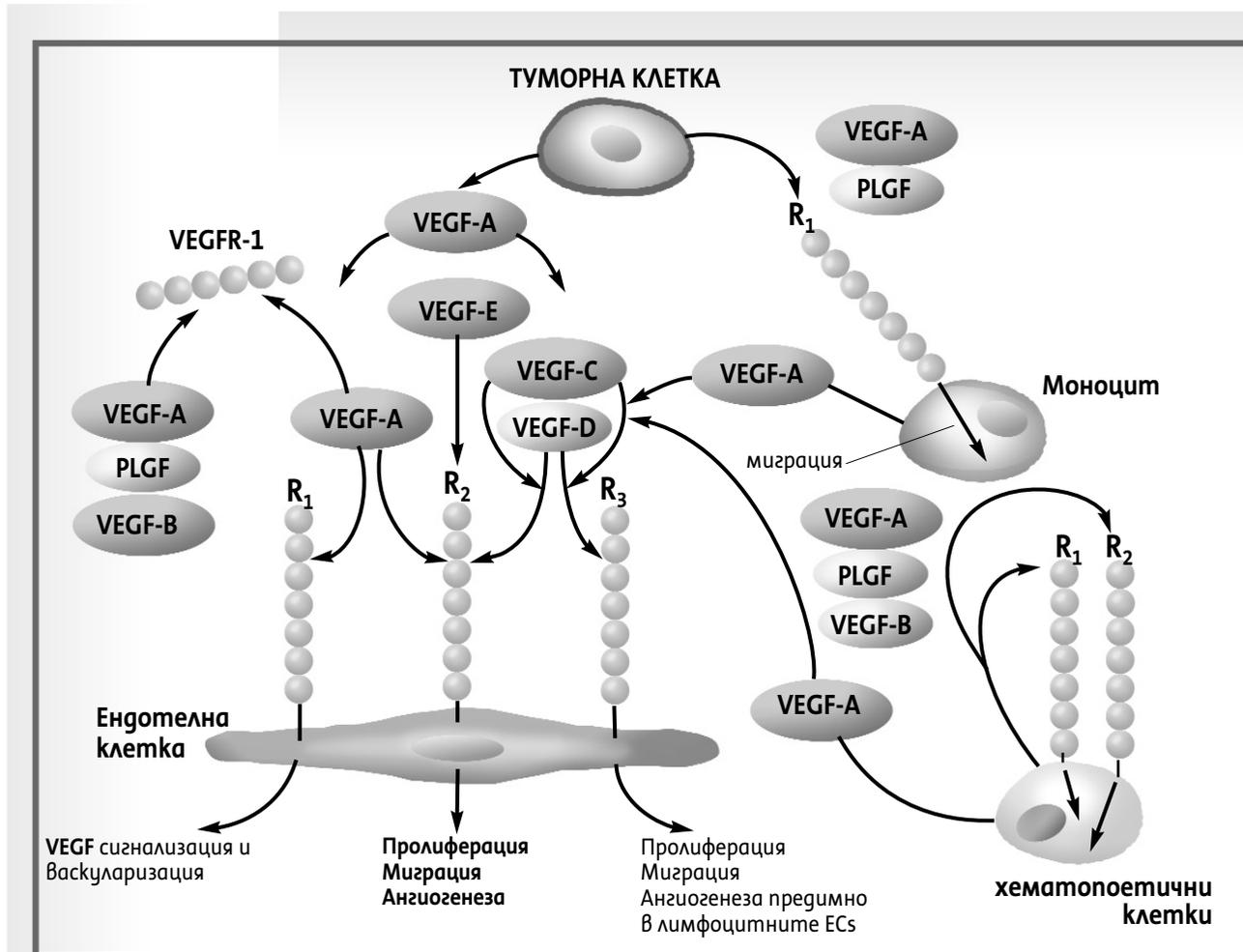
Yamada et al., 2006 показват, че високи концентрации на йод намаляват експресията на VEGF. Свърхекспресията на VEGF в PTC колерира с наличието на метастази и рецидиви на тумора. (14). Някои автори показват, че при карциномите на щитовидната жлеза VEGF се експресира най-интензивно в PTC, следвано от FTC и PDT (7). Доказано е, че имунореакцията за VEGF и VEGFR-1 е по-силна при пациенти с диференцирани тиреоид-

дни карциноми в сравнение с пациенти с нодуларна струма (4). Експресията на VEGFR-1 и VEGFR-2 варира минимално при различни болести на щитовидната жлеза. Най-силно е отчетена редуцията на тези рецептори в щитовидната жлеза при болестта на Graves (9). Nagura et al., 2001 показват, че при болестта на Graves RNA за VEGFR-1 се експресира в ендотелните клетки.

VEGFR-1 се експресира главно от ендотелните клетки, от макрофаги, моноцити (16) и от тромбоцити (6). VEGFR-1 се експресира от ендотелните клетки на нормална щитовидна жлеза в PTC и FTC (13,17). Тези автори показват, че в серийни срези VEGFR-1 и VEGF и VEGFR-2 и VEGF се ко-експресират в съдовия ендотел в такава степен, независимо от тиреоидната патология. В едно проучване се посочва, че VEGFR-1 се

експресира от туморните тиреоцити (7). Впоследствие е намерено, че VEGFR-2 също се експресира от туморните тиреоцити (18,19). Предполага се, че туморните тиреоцити, които експресират VEGFR-1 и VEGFR-2 могат да отговарят на VEGF сигнала от същите клетки по автокринен или паракринен път (Фиг. 1).

VEGF-C е лиганд на VEGFR-3 (20, 21) и е един от най-силните лимфангиогенни фактори. VEGFR-3 (get\_4) се експресира върху ендотела на клетъчните съдове (2, 19) и се ко-локализира с маркера за лимфни съдове D2-40 (22). Някои проучвания показват, че VEGF-C има свърхекспресия при тиреоиден карцином (11,12,15,23). Установено е, че VEGF-C се експресира в най-висока степен при PTC (2). Нещо повече, високото ниво на експресия на VEGF-C и RNA се наблюдава само при PTC,



**Фигура 1.** VEGF тирозин-киназният рецептор в различни клетъчни типове.

VEGFR-1 и VEGFR-2, са изразени в повечето кръвни ендотелни клетки, докато VEGFR-3 е до голяма степен ограничен до лимфните ендотелни клетки. VEGFA свързва VEGFR-1 и VEGFR-2, докато PLGF и VEGFB взаимодействат само с VEGFR-1. VEGFC и VEGFD свързват VEGFR-2 и VEGFR-3. Има много доказателства, че VEGFR-2 е основният медиатор на митозеза, както и на ангиогенеза и микроваскуларна пропускливост, от друга страна VEGFR-1 може по време на ранното ембрионално развитие да извърши инхибиторна роля на секвестриране на VEGF и предотвратяване на неговото взаимодействие с VEGFR-2. Рецепторите - R1, VEGFR-1, R 2, VEGFR-2, R 3, VEGFR-3. (Ferrara N et al. Nat. Med 2003;9:669-676.).

но не и при FTC. При изследвания чрез *in situ* хибризация или количествен PCR анализ (4,10) е доказано, че експресията на VEGFс гена в тъкани от щитовидната жлеза не се асоциира със специфична патологична единица. Докато VEGF-C и RNA експресия се наблюдава при агенони, струма или при аутоимунен тиреоидит (21), VEGF-C свърхекспресията превалява при тиреоидни агенони и карциноми (14).

VEGF-A е най-добре изученият и важен член на генната фамилия. VEGF-A, съществува в пет различни изоформи 121, 145, 165, 189 и 206 аминокиселини (24). Тези изоформи се свързват главно с VEGFR-2, въпреки че VEGF има афинитет главно към VEGFR-1. VEGFR-1/Flt-1 и VEGFR-2/KDR са високо чувствителни тирозин-киназни рецептори (25, 26). VEGF-A е един от основните регулаторни фактори, както на физиологичната, така и на патологичната ангиогенеза.

VEGFA експресията е увеличена при PTC, FTC и медуларен карцином в сравнение с папиларен микрокарцином и доброкачествени лезии, където тази експресия е намалена. (2). VEGFA увеличава пролиферацията и миграцията на ендотелните клетки и съдовия пермеабилитет чрез индуциране на пори или фенестрация по ендотелните клетки (8). Значението на VEGF-A в развитието на съдовата система се потвърждава от факта, че ранната му деактивация по време на ембрионалното развитие води до смущения в развитието на съдовете (5).

### VEGF и дендритни клетки (ДК)

ДК са способни да активират наивните Т-клетки, които се намират в тъканите в незряло състояние и експресират ниски нива на ко-стимулаторните молекули CD83 и CD86. Незрелите ДК разпознават и улавят туморните антигени, след което съзряват, стимулирани от IFN- $\alpha$  или TLR антагонисти. ДК, които секретират високо ниво на IL-12p70, индуцират имуен отговор като активират CD4+T хелперите (Th1 клетките) и цитотоксичните CD8+ Т лимфоцити. В допълнение, ДК активират NK и NKT клетките. (3, 17, 23). Туморите от своя страна избягват имунния отговор чрез секреция на цитокини и други фактори, които потискат диференциацията и зреенето на дендритните клетки. Един от тези „про-туморни“ фактори е VEGF.

VEGF-A индуцира неоангиогенезата в тумора, може да осъществява инхибиторен ефект върху зреенето и диференциацията на ДК и стимулира туморната прогресия (15,17). Доказано е, че VEGF, добавен в туморна среда, потиска зреене-

то на ДК, инхибира и експресията на CD80 и CD54, но не и на CD56 и HLA-DR (1). VEGF потиска и секрецията на IL-12p70 от ДК. Dela Porta M et al. 2005 откриват, че една и съща популация от ДК с моноцитен произход експресират едновременно маркери на зрели ДК и на съдови ендотелни клетки. Този процес на ендотелизация на ДК се характеризира с изчезване на левкоцитните маркери CD1a и CD83 и експресия на ендотелни маркери като von Willebrand factor (vWF), VEGFR-2 и E-cadherin. Същевременно този тип ДК проявяват редуцирана способност да активират Т-клетките и CD86 и МНС клас II се експресират с тези на зрелите ДК (11). Други автори показват, че в клетъчна култура популацията от CD34+ -CD14+ моноцити при условия, индуциращи ангиогенезата, придобиват ДК-фенотип като експресират CD1a (22, 27).

Чрез культивиране на костно-мозъчни клетки в среда с GM-CSF (4) получават <97% чиста популация от CD34+ и CD11c+ DCs, които имат качества на класически ДК – звездовидна форма, фагоцитоза на апоптични туморни клетки, флуоресцентно белязани. Тези ДК индуцират туморните клетки, пролиферацията и секрецията на IFN- $\alpha$  и на IL-2 от лимфоцитите. CD34+ и CD11c+ ДК в туморната среда експресират високи нива на VEGF, а след 7 дни експресират CD31 (имунохистохимично). Чрез флуоцитометрия е доказано, че CD11c+ ДК експресират също CD34, CD45, CD31 като показват морфологични и молекулни качества на ендотелни клетки.

Чрез EM е показано, че тези клетки съдържат телца на Weibel-Palade и ендотелни везикули, те образуват междуклетъчни връзки и се организират около лумен (28). Незрелите ДК улавят антигени, включително туморни антигени и се подлагат на функционални процеси на зреене в отговор на IFN- $\alpha$  в МНС клас I или клас II. Зрелите ДК секретират IL - 12p70 и повишават клетъчната активност на специфични CD8 + Т-клетки, които индуцират Th1 ефективен анти-туморен имуен отговор (7, 12, 28). ДК са едни от първите клетки, инфилтриращи тумора. Със своя имуногенен или толерогенен ефект те могат да имат положителен или отрицателен ефект върху туморната прогресия (16).

Повишената експресия на VEGF е характерна за диференцираните тиреоидни карциноми и се асоциира с повишен растеж, прогресиране и инвазивност на тумора с паралелно намаляване на преживяемостта. Именно поради това, инхибитор на ангиогенезата и лимфогенезата, който потиска VEGFR-1, VEGFR-2 и VEGFR-3, би могъл да бъде ефективен след неуспех на стандартната терапия.

Участието на редица онкогени, генетични мутации и дефекти, както в сигналните пътища така и в ангиогенезата, които водят до развитие и прогресия на тумора, са част от патогенезата на рака на щитовидната жлеза. Тази концепция през последните години доведе до разработването на различни таргетни молекулярни терапии (29).

Нивата на VEGF корелират с туморния стадий, размера на тумора и развитие на далечни метастази при наличие на мутацията V600E в гена *Braf*. В основата на тези механизми е и идеята за разработване на нови медикаменти, които таргетират специфични онкогени или растежни фактори, стимулиращи ангиогенезата (30). Тези групи медикаменти се наричат още и инхибитори на тирозин-киназата, които се разделят в две категории: малки молекули, инхибиращи тирозин-киназата и блокиращи АТФ достъпа, и специфични антитела, които се свързват с рецепторите на тирозин-киназата и увреждат тяхната функция. Най-обещаващи за лечение на рака на щитовидната жлеза са инхибиторите на онкогенни сигнални системи и, особено, тези, активирани от RET/PTC, RAS и BRAF мутации (31). Други насочени терапии предвиждат използването на други хуманизираны антитела срещу ключов фактор на растежа като епидермален растежен фактор или съдов ендотелен растежен фактор.

След като каталитичните домени на тирозин-киназите са много сходни, инхибиторите на малки молекули често се характеризират с липса на специфичност, което, обаче, в някои области като например карцином на щитовидната жлеза, може да бъде благоприятно (7). Всъщност, капацитетът на киназните инхибитори може да блокира не само специфичните онкогени, но също така и други рецептори и медиатори, участващи в развитието на рака, чрез потенциране на анти-туморното действие (10). В частност, инхибирането на VEGFRs, получен от рецептор на тромбоцит растежен фактор (PDGFR) и евентуално други про-ангиогенетични рецептори, чрез блокиране на туморната ангиогенеза значително допринасят за увреждане растежа на рака. Въпреки това, спецификата на много от тези молекули е отговорна и за техните странични ефекти, които понякога могат да бъдат сериозни (29, 32, 33).

RET представлява прото-онкоген кодиращ мембранен рецептор на семейството на тирозин киназата, който нормално не се експресира в клетки на тироидните фоликули, докато в папиларен карцином на щитовидната жлеза, RET проявява активност (5, 16). Това активиране се осъ-

ществява посредством хромозомната рекомбинация, състояща се от вътреклетъчната тирозин-киназа домен на RET, свързан към N-терминалния фрагмент на хетероложен ген. Няколко форми са идентифицирани досега, които се различават в зависимост от гените, участващи в пренареждането. Най-често срещаните са RET/PTC1 (RET киназа кондензиран с генния продукт H4) и RET/PTC3 (RET киназа кондензиран с генния продукт RFG). В спорадичните папиларни карциноми на щитовидната жлеза при възрастни пациенти разпространението на RET / PTC пренареждания варира от 5 до 40%, но това е по-често при деца и след излагане на радиация по време на детството (до 80%) (30, 34).

Семейството на малките молекули на тирозин-киназните инхибитори включват следните медикаменти: Axitinib, Motesanib, Sorafenib, Vandetanib, Sunitinib и XL184. Всичките тези медикаменти са изследвани в няколко фази и основно проявяват своята инхибиторна дейност върху RET, VEGFR, EGFR, PDGF-beta, c-KIT и други кинази. (16, 33).

Доказан перорален инхибитор на тирозин киназата на VEGFR-1, VEGFR-2 и VEGFR-3 е Motesanib diphosphate, който може да индуцира частична ремисия при пациенти с напреднал или метастатичен диференциран тиреоиден карцином. По данни от проучване на Rosen et al. 2007, доза на медикамента 125 mg/гн. води до изразена антитуморна активност при пациенти с диференциран тиреоиден карцином (61% от изследваната група са били с папиларен тиреоиден карцином). За период от 24 седмици лекарството е било ефективно при по-голямата част от пациентите, като е постигнало стабилизиране на заболяването (при 67%) или частичен отговор (при 14%) (16).

Лечението на рефрактерните на радиоактивен йод диференцирани тумори, метастатични медуларни тиреоидни карциноми и анапластични карциноми все още са предизвикателство в клиничната практика.

Експресията на VEGF при рак на щитовидната жлеза е показана по-рано при *in vivo* и *in vitro* изследвания (2, 9, 34), но все пак ролята на VEGF не е напълно изяснена. Някои автори съобщават, че по-високата оценка на VEGF при имунохистохимично изследване корелира с присъствието на метастази в лимфни възли или далечни метастази при папиларен рак на щитовидната жлеза (20). Други автори са показали, че прекомерна експресия на VEGF в туморните клетки на папиларен карцином е свързана с размера на тумора при възрастни и деца (7). Повишена експресия на моноцитни гендритни клет-

ки е намерена в добре диференциран рак на щитовидната жлеза и, особено, при папиларен карцином, докато намалената експресия води до лоша прогноза и намалена преживяемост (8,24,29). Доказано е, че VEGF, IL-6 и TGF-beta затормозяват зреенето на ДК в туморите, спират диференциацията им и намаляват активността им. Изследвания, проведени през последните години, показват, че една и съща популация на моноцитни ДК може да показва фенотипните си свойства на зрели ДК при възпалителни състояния или алтернативно тези ДК клетки могат да се гържат като ендотелни клетки. Следователно, някои цитокини, растежни фактори и хемокини в туморната микросреда играят съществена роля при инфилтрацията, зреенето, диференциацията и функцията на ДК. Изследването на тези взаимоотношения би хвърлило повече светлина върху туморната прогресия.

Съществуват редица проучвания, доказващи, че повишената неоплазмена ангиогенеза силно корелира и с агресивността на тумора, по-голя-

ма честота на метастазите и по-ниска преживяемост на пациенти с различни видове карциноми (8). Някои автори съобщават, че по-високата експресия на VEGF корелира с наличието на метастази в лимфни възли или далечни метастази при папиларен рак на щитовидната жлеза (9). Други показват, че свързването на VEGF в туморни клетки, е свързана с размера на туморната формация (3).

VEGF играе важна роля в ранния етап на канцерогенезата като подпомага растежа на тумора чрез образуване на мрежа от нови съдове, като има и инхибиторен ефект, върху зреенето и диференциацията на ДК в тумора.

В заключение може да се посочи, че VEGF експресията в туморни клетки при рак на щитовидната жлеза може да предизвика неоваскуларизация и стимулиране на туморната прогресия. Всички тези данни показват, че туморната микросреда може да предизвика ендотелизация на генеритните клетки.

## References

1. **Gerena J, Preumont V, Rahier J, Daumerie Ch, Buyssschaert M.** Hurthle cell thyroid carcinoma; report cases. *Acuta Clinica Belgica*, 2002;57(3):148-153.
2. **De la Torre NG, Buley I, Wass JAH, Turner HE.** Angiogenesis and lymphangiogenesis in thyroid proliferative lesions: relationship to type and tumor behaviour. *Endocrine-Related Cancer* 2006; 13;931-944.
3. **Kim DS, McCabe CJ, Buhanan MA and Watkinson JC:** Oncogenes in thyroid cancer. *Clinical Otolaryngology and Allied Sciences* 2003;28:439-443
4. **Karaca Z, Tanriverdi F, Unluhizarci K, Ozturk F, Gokahmetoglu S, Elbuken G, Cakir I, Bayram F, Kelestimur F.** VEGFR1 expression is related to lymph node metastasis and serum VEGF may be a marker of progression in the follow-up of patients with differentiated thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 2011; 164;277-284.
5. **Robinson CJ, Stringer SE.** The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 2001; 114;853-865.
6. **Savano A, Iwai S, Sakurai Y, Shitara K, Nakahata T and Shibuya M.** Fit1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* 2001;97;785-791.
7. **Shushanov S, Bronstein M, Adelaide J, Jussila L, Tchipsysheva T, Jacquemier J, Stavrovskaya A, Birnbaum D, Karamysheva A.** VEGF<sub>c</sub> and VEGFR3 in human thyroid pathologies. *Int J Cancer* 2000;86;47-52.
8. **Vieira JM, Santos SRC, Espadilha Correia I, Vag Tibor, Casalou C, Cavaco BM, Catarino AL, Dias S, Leite V.** Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in thyroid carcinomas of follicular origin: a potential autocrine loop. *Eur J Endocrinol* 2005;153;701-709.
9. **Jackson M, Roberts J, Heckford S, Ricciardelli C, and Tilley W.** A potential autocrine role for vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Research* 2002;62;854-859.
10. **Conejo-Garcia JR, Benencia F, Courreges MC, Kang E, Mohamed-Hadley A, Buckanovich RJ, Holtz DO, Jenkins A, Na H, Zhang L, Wagner DS, Katsaros D, Carroll RG, Coukos G.** Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a beta-defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A. *Nat Med* 2004;10; 950-958.
11. **Coukos G, Benencia F, Buckanovich RJ, Conejo-Garcia JR.** The role of dendritic cell precursors in tumor vasculogenesis. *Brit J Cancer* 2005;92;1182-1187.
12. **Goldenberg JD, Portugal LG, Wenig BL.** Well-differentiated thyroid carcinomas: p53 mutation status and microvessel density. *Head Neck*; 1998;20;152-158.
13. **Jebreel A, England J, Bedford K, Murphy J, Karsai L, Atkin S.** Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors expression and microvascular density in benign and malignant thyroid diseases. *Int J Exp Path* 2007;88;271-277.
14. **Klein M, Vignaud J-M, Hennequin V, Toussaint B, Bresler L, Plenat F, Leclere J, Duprez A, Weryha G.** Increased expression of the vascular endothelial growth factor is pejorative prognosis marker in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86;(2)656-658.
15. **Shibuya M and Claesson-Welsh L.** Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Experimental Cell Research* 2006;312;549-560. (doi:10.1016/j.yexer.2005.11.012).
16. **Rosen L, Kurzrock R., Mulay M. et al.** Safety, pharmacokinetics, and efficacy of AMG 706, an oral multikinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2007;25:2369-2376

17. **Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP.** Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996;2;(10) 1096-1103.
18. **Akslen LA, LiVolsi VA.** Increased angiogenesis in papillary thyroid carcinoma but lack of prognostic importance. *Hum Pathol.* 2000; 31;439-442.
19. **Dela Porta M, Danova M, Rigolin GM, Brugnattelli S, Rovati B.** Dendritic cells and vascular endothelial growth factor in colorectal cancer: correlations with clinicobiological findings. *Oncology* 2005;68;276-284.
20. **Joaquim MV, Santos SC Rosa, Espadina C, Correia I, Vag T, Casalou C, Cavaco BM, Catarino AL, Dias S, Leite V.** Expression of vascular endothelial growth factor ( VEGF) and its receptors in thyroid carcinomas of follicular origin: a potential autocrine loop. *European Journal of Endocrinology* 2005;153;701-709.
21. **Saito H, Tsujitani S, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N.** Relationship between the expression of vascular endothelial growth factor and the density of dendritic cells in gastric adenocarcinoma tissue. *Brit J Cancer* 1998;78;(12):1573-1577.
22. **Giorgadze TA, Baloch ZW, Pasha T, Zhang PJ, LiVolsi VA.** Lymphatic and blood vessel density in the follicular patterned lesions in thyroid. *Modern Pathology* 2005;18;1424-1431.
23. **Michielsen AJ, Hogan AE, Marry J, Tosetto M, Cox F, Hyland JM, Sheahan KD, O'Donoghue DP, Mulcahy HE, Ryan EJ, O'Sullivan JN.** Tumour tissue microenvironment can inhibit dendritic cell maturation in colorectal cancer. *Plos One* 2011;6; (11): e 27944: 1-9.
24. **Kerbel RS.** Tumor angiogenesis. *New England Journal of Medicine* 2008;358;2039-2049(doi:10.1056/NEJMra0706596).
25. **Christopher J. Robinson and Sally E. Stringer.** The splice variants of vascular endothelial growth factor ( VEGF) and their receptors. *Journal of Cell Science* 2011;114;853-865.
26. **Selheim F, Holmsen H and Vassboth F.** Identification of functional VEGF receptors of human platelets. *FEBS Letters* 2002; 515;107-110.
27. **Mimura K, Kono K, Takahashi A, Kawaguchi Y, Fujii H.** Vascular endothelial growth factor inhibits the function of human mature dendritic cells mediated by VEGF receptor-2. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56;761-770.
28. **Conejo-Garcia JR, Buckanovich RJ, Benencia F, Courreges MC, Rubin SC, Carroll RG, Coukos G.** Vascular leukocytes contribute to tumor vascularization. *Blood* 2005;105;679-681.
29. **Von Marschall Z, Carmer T, Hocker M, Burde R, Plath T, Schirner M.** De novo expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer: evidence for an autocrine mitogenic loop. *Gastroenterology* 2000;119;1358-1372.
30. **Patel KN, Shaha AR.** Poorly differentiated and anaplastic thyroid cancer. *Cancer Control.* 2006;13:119-28.
31. **Baudin E, Schlumberg M.** New therapeutic approaches for metastatic thyroid carcinoma. *Lancet Oncol.* 2007;8:148-56.
32. **Fenton C, Patel A, Dinauer C, Robie D, Tuttle M, Francis G.** The expression of vascular endothelial growth factor and the type 1 vascular endothelial growth factor receptor correlate with the size of papillary thyroid carcinoma in children and young adults. *Thyroid* 2000;10;349-357.
33. **Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Ji M, et al.** High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer :genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 2003;63:1454-7.
34. **Dhar DK, Kubota H, Kotoh T.** Tumor vascularity predicts recurrence in differentiated thyroid carcinoma. *Am J Surg* 1998; 176;442-447.

### Address for correspondence:

#### Д-р Кони Иванова

Категра по обща и клинична патология,  
Медицински факултет, Тракийски Университет,  
Стара Загора 6000, ул. „Армейска“ 11,  
e-mail: koni\_ivanova@yahoo.com

#### Dr. Koni Ivanova

Department of general and clinical pathology,  
Medical faculty, Trakia University, Stara Zagora  
Stara Zagora 6000, 11 Armeiska Str.  
e-mail: koni\_ivanova@yahoo.com

## Асоциация между метаболитен синдром, затлъстяване и автоимунни тиреоидни заболявания

Лозанов Б.<sup>1</sup>, Лозанов Л.<sup>1</sup>, Колева В.<sup>2</sup>, Ванкова М.<sup>1</sup>,  
Горчева Д.<sup>1</sup>, Костова Б.<sup>1</sup>, Недева Н.<sup>1</sup>, Вуков М.<sup>1</sup>

Отделение по Ендокринология<sup>1</sup>, Клинична лаборатория<sup>2</sup>, Токуда болница, София

### Адрес за кореспонденция

Проф. Б. С. Лозанов

Токуда болница София, Бул. Н. Вапцаров 51-б, София 1407

E- мейл: bojan\_lozanov@hotmail.com

### Резюме

**Метаболитният синдром** (МетС) и централното затлъстяване (ОБ) могат да бъдат свързани с редица ендокринни нарушения, включително с тиреоидна дисфункция и автоимунни процеси.

**Цел** на проучването е да бъде изследвана асоциацията (честотата) на автоимунните тиреоидни заболявания (АТЗ) при възрастни пациенти с МетС и ОБ, като бъдат потърсени статистически значими разлики в показателите между групите с и без тиреоидни нарушения

**Материал и методи:** изследвани са 231 лица на средна възраст  $43 \pm 13$  г (189 жени и 42 мъже), от тях 90 с ОБ и 141 с МетС, преценен по критериите на IDF (2005). При част от случаите е проведено лечение с метформинови препарати в различни срокове и дозировки. Извършени са следните изследвания: ТСХ, СТ4, ТРО-Ам, ТСХ-РАТ, и инсулин (всички с хемилуминисцентен анализ, СМИА), плазмена глюкоза, триглицериди (ТГ), общ холестерол и HDL (чрез директни ензимни методи). Данните са обработени статистически с версията SPSS (Window 13)

**Резултати:** 130 (56,3%) от изследваните 231 пациенти отговарят на критериите за АТЗ с различна функционална характеристика: 101 (43,7%) с данни за хипотиреоидизъм (тиреоидит на Хашимото, хипотиреоидна фаза), 15 (6,5%) с тиреотоксикоза (Базедова болест), 14 (6,1%) с еутиреоидни форми на тиреоидит на Хашимото. Честотата на хипотиреоидизма (субклиничен, манифестен) е три пъти по-висока при жените (48,7%) спрямо тази при мъжете (16,6%). Съпоставката на данните по отношение броя, средната възраст, теглото и ИТМ (средно  $37 \text{ kg/m}^2$ ) между пациентите с хипотиреоидизъм (група А) и тези без данни за тиреоидна дисфункция (група В) не показва статистически значими разлики, но такива се установяват по отношение стойностите на ТСХ, ТРО -Ам, както и честотата на АХ (съответно 67,3% и 54,5%). Налице са статистически значими корелации между ТСХ, ТГ и Хол в гр. А, но такива не се доказват при еутиреоидните пациенти (гр. В). И при двете групи е налице еднаква по степен инсулинова резистентност (НОМА-IR 3,10-3,15), като честотата на ЗД-2, НГТ и/или НГГ при МетС е сходна (67-70%), надхвърляща неколкостранно тази при пациентите с ОБ от гр. А (10%) и гр. В (12%).

**Обсъждане** Високата честота на автоимунния хипотиреоидизъм в изследваната кохорта пациенти, надхвърляща тази в общата популация, се отнася за клинични случаи с високостепенно централно затлъстяване и МетС. Същата корелира с по-висока честота на АХ и дислипидемия, а в случаите с МетС и с честотата на глюкозен интолеранс и ЗД-2. Възможните фактори за високата коморбидност на МетС, ОБ и АТЗ с хипотиреоидизъм могат да бъдат свързани с инсулинова резистентност и ефект на адипоцитокините върху метаболизма на тиреоидните хормони на периферно и централно ниво. Би могло да се предполага, че лечението с метформинови препарати има пермисивна роля за изява на автоимунни функционални нарушения, свързани с модулиращия ефект на метформина върху NIS-промотера и натрупавено на йод в жлезата, доказано при някои последни

проучвания.

**Заключение:** При пациенти с МетС и централно ОБ е необходимо насочено изследване на тиреоидната функция за субклинични нарушения, специално при тези, провеждащи лечение с метформин. Корижирането на същите намалява сърдечно-съдовия риск и благоприятства постигането на по-добър краен ефект от лечението.

**Ключови думи:** метаболитен синдром, централно затлъстяване, хипотиреоидизъм, метформин

## Въведение

Честотата на Метаболитния синдром (МетС) и централното затлъстяване (ОБ) през последното десетилетие нараства прогресивно, достигайки епидемични размери: 30-50% от възрастното население в Европа, САЩ, както и в България (1, 9, 13, 15, 17). Същата нараства прогресивно с възрастта, особено след 5-6-то десетилетие от живота. Подобни са данните за хипотиреоидизма – едно от най-честите тиреоидни заболявания. Според данните от Framingham study болестността от хипотиреоидизъм при жените до 65 годишна възраст е 13,6%, срещу 5% при мъжете, а след тази възраст – 15-18%, съответно 8-10%. При Whickham study (21) тези проценти са по-ниски: при жените 2% манифестен и 7,5% субклиничен хипотиреоидизъм (общо 9,5%), при мъжете – съответно 0,7% и 2,8% (общо 3,5%). Същото се отнася и за България, редица автори установяват честа асоциация на МС и ОБ с тиреоидни нарушения, на първо място с хипотиреоидизъм (7, 10, 16, 2, 24). Патогенетичните механизми, определящи връзката между тях, са предмет на интензивни проучвания, които засега не дават основания за категорични изводи.

Данните за честотата на тиреоидната дисфункция при лица с МетС и ОБ в различни популации и региони варират в твърде широки граници. Същите зависят от пола, възрастта, определени генетични характеристики, влияние на фамилни и външни фактори – хранене, йоден прием, хроничен стрес и други, които обуславят инсулинова резистентност и метаболитни нарушения.

**Цел** на настоящето проучване е установяване честотата на автоимунните тиреоидни нарушения при пациенти с метаболитен синдром и затлъстяване, като се потърсят зависимости с пола, възрастта, метаболитните и регулаторни нарушения, свързани с инсулинова резистентност.

## Материал

В ретроспективно обсервационно проучване са включени 231 пациенти от българска популация, 189 жени и 42 мъже на средна възраст  $43 \pm 13$

(16-75) год, от които 141 пациенти с (МетС) и 90 – с високостепенно метаболитно затлъстяване, които са били клинично изследвани през периода 2012-2012 г. Диагнозата на (МетС) е поставена въз основа на критериите, посочени в Консенсуса на Международната диабетна федерация (IDF) от 2005 г: централно затлъстяване (ИТМ над  $30 \text{ kg/m}^2$ ) и наличие най-малко на 2 от следните 4 показателя: триглицериди ( $\text{TG} \geq 1,7 \text{ mmol/l}$ ), HDL-cholesterol ( $<1,03 \text{ mmol/l}$  за мъже,  $<1,29 \text{ mmol/l}$  за жени), артериална хипертония ( $\text{АН} \geq 130/85 \text{ mmHg}$ ), повишена кръвна захар на гладно ( $>5,6 \text{ mmol/l}$ ). Включените в проучването случаи с централен тип затлъстяване (ОБ) са с ИТМ над  $30 \text{ kg/m}^2$ , без да са налице всички критерии за МетС. Част от пациентите имаха анамнестични и клинично-лабораторни данни за предшестващ захарен диабет тип 2 (ЗД-2) и/или тиреоидни заболявания.

В проучването са включени само пациенти с автоимунна тиреоидна патология, потвърдени със съответни лабораторни и ехографски методи както преди, така и по време на болничния престой. Не са включени случаи с постоперативен или радиационен хипотиреоидизъм. Част от пациентите с хипотиреоидизъм (58) са приемали левотироксин в различен срок преди и към момента на хоспитализацията, а също метформинови препарати във връзка със затлъстяването или наличен ЗД-2.

Проведеното клиничното изследване включва оценка на общото състояние, телесно тегло и индекс на телесна маса (ИТМ), обиколка на талията, систолно и диастолно артериално налягане, сърдечен и тиреоиден статус чрез оглед и палпация.

## Методи

На всички пациенти е осъществена ехографска оценка на щитовидната жлеза с определяне на размерите, структурата и кръвоснабдяване на жлезата, извършена с помощта на апарат General Electric, Logiq 5 Expert.

Всички лабораторни тестове са извършени на инегрирана автоматична система Architect

8200ciAbbott USA. Използвани са оригинални реактиви, както и контроли и калибратори, верифицирани за работа на посочената аналитична система. Използвани са следните аналитични методи:

- TSH, FT<sub>4</sub>, TPO-Ab и Инсулин – с индиректни имунохимични методи на хемилуминисцентен микрочастичков (СМІА) принцип с използване на миши моноклонални антитела (референтни стойности за TSH – 0,35-4, 20 mU/L, FT<sub>4</sub>-9 -19,05 pmol/L, TPO-Ab – 0-5,61 U/ml, Insulin: 3-17,1 mU/ml за базално ниво, 3-45 mU/ml на 60<sup>ма</sup> мин, 8,7-30 mU/ml на 120 мин. при ОГТТ)

- TSH-R-Ab: с електрохемилуминисцентна детекция (ECLIA), автоматичен анализатор Elecsys 2010 Roche (реф. ст. до 1,75 U/L)

- Глюкоза: хексокиназен метод (референтен метод, препоръчен от Международната Федерация по Клинична Химия) с референтни стойности 3,5 - 6,1 ммол/л

- Общ холестерол – ензимен метод със завършек по Trinder (реф. ст. 3,5 - 6,2 ммдл/л)

- Триглицериди: ензимен колориметричен метод, мод. по Fossati (реф. 0,6 - 2,0 ммол/л)

- HDL-cholesterol: директен ензимен метод с гетерогентна акцелерация (референтна стойност 1,04-2,0 ммол/л),

- LDL-cholesterol: директен ензимен метод (реф. ст. 1,81- 4,1 ммол/л)

- Пикочна киселина: двустъпален ензимен метод с уриказа (реф. ст. за жени до 340 ммол/л, за мъже до 420 ммол/л)

- НОМА-IR: Глюкоза на гладно x Инсулин / 22,5

Използвани статистически методи: Получените резултати са обработени с методите на вариационния и честотния анализ за количествени и качествени променливи, непараметрични и параметрични методи (Fisher's exact test; Mann-Whitney test), както и корелационен анализ (T-criteria Student).

### Резултати

Получените резултати показват, че 130 (56,3%) от изследваните 231 пациенти с MetC и Об отговарят на клинично-лабораторните и ехографски критерии за автоимунни тиреоидни заболявания (АТЗ), протичащи с различна функционална характеристика и степен на изява. В зависимост от това разпределението на случаите е както следва:

**Таблица 1.**

Разпределение на случаите според тиреоидния статус

• С автоимунен хипертиреоидизъм	15 пациенти (6,5%)
• С тиреоидит на Хашимото (еутиреоиден стадий)	14 пациенти (6,1%)
• С автоимунен хипотиреоидизъм	101 пациенти (43,7%)
• Без данни за АТЗ	101 пациенти (43,7%)

Относителният дял на случаите с хипертиреоидизъм и тези с еутиреоидна форма (фаза) на тиреоидита на Хашимото е относително нисък – 29 случая или 12,6% от всички изследвани пациенти (общо 22,3% от тези с доказани автоимунни тиреоидни нарушения).

С най-висок относителен дял (43,7%) са пациентите с автоимунен хипотиреоидизъм (тиреоидит на Хашимото-хипотиреоидна форма), потвърден с позитивни ТРО-антитела и специфични ехографски характеристики на жлезата. Половото разпределение на хипотиреоидните случаи показва съотношение 3:1 в полза на женския пол – 48,7% (94/189), срещу 16,6% (7/42) за мъжете.

Разпределението на случаите според наличие на артериална хипертония, захарен диабет тип 2 или нарушения в глюкозния толеранс са представени на табл. 2.

Сравнението по отношение хипотиреоидизма между пациентите с MetC (61 случая) и тези с Об (40 случая) показва, че честотата на същия спрямо общия контингент е сходна, съответно 43,2% и 44,4%. Това ни даде основание да ги обединим в една група (гр. А), включваща общо 101 пациенти, с цел сравнителна оценка на техните клинично-лабораторните показатели с показателите при 101 пациентите с MetC (51) и Об (50) без данни за тиреоидно заболяване (гр. В). Двете групи са сравними по отношение броя на случаите, възрастовото разпределение, средното тегло и индекса на телесна маса, съответстващ на високостепенно затлъстяване (съответно 36, 86% и 37,35%).

Честотата на артериалната хипертония при пациентите с хипотиреоидизъм (гр. А) е твърде висок – 67,3%, срещу 54,5% при тези с MetC и Об без хипотиреоидизъм (гр. В). По отношение ЗД-2 честотното разпределение между двете групи е 20,8% (гр. А) и 17,8% (гр. В), като случаите с нарушен глюкозен толеранс (НГТ) и/или нарушена гликемия на гладно (НГГ) са съответно 26,7% и 23,7%. Без вълехидратни нарушения са 52% от случаите в гр. А и 59% от тези в гр. В, съответно 31,2% от болните с MetC срещу 85,5% от случаите с Об. При всички пациенти с MetC и Об с и без хипотиреоидизъм (гр. А и гр. В) НОМА-IR е значително повишен, като средните стойности на същия за двете групи са съответно 3,10±2,4 и 3,15±2,1.

По отношение честотата на ТРО-антителата и серумните ТСХ разликите между групите са статистически високозначими (p<0,0001). Всички случаи от гр. В са антитяло-негативни и показват четирикратно по-ниска средна стойност на ТСХ в сравнение с гр. А (Табл. 4). Подобни разлики в

**Таблица 2.**

Разпределение на АХ, ЗД-2 и Предиабет – нарушен глюкозен толеранс (НГТ), нарушена гликемия на гладно (НГГ) или и двете (НГТ+НГГ)

ГРУПИ	общо	АХ	ЗД-2	НГТ, НГГ, НГТ+НГГ	Без възглехидратни нарушения
МетС+хипо	61	53/61 86%	19/61 31%	15+4+3=22/61 36%	20/61 32%
Затл(ОБ)+хипо	40	14/40 35%	2/40 5%	3+1+1=5/40 12%	33/40 82%
МетС	51	41/51 80,4%	17 33,3%	7+9+3=19/51 37%	15/51 29%
Затл (ОБ)	50	14/50 28%	1/50 2%	2+2+1=5/50 10%	44/50 88%
МетС+хипер	15	13/15 86,6%	3/15 20%	2+1+2=5/15 33%	7/15 46%
МетС+еутир Хашимото	14	11/14 78%	3/14 21,4%	4+1+3=8/14 57%	3/14 21,4%

**Таблица 3.**

Средна възраст, телесно тегло и ИТМ при пациенти с МетС, затлъстяване (ОБ) и хипотиреозизъм (гр. А) и пациенти с МетС и/или ОБ без тиреоидни нарушения, еутиреоидни (гр. В)

Групи	Група А/ n -101			Група В/ n -101		
	MEAN	SD	MEDIAN	MEAN	SD	MEDIAN
<b>Възраст (гог.)</b>	39,4	12,3	42,0	41,2	13,0	39,0
<b>Тегло (кг)</b>	104,9	24,0	98,0	104,1	22,3	99,5
<b>ИТМ (kg/m<sup>2</sup>)</b>	36,8	6,5	35,4	37,3	6,6	35,0

средните стойности и медианите на ТСХ се установяват и при пациентите от група А в зависимост от ефекта на заместителна терапия с левотироксин (Табл. 5). При адекватно лекуваните пациенти от гр. А (52 случая) ТСХ е 4-кратно по-нисък в сравнение със средната му стойност при 48 пациенти без адекватна заместителна терапия (2,49±0,8 mIU/l, срещу 9,42±8,22 mIU/l, p< 0,01). Това съответства на разликите между техните медиани (2,57 и 6,33), средните стойности на СТ<sub>4</sub> (15,64±1,2 pmol/l и 12,64±2,5 pmol/l), както и тези на холестерола и ТГ. (Фиг. 4). Налице са статистически значими положителни корелации между ТСХ, холестерола и триглицеридите в гр. А (Фиг. 1, Фиг. 2). Такива не се доказват при пациентите от гр. В.

### Обсъждане

Данните от проведеното обсервационно клинично проучване показват висока ко-морбидност между централното затлъстяване и автоимунните тиреоидни заболявания, доказани с високочувствителни хормонални, имунологични и ехографски методи на изследване. Докато честотата на автоимунния хипертиреоидизъм и тази на еутиреоидните случаи с тиреоидит на Хашимото е в рамките на очакваното (съответно 6,5% и 6,1%), честотата на автоимунния хипотиреоидизъм е 43,7%, като преобладаващи са субклиничните форми. Същата е трикратно по-висока при жените в сравнение с тази при мъжете (съответно 48,7% и 16,6%), което е в съответствие с

данните и на други автори (7, 11, 12, 19).

Установената честота на хипотиреоидизма се различава съществено от съобщаваните в литературата данни при популяционни проучвания, включително и за нашата страна (1,2). Възможно обяснение за това е, че в нашия материал сме включили само лица с високостепенно затлъстяване при ИТМ над 30 (средно 37 kg/m<sup>2</sup>), като по-голяма част от пациентите преди и по време на изследването са приемали метформинови препарати във връзка с диабет тип 2 и данни за инсулинова резистентност. Някои по-нови проучвания *in vitro* и *in vivo* са установили, че метформинът директно повлиява йодния метаболизъм на щитовидната жлеза, осъществявайки модулиращ ефект върху NIS-промотера с последващо намаление на йодният пул на тиреоцитите и повлияване на тиреоидния функционален статус (5).

Доказано е, че честотата на МетС и ОБ е свързана с нарастваща честота на артериалната хипертония (АХ), захарния диабет - тип 2 и нарушения глюкозен толеранс. Нашите резултати в това отношение са в съгласие с данните, съобщавани в литературата. Те показват 54,5% честота на АХ при групата пациенти с МетС и ОБ без тиреоидна дисфункция и значимо по-висок такъв при групата със съпътстващ хипотиреоидизъм (67,3%). Такива разлики установяваме и по отношение холестеролемията и триглицеридемията, които корелират положително със серумните нива на ТСХ. (Фиг. 1 и Фиг. 2). При пациентите провеждащи заместително лечение с L-тироксин

Таблица 4.

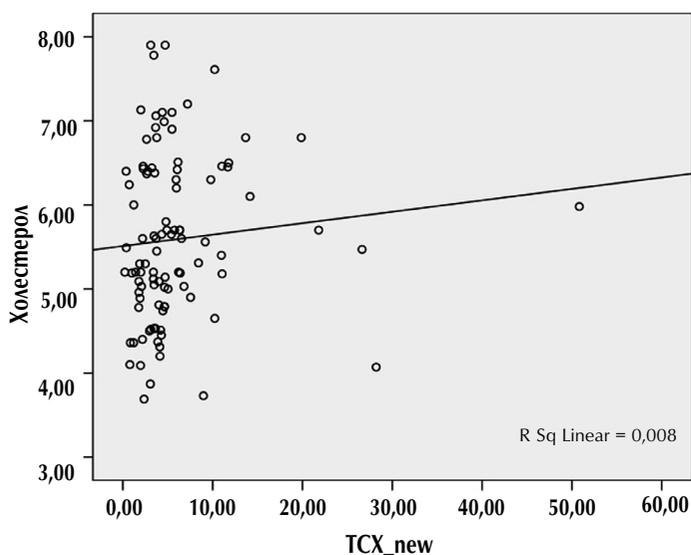
Средни стойности, станд. отклонения и медиана на показателите в двете групи пациенти с метаболитен синдром и затлъстяване: гр А/ в съчетание с хипотиреозидизъм; гр. В/ без данни за тиреоидна дисфункция (mean TSH-A/B, p< 0,001)

Групи Groups		TSH	Cholest.	HDL	3-glyc	Uric ac
Gr A	Mean	5,82	5,58	1,20	1,79	349,47
	N	100	100	86	100	84
	Std. Deviation	6,70	0,99	0,25	1,09	95,13
	Median	4,07	5,46	1,19	1,55	330,00
Gr B	Mean	1,70	5,36	1,24	1,60	350,88
	N	101	101	88	101	93
	Std. Deviation	0,81	1,07	0,30	1,02	94,92
	Median	1,52	5,30	1,19	1,34	335,00

медианата отразяваща стойностите на холестерола е сигнификантно по-ниска в сравнение с тази при некомпенсирани, нелекувани пациенти с хипотиреозидизъм. (Фиг. 4)

Влиянието на тиреоидната хормонална секреция върху телесното тегло е отгавна известно. Доказано е, че хипотиреозидизмът обуславя инсулинова резистентност и потенцира секрецията на адипоцитокени, които участват в хроничното възпаление (5, 9, 16, 21). Нашите резултати показват повишени стойности на HOMA-IR при пациентите с хипотиреозидизъм, които са сравними с тези при MetC и ОБ с

Фигура 1. Корелация между TCX и холестерола при пациенти с MetC, ОБ и хипотиреозидизъм (гр. А)



Фигура 2. Корелация между TCX и триглицеридите при пациенти с MetC, ОБ и хипотиреозидизъм (гр. А)

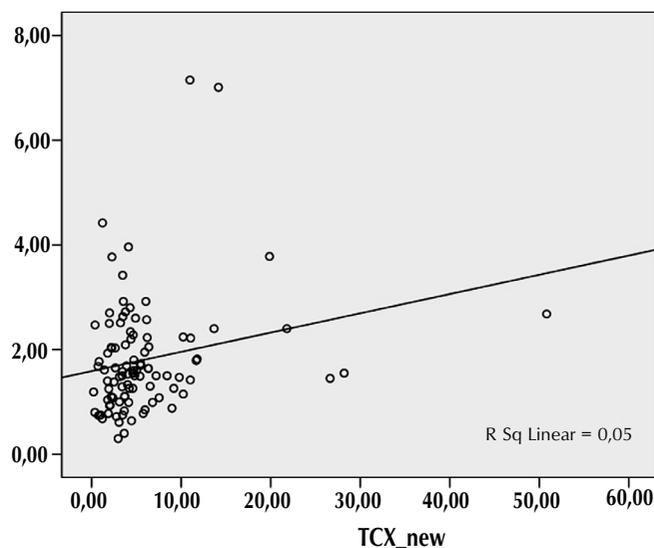
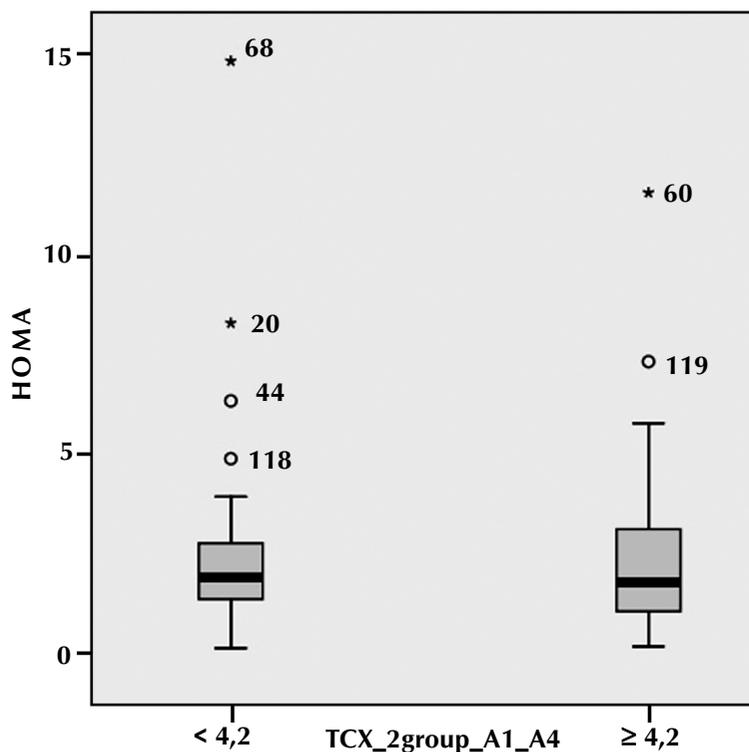


Таблица 5.

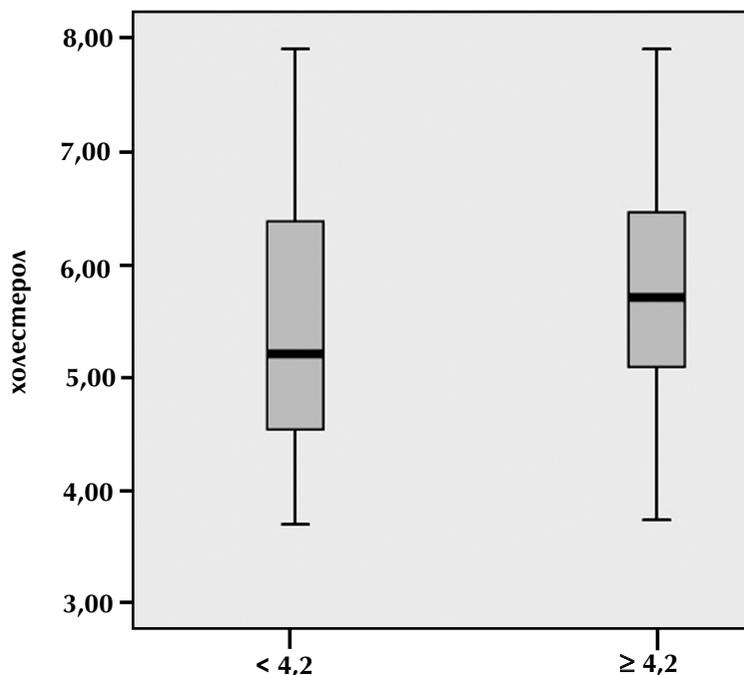
Средни стойности на TCX при пациенти с метаболитен синдром, централно затлъстяване и хипотиреозидизъм (гр. А) в зависимост от провеждано лечение с L-Тирогин: 1/ на терапия, компенсирани, 2/ преди терапия

Подгрупи според TCX	N	Mean	Median	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Range
1 < 4,2/ на терапия с LT4	52	2,49	2,57	1,13	0,38	4,13	3,91
2 ≥ 4,2/преди терапия с LT4	48	9,42	6,33	8,22	4,20	50,82	46,62
Общо	100	5,81	4,06	6,70	0,38	50,82	50,60

**Фигура 3.** Роля на BOX-PLOT: HOMA-IR-медиани на пациенти с МетС, ОБ и хипотиреозизъм в зависимост от терапия с L-Thyroxin:  
 1) под терапия (TCX < 4,2 IU/L),  
 2) без терапия (TCX ≥ 4,2 IU/L)



**Фигура 4.** Роля на BOX-PLOT: медиана на холестерола при пациенти от гр. А в зависимост от провеждано заместително лечение с L-Thyroxin:  
 1) на терапия с L-Thyroxin, компенсирани (TCX < 4,2 mmol/L),  
 2) без терапия, некомпенсирани (TCX ≥ 4,2 mmol/L)



нормална тиреоидна функция. Това кореспондира с относително висока честота на възглехидратните нарушения, включително с тази на манифестния захарен диабет тип 2, установен при 20,8% от пациентите с хипотиреозизъм (гр. А) и при 17,8% от еутиреоидните лица (гр. В).

В последно време редица проучвания доказват обратна връзка, изразяваща се в ефекти на мастната тъкан върху тиреоидната хормонална секреция чрез адипоцитокините (3, 4, 5, 7, 15, 17, 22). Доказва се че лептинът потиска активността на Дейодиназа-2 в хипоталамуса и хипофизата, блокирайки конверсията на тироксина в активен хормон ( $T_3$ ), с последващо повишаване секрецията на ТСХ (6, 9). Известно е също, че при високостепенно затлъстяване конверсията на тироксина в периферните тъкани се измества от Дейодиназа-1 към биологично неактивния „reverse  $T_3$ “, което може да обуслави хипотиреозизъм на клетъчно-тъканно ниво. В тази насока са необходими бъдещи проучвания и доказателства.

**В заключение,** данните от настоящето проучвания показват високо-честотна асоциация на метаболитния синдром и на абдоминалното затлъстяване със субклиничен и манифестен хипотиреозизъм, свързана с по-висока честота на артериалната хипертония и мастния метаболизъм – основни рискови фактори за кардио-васкуларни усложнения. Това изисква насочено изследване на тиреоидната функция при всички пациенти с наднормено тегло, затлъстяване и метаболитен синдром с цел доказване и коригиране на нарушенията на тиреоидната функция, включително при субклинични форми на хипотиреозизъм. Необходими са системни проучвания на популационно ниво по отношение епидемиологията на нарушенията на тиреоидната функция при лица с МетС и обменно затлъстяване, както и за изясняване на патогенетичните връзки и ролята на етиологичните фактори, участващи в тези процеси.

## Association Between the Metabolic Syndrome, Obesity and Autoimmune Thyroid Diseases

Lozanov B.<sup>1</sup>, L. Lozanov<sup>1</sup>, V. Koleva<sup>2</sup>, M. Vankova<sup>1</sup>, D. Gorcheva<sup>1</sup>,  
B. Kostova<sup>1</sup>, N. Nedeva<sup>1</sup>, M. Vukov<sup>1</sup>

Department of Endocrinology<sup>1</sup>, Unit Clinical Laboratory<sup>2</sup>, Tokuda Hospital Sofia, Sofia

### Address for correspondence:

Prof. B. S. Lozanov

Tokuda Hospital Sofia, 51-b N. Vaptsarov Boul, 1497 Sofia

E-mail: bojan\_lozanov@hotmail.com

### Abstract

**Introduction:** The metabolic syndrome (MS) and central obesity (Ob) could be linked to many endocrine abnormalities including thyroid dysfunction and thyroid diseases of autoimmune origin.

The aim of the study was to investigate the association (prevalence) of autoimmune thyroid diseases (ATD) in adult patients with MS and Ob and to search for statistically significant differences between the groups with and without thyroid dysfunction according to a number of parameters.

**Material and methods:** A total of 231 patients were included in the study (189 women and 42 men, at mean age 43±13 years), 90 with Ob and 141 with MS (IDF criteria, 2005). Some of the patients were treated with metformin in different daily dosage and over various periods of time. Laboratory assessment included measurement of serum TSH, FT<sub>4</sub>, TPO antibodies, TSH-R-Abs, and insulin (all measured using chemiluminescent assay techniques, CMIA), as plasma glucose level, triglycerides (TG), total cholesterol and HDL-cholesterol (using direct enzymatic methods).

**Results:** Out of 231 examined patients, thyroid autoimmune disorders with different degree of thyroid dysfunction were found in 130 pts (56,3%), including 101 pts (43,7%) with hypothyroidism (hypothyroid phase of Hashimoto's thyroiditis), 15 pts (6,5%) with Graves' disease, 14 (6,1%) with Hashimoto's thyroiditis in euthyroid phase. The prevalence of autoimmune hypothyroidism (subclinical and overt) was three times higher in women (48,7%) than in men (16,6%). Comparison between the two study groups – group A – patients with hypothyroidism and group B – patients with no thyroid dysfunction, did not show any statistically significant differences in the number of included patients, mean age, weight, and BMI (mean BMI 37 kg/m<sup>2</sup>). Statistically significant differences found were in TSH, TPO antibodies, and the prevalence of arterial hypertension (67,3% in group A and 54,5% in group B). TSH correlated with TG and total cholesterol levels in group A, and showed no such correlation in the euthyroid group (group B). The patients in the two study groups had similar degree of insulin resistance (HOMA-IR 3,10 – 3,15). The patients with MS exhibited a higher prevalence of diabetes mellitus type 2, impaired glucose tolerance (IGT) and impaired fasting glucose (IFG) (a total of 67-70%), and the risk was similar in patients with and without hypothyroidism. Patients with Ob had a much lower incidence of glucose intolerance – 10% in group A and 12% in group B.

**Discussion:** The high prevalence of autoimmune hypothyroidism (Hashimoto's thyroiditis) in our cohort, exceeding the known population prevalence, is related to the inclusion of clinical cases of higher degree of central obesity and metabolic syndrome. Patients with autoimmune hypothyroidism exhibited higher rates of arterial hypertension and dyslipidemia, and in the presence of MS - higher rate of glucose intolerance and diabetes mellitus type 2. The high comorbidity of MS, Ob and ATD may be linked to insulin resistance and the effect of adipocytokines on thyroid hormone metabolism at peripheral and central levels. It could be hypothesized that metformin plays a permissive role in the development of autoimmune and functional thyroid disorders, which was recently reported to be linked to the modulating effect of metformin on the NIS promoter and the in a consequent change in the thyroid iodine pool.

---

**Conclusion:** Patients with central obesity and metabolic syndrome, especially those receiving metformin, should be routinely screened for subclinical thyroid dysfunction and treated accordingly. This would favor a reduction in the overall risk of cardiovascular disease and improve treatment outcomes.

---

**Key words:** metabolic syndrome, central obesity, hypothyroidism, metformin

---

## Introduction

The prevalence of metabolic syndrome (MS) and central obesity (Ob) has progressively increased over the last decade, reaching epidemic proportions, with 30-50% of the adult population in Europe, the U. S., as well as in Bulgaria being affected (1, 9, 13, 15, 17). The prevalence of MS and Ob also increases with age, with peak morbidity over the age 60-70. Data reported on the prevalence of hypothyroidism – one of the most common thyroid disorders, is similar. According to the Framingham study, hypothyroidism morbidity in individuals under 65 years of age was 13,6% in women vs 5% in men, and over 65 years – 15-18% and 8-10%, respectively.

In the Whickham study (21), the reported percentages were overall lower: overt and subclinical hypothyroidism were found in 2% and 7,5% of women (a total of 9,5%), and in 0,7% and 2,8% of men (3,5% totally). Trends are similar for Bulgaria.

Data published by other authors demonstrate a frequent coexistence of MS, Ob and thyroid disorders, most commonly with hypothyroidism (7, 10, 16, 2, 24). The precise underlying mechanisms of the pathogenetic interaction between these conditions, have been a topic of intensive research. However, no definitive conclusions can be drawn at present.

Data on the prevalence of thyroid dysfunction in the patients with MS and Ob widely varies according to the studied population and region of the world. Moreover, other factors such as sex, age, certain genetic predisposition, family and environmental factors, including food consumption, iodine intake, exposure to chronic stress, as well as other known risk factors associated with insulin resistance and metabolic disorders, also have an impact on the prevalence estimates.

**The AIM** of the present study was to establish the prevalence of autoimmune thyroid diseases in patients with MS and Ob, and to investigate whether there is any common link between these two diseases and sex or gender differences, as well as metabolic or regulatory abnormalities related to insulin resistance.

## Material

During the period 2012-2013, a total of 231 patients of the Bulgarian population were included retrospectively in the observational study. Of them 189 were women and 42 men, at mean age  $43 \pm 13$  (16 – 75 years). Out of them, 141 patients had metabolic syndrome and 90 had high degree central obesity. The diagnosis of metabolic syndrome (MS) was established according to the International Diabetes Federation (IDF) criteria from 2005: central obesity and at least two out of four additional criteria: triglycerides (TG)  $\geq 1,7$  mmol/l, HDL-cholesterol  $< 1,03$  mmol/l in men and  $< 1,29$  mmol/l in women, arterial hypertension (BP  $\geq 130/85$  mmHg) or increased fasting plasma glucose level  $\geq 5,6$  mmol/l. All cases diagnosed with central obesity had body mass index (BMI)  $> 30$  kg/m<sup>2</sup> and did not meet the criteria for the diagnosis of MS. Some of the patients enrolled in the study had a history and clinical and laboratory data of diabetes mellitus type 2 (DMT2) and/or thyroid disease before hospitalization. All patients included in the study were diagnosed with ATD either prior to or during hospitalization; the diagnosis was based on laboratory tests and ultrasound examination in all patients during their hospital stay. None of the hypothyroid patients had previously undergone surgical or radioiodine (<sup>131</sup>I) therapy for established thyroid disease. Among patients with hypothyroidism, some were receiving Levothyroxine replacement therapy prior to hospitalization (58 pts) for various periods of time. Some of the patients were receiving metformin for the treatment of metabolic syndrome or/and diabetes type 2. Clinical assessment was based on physical examination including general condition, body weight, BMI, waist circumference, systolic and diastolic blood pressure, heart and neck examination including observation and palpation of the thyroid gland.

## Methods

Ultrasound examination of the thyroid gland was performed on all patients using digital US unit *General Electric, Logiq 5 Expert* and included measurement of the size of the thyroid gland, echogenicity and blood flow on Doppler evaluation.

All laboratory tests were performed on Architect 8200ci integrated system from Abbott Diagnostics, USA. Standard reagents, controls and calibrators, verified to be applicable to that specific analytical system, were used in the tests. Laboratory assessment included measurement of serum thyroid stimulating hormone (TSH), free thyroxin (FT<sub>4</sub>) level, thyroid peroxidase antibodies (TPO-Ab) and insulin, using an indirect chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) based on mouse monoclonal antibodies (reference range: TSH – 0,35-4,20 mU/L; FT<sub>4</sub> – 9-19,05 pmol/l, TPO-Ab – 0 -5,61 U/ml, Insulin: 0 min – 3-17,1 mU/ml; 60 min – 3-45 mU/ml; 120 min – 8,7-30 mU/ml during oral glucose tolerance test (OGTT); TSH receptor antibodies (reference range: TSH-R-Ab – < 1,75 U/L), using an electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) performed on the Roche Elecsys 2010 automated analyzer; fasting blood glucose level was determined using the hexokinase method (reference range: 3,5-6,1 mmol/l, recommended by the International Federation of Clinical Chemistry); total cholesterol level (3,5-6,2 mmol/l), using an enzymatic method (Trinder end-point reaction); triglycerides (0,6–2,0 mmol/l), determined colorimetrically with the enzymatic Fossati method; HDL-cholesterol (1,04–2,0 mmol/l), using a direct enzymatic assay with accelerator selective detergent methodology; LDL-cholesterol (1,81 – 4,1 mmol/l) measured using a direct enzymatic assay; uric acid (upper reference range 340 mmol/l in women, 420 mmol/l in men), determined by a two-stage enzymatic method by use of uricase; homeostatic model assessment-estimated insulin resistance (HOMA-IR) index (fasting plasma glucose level (mmol/l) x fasting insulin level / 22,5).

Statistical analyses. Results were processed using variation and frequency analysis methods on quantitative and qualitative variables, nonparametric and parametric tests (Fisher's exact test, Mann-Whitney test), as well as correlation analysis (Student T-Test). The analyses were performed using SPSS for Windows 13.

## Results

Out of 231 examined patients with MS and obesity, 130 pts (56,3%) fulfilled the clinical, laboratory and ultrasound criteria for the diagnosis of autoimmune thyroid disease (ATD) with different functional characteristics and degree of manifestation. The distribution of the cases between the groups was as follows: 101 pts (43,7%) without ATD, 101 pts (43,7%) with spontaneous (autoimmune) subclinical and overt hypothyroidism, 15 pts (6,5%) with autoimmune hyperthyroidism, and 14 (6,1%) with Hashimoto's thyroiditis (euthyroid phase) (Table 1).

**Table 1.**

Distribution of the cases according to thyroid status

• Autoimmune hyperthyroidism	15 pts (6,5%)
• Hashimoto's thyroiditis in euthyroid phase	14 pts (6,1%)
• Autoimmune hypothyroidism	101 pts (43,7%)
• No autoimmune thyroid disease	101 pts (43,7%)

The relative proportions of the cases with hyperthyroidism and Hashimoto's thyroiditis in euthyroid phase were much lower in the studied population – 29 out of 231 cases, (12,6% of the enrolled subjects or a total of 22,3% of all patients diagnosed with ATD). Autoimmune hypothyroidism (Hashimoto's thyroiditis in hypothyroid phase) was the most common type of ATD, (43,7% of the patients, based on TPO-Ab positivity and specific ultrasound characteristics). Gender-specific distribution of hypothyroidism revealed a 3:1 ratio in favor of women – 48,7% (94/189) vs. 16,6% (7/42) in men.

The distribution of arterial hypertension, diabetes mellitus type 2 and prediabetes the among study participants is presented in Table 2.

The prevalence of autoimmune hypothyroidism in MS patients (61 cases) and Ob patients (40 cases) was similar, 43,2 and 44,4%, respectively. Therefore the patients of the two groups were pooled as a single hypothyroid group (group A) comprising a total of 101 cases and compared with the 101 euthyroid patients with MS (51pts) or Ob (50 pts) without ATD (group B). No statistically significant differences were found between these two groups in the number of patients included, the age, mean body weight and BMI (Table 3). Mean BMI values corresponded to obesity of greater degree (36,86% and 37,35%, respectively).

the prevalence of arterial hypertension in the patients with hypothyroidism (group A) was higher than in the MS/Ob patients without hypothyroidism (group B) – 67,3% vs. 54,5%, respectively. Additionally, DMT2 was also more common among the patients in group A, compared to group B – 20,8% vs. 17,8%, respectively. Prediabetes affected 26,7% of the patients in group A and 23,7% in group B, and, 52% of the patients in group A and 59% of the patients in group B had normal glucose tolerance, i.e. 31,2% of MS patients and 85,5% of Ob patients from both groups. HOMA-IR was intriguingly high in all MS/Ob patients with and without hypothyroidism, with mean values of 3,10±2,4 and 3,15±2,1 in groups A and B, respectively. Median values of HOMA-IR are presented in Fig. 3.

The two study groups significantly differed by TPO-Ab positivity and TSH ( $p < 0,0001$ ).

**Table 2.**

Prevalence of arterial hypertension (AH), diabetes mellitus type 2 (DMT2) and prediabetes – impaired glucose tolerance (IGT), impaired fasting glucose (IFG) or the combination of both conditions (IGT/IFG) (in absolute numbers and %).

Groups	Total	AH	DMT2	IGT, IFG, IGT/IFG	No glucose intolerance
<b>MS+ Hypothyroidism</b>	61	53/61 86%	19/61 31%	15+4+3= <b>22/61</b> <b>36%</b>	20/61 32%
<b>Ob+ Hypothyroidism</b>	40	14/40 35%	2/40 5%	3+1+1= <b>5/40</b> <b>12%</b>	33/40 82%
<b>MetS</b>	51	41/51 80,4%	17 33,3%	7+9+3= <b>19/51</b> <b>37%</b>	15/51 29%
<b>Ob</b>	50	14/50 28%	1/50 2%	2+2+1= <b>5/50</b> <b>10%</b>	44/50 88%
<b>MetS+ Hyperthyroidism</b>	15	13/15 86,6%	3/15 20%	2+1+2= <b>5/15</b> <b>33%</b>	7/15 46%
<b>MetS+ euthyroid Hashimoto's thyroiditis</b>	14	11/14 78%	3/14 21,4%	4+1+3= <b>8/14</b> <b>57%</b>	3/14 21,4%

**Table 3.**

Mean age, weight (kg) and BMI (kg/m<sup>2</sup>) of MS/Ob patients with hypothyroidism (Gr A) and euthyroid patients without thyroid disease (Gr B)

Groups	Groups A/ n 101			Groups B/ n 101		
	MEAN	SD	MEDIAN	MEAN	SD	MEDIAN
<b>Age (yr)</b>	39,47	12,39	42,00	41,20	13,01	39,00
<b>Weight (kg)</b>	104,99	24,06	98,00	104,14	22,32	99,50
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	36,86	6,53	35,45	37,35	6,60	35,00

All patients in group B were TPO-Ab-negative and mean TSH values were 4-fold lower, compared to patients in group A (Table 4). Similar differences in median values of TSH were found among the two subgroups of patients in group A with regard to treatment with Levothyroxine (Table 5). Adequately treated patients (52 cases) had a 4-fold lower mean TSH value, compared to those who still had insufficiently corrected hypothyroidism – 2,49±0,8 mIU/l vs. 9,42±8,22 mIU/l, p<0,01. This is in accordance with observed differences between median TSH levels (2,57 and 6,33 mIU/l, respectively), mean FT<sub>4</sub> levels (15,64±1,2 pmol/l and 12,64±2,5 pmol/l, respectively), as well as mean total cholesterol and triglyceride levels (Fig. 4). A statistically significant positive correlation between TSH, total cholesterol levels and triglycerides was observed in group A (Fig. 1, Fig. 2). No such correlation was found in group B.

## Discussion

This observational clinical study demonstrates a high rate of coexistent metabolic syndrome (MS), central obesity (Ob) and autoimmune thyroid diseases (ATD), with highly sensitive hormonal tests, immunological assays and ultrasound examination used to establish the diagnosis. While the prevalence of autoimmune hyperthyroidism and euthyroid Hashimoto's thyroiditis corresponded to their known prevalence in the general population (6,5% and 6,1%,

respectively), autoimmune hypothyroidism was found to be as common as 43,7% of all cases, with subclinical forms being much more common. Consistent with other research data, females were three times more affected than men (48,7% vs. 16,6%, respectively) (7, 11, 12, 19).

Our findings differ substantially from data reported on the prevalence of hypothyroidism in population-based studies, including data from our country (1,2). A possible explanation of this disparity could be the inclusion in our study only of patients with a higher degree of obesity with BMI > 30 kg/m<sup>2</sup> (average BMI – 37 kg/m<sup>2</sup>), with most of the patients receiving metformin for DMT2, obesity, or insulin resistance prior to and during their hospital stay. More recently, several in vitro and in vivo studies reported that metformin directly influenced iodine metabolism within the thyroid gland, possibly through a modulating effect on the NIS promoter resulting in a consequent reduction in the iodine pool of the thyrocytes that can have an impact on thyroid function (5).

Evidence has been accumulating that MS and Ob associate with a progressive increase in arterial hypertension (AH), diabetes mellitus type 2 and impaired glucose tolerance. Accordingly, the findings of the current study are consistent with those reported in the literature. The estimated prevalence of AH in the group of euthyroid patients with MS and Ob was 54,5%, and was significantly higher among the patients with concomitant hypothyroidism (67,3%). Similarly, the total cholesterol and triglyceride levels, the correlated positively with serum TSH levels (Fig. 1 and Fig. 2). The median of the total cholesterol in the patients with hypothyroidism receiving treatment with levothyroxine were

Table 4.

Mean values, standard deviation (SD) and median of variables in both groups of patients with metabolic syndrome and central obesity: Gr A - patients with hypothyroidism; Gr B - euthyroid patients without thyroid disease (mean TSH-A/B,  $p < 0,0001$ )

Groups		TSH	Cholest.	HDL	3-glyc	Uric ac
Gr A	Mean	5,82	5,58	1,20	1,79	349,47
	N	100	100	86	100	84
	Std. Deviation	6,70	0,99	0,25	1,09	95,13
	Median	4,07	5,46	1,19	1,55	330,00
Gr B	Mean	1,70	5,36	1,24	1,60	350,88
	N	101	101	88	101	93
	Std. Deviation	0,81	1,07	0,30	1,02	94,92
	Median	1,52	5,30	1,19	1,34	335,00

significantly lower compared to patients with untreated hypothyroidism (Fig. 4).

It has long been known that thyroid hormone levels affect body weight. Hypothyroidism has been linked to insulin resistance and enhanced adipocytokine synthesis due to chronic inflammation (5, 9, 16, 21).

Our results showed an elevated HOMA-IR in the patients with hypothyroidism, comparable to those in euthyroid patients with MS and Ob. This corresponds to a relatively high prevalence of glucose intolerance, including overt DM2, which was documented in 20,8% of the hypo-

Figure 1. Correlation between the TSH and the total cholesterol in patients with MS, Ob and hypothyroidism (gr A)

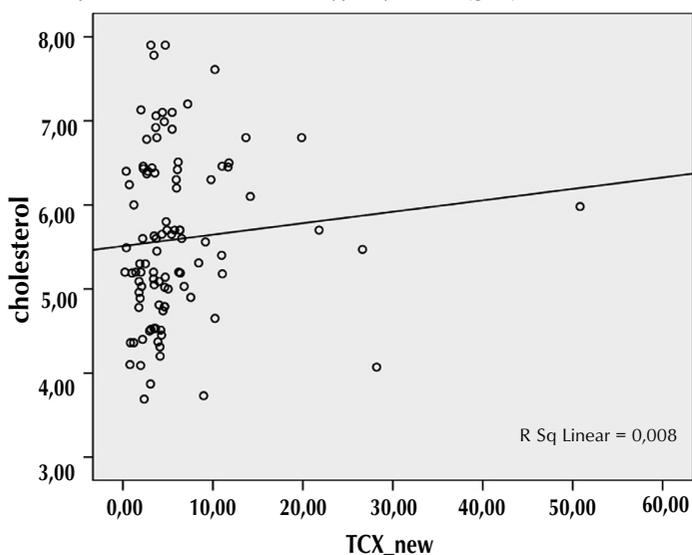


Figure 2. Correlation between the TSH and the triglycerides in patients with MS, Ob and hypothyroidism (gr A)

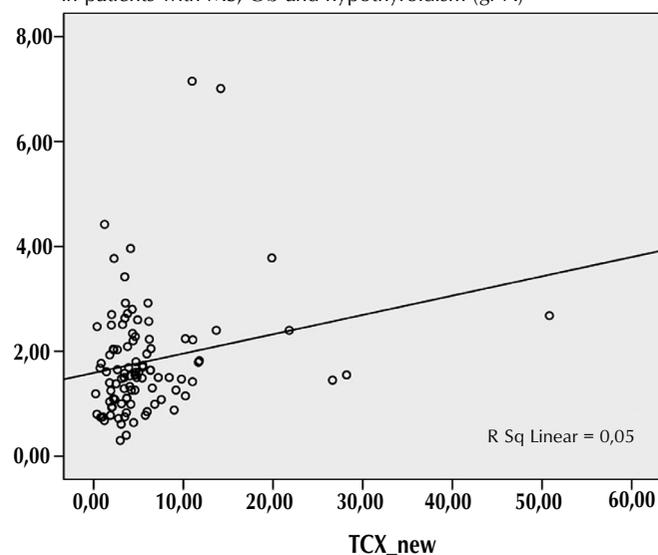


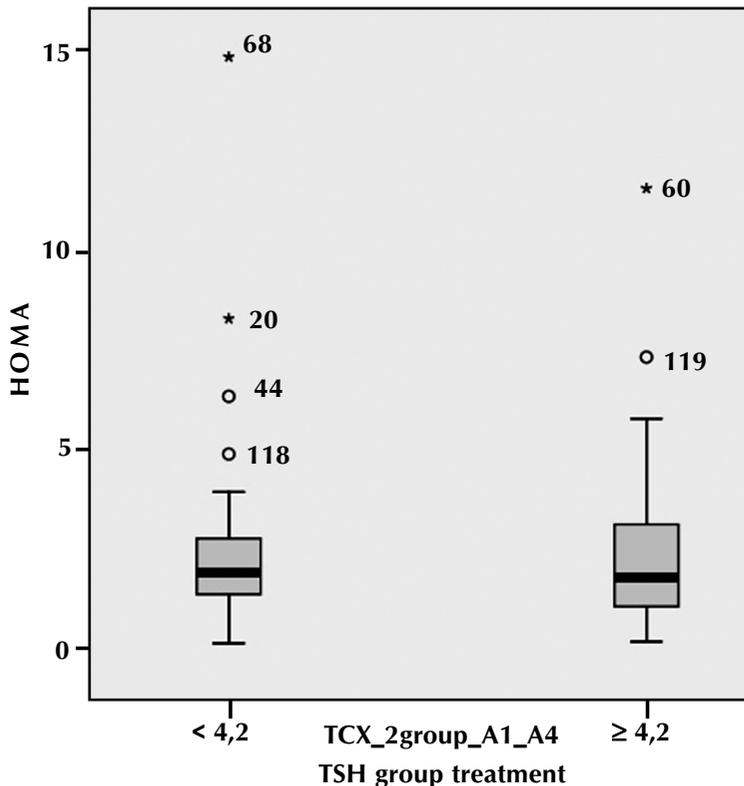
Table 5.

Mean TSH in the patients with MS, Ob and hypothyroidism (gr A) according to Levothyroxine treatment: 1) adequately corrected hypothyroidism; 2) untreated hypothyroidism

Group A subgroups according to TSH level (mIU/l)	N	Mean	Median	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Range
1 < 4,2/ treated with c LT4	52	2,49	2,57	1,13	0,38	4,13	3,91
2 ≥ 4,2/uncorrected with c LT4	48	9,42	6,33	8,22	4,20	50,82	46,62
Total	100	5,81	4,06	6,70	0,38	50,82	50,60

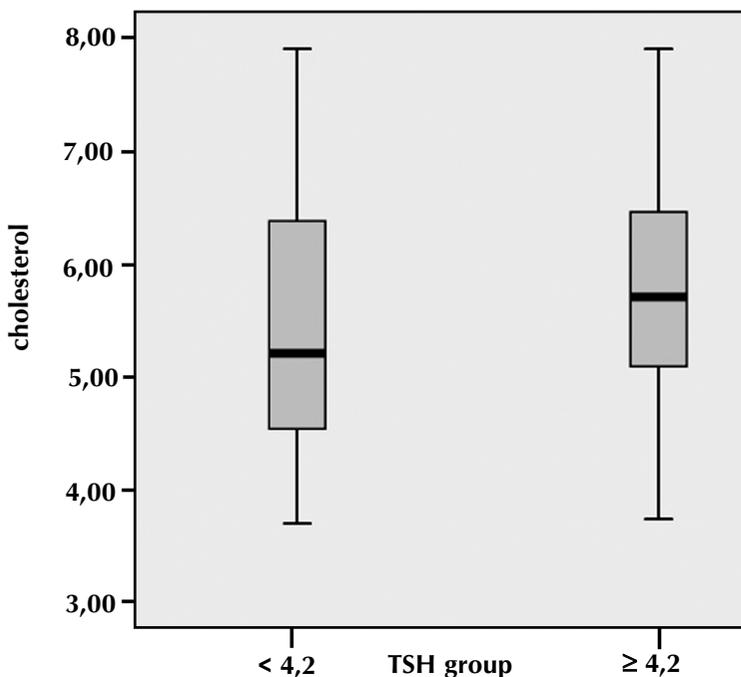
**Figure 3.** BOX-PLOT: Median of HOMA-IR in MS/Ob patients with hypothyroidism according to Levothyroxine treatment:

- 1) patients with treated hypothyroidism (TSH < 4,2 mIU/L),
- 2) patients with untreated hypothyroidism (TSH ≥ 4,2 mIU/L)



**Figure 4.** Median of the total cholesterol in MS/Ob patients with hypothyroidism (gr A) according to Levothyroxine treatment:

- 1) patients with adequately corrected hypothyroidism (TSH < 4,2 mIU/L),
- 2) patients with untreated hypothyroidism (TSH ≥ 4,2 mIU/L)



thyroid (group A) and 17,8% of the euthyroid individuals (group B).

Recently, research has elucidated the role of adipocytokines in the feedback between fat tissue and thyroid hormone secretion (3, 4, 5, 7, 15, 17, 22). Several authors have assumed that leptin plays an inhibitory role on deiodinase-2 activity in the hypothalamus and the pituitary gland, thus blocking the conversion of thyroxine (T<sub>4</sub>) to the active hormone triiodothyronine (T<sub>3</sub>) with a consequent increase in TSH secretion (6,9).

Moreover, it has also been proved that in patients with higher degree of obesity the peripheral conversion of, T<sub>4</sub> to T<sub>3</sub> catalyzed by deiodinases-1, is decreased which results in an increase in the biologically inactive reverse T<sub>3</sub>, forming the so called „tissue“ hypothyroidism. Future research is needed on this topic.

#### ***In conclusion***

The results of this study indicate that there is a high prevalence of overlapping of MS, abdominal obesity, subclinical and overt hypothyroidism, which is associated with higher rates of arterial hypertension and disorders in the lipid metabolism – major risk factors for cardiovascular complications. Therefore, all overweight and obese subjects and those with metabolic syndrome should be routinely screened for thyroid dysfunction, including subclinical hypothyroidism, and treated accordingly. More systematic population-based studies are needed in order to establish the epidemiology of thyroid dysfunction among individuals with MS and metabolic obesity, as well as elucidate the pathogenetic interactions and the etiological factors behind these processes.

1. Борисова А.-М., Ковачева Р, Шинков А.,Атанасова И, Вуков М, Асланова Н, Влахов Й, Даковска А.: Разпространение и характеристика на метаболитния синдром в неподбрана българска популация, *Ендокринология*, 2007,12,(2),68-77
2. Борисова А.-М., Ковачева Р. , Шинков А., Атанасова И., Асланова Н,Влахов Й, Вуков М.: Хипотиреоидизъм и метаболитен синдром, *Ендокринология*, 2009, 14, (2),118-126
3. Галчева С., Метаболитна и възпалителна активност на мастната тъкан при затлъстяване, *Ендокринология*, 2009, 14,(4), 245-252
4. Орбецова М., Минчева А., Тиреоидни хормони и инсулинова резистентност, I и II част, *Наука Ендокринология*, 2012, 6, (1), (2), 4-8, 44-46
5. Abdulrahman RM, Boon MR, Sips HC, Guigas B, Rensen PC, Smit JW, Hovens GC: Impact of Metformin and Compound C on NIS Expression and Iodine Uptake In Vitro and In Vivo: A role for CRE in AMPK Modulation of Thyroid Function, *Thyroid*, 2014, 24 (1) ,78-87
6. Bastard J-Ph, Maachi,C.,Lagathu et al: Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insuline resistance, *Eur Cytokine Netw*, 2006, 17, (1),4-12
7. Biondi B.: Thyroid and Obesity: An Intriguing Relationship, *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 2010, 95 (8),3614-16
8. Bossowski A, Sawick B. et al: Analysis of Serum Adiponectin, Resistin and Leptin Levels in Children and Adolescents with Autoimmune Thyroid Diseases, *J. Pediatric Endocrinology and Metab*, 2010, 23 (4), 369-377
9. Ford ES, Giles W., Dietz W.H.: Prevalence of metabolic syndrome among USA adults: Findings of the third National Health and Nutrition Examination Survey, *JAMA* 2002, 287, 356-359
10. Galfiore J, Frubeck G. and Salvador J.: Obesity and Thyroid Function: Pathophysiological and Therapeutic Implications, *Hot Thyroidology*, 6/10,1-16 (online),
11. Gaurav Agarwal, Sudhakar MK, Mohini Singh, Senthil H, Amarabalan Rajendran, The prevalence of thyroid dysfunction among South Indian women with Metabolic syndrome, 2011, 5 (2), 213-216
12. Gyawali P, .Srestha R. Bhattarai O.P., Pattern of thyroid dysfunction in metabolic syndrome, *Endocrine Abstracts*, 2012 (29), P 1721
13. Handjiev Sv, .Handgjieva-Darlenska T., Mondialisation des comportements de facteurs de risquest pour l'obesite et la diabete, *Simel Press Edit*, Sofia, 2012, 53-58
14. Heima,EM.,Eehoff W., Osterwerff et al, Thyroid function and the metabolic syndrome in older persons: a population study, *Eur. J. Endocrinol*, 2012, Dec.10, 168 (1), 59-65
15. Kozan O, Oguz A.,Abasi A. et al, Prevalence of the metabolic syndrome among Turkish Adults, *Eur. J. Clin.Nutr.*,2007, 61, 548-553
16. Manino D, Thorn D., Swensen A et al, Prevalence and outcomes of diabetes, hypertension and cardiovascular disease in COPD, *Eur Respir J*, 2008, 32, 962-969
17. Moebius S, J. Hanisch, P.Aidelsburger et al, Impact of 4 different definitions used for assessment of the prevalence of the metabolic syndrome in primary health care, The German Metabolic and Cardiovascular risk project (GEMCAS), *Cardiovasc. Diabetol.*,2007, 6, 22
18. Marzullo P, Minocci A, Tagliaferri M-A. et al, Investigation between Thyroid Hormones and Antibodies in Obesity: Leptin Levels Are Associated with Thyroid Autoimmunity Independent of Bioanthropometric Hormonal, and Weight-Related Determinants, *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 2010, August, 95(8), 3965-3972
19. Moon MK, Hong ES, Chosw et al, Association between thyroid hormone levels and regional fat accumulation in euthyroid men, *Eur. J. Endocrinol*, 2013, Apr 29,168(6),805-810
20. Roos A, Bakker St, Links T. et al, Thyroid Function is Associated with Components of Metabolic Syndrome in Euthyroid Subjects, *JCEM*, 2007, 92 (2), 491-96
21. Ruhla S, Weickert M, Arafat A, Osterhoff M, Isken F, Spranger G.: A high normal TSH is associated with the metabolic syndrome, *Clin. Endocrinol*, 2010, 72,(5),696-701
22. Santha G.P.S, Kumar A, Jeyachandran et al, Association between primary hypothyroidism and metabolic syndrome and the role of C-reactive protein in a cross-sectional study from South India, *Thyroid Research*, 2009,2:2
23. Sessimio G, Casamitana, Halperin I., Gomis R., Vilardell E: Role of thyroid hormones on serum leptin levels, *Eur. J. Endocrinol*,1998, Oct, 139 (4), 428-30
24. Vanderpump M, Tunbridge W, French J. M. et al: The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Whickham study, *Clin. Endocrin*, 1995 43, (1), 55-68
25. Uzunlulu M, Yorulmaz E, Oguz A: Prevalence of subclinical hypothyroidism in patients with metabolic syndrome, *Endocr. Journal*, 2007, 54, (1), 71-76

## Костна минерална плътност при пациенти със захарен диабет тип 1

**Ботушанов, Николай П., Орбецова, Мария М.**

Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Св. Георги“,  
Медицински университет – Пловдив,

### Адрес за кореспонденция

Д-р Николай Ботушанов,

Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Св. Георги“, МУ – Пловдив  
гр. Пловдив, бул. „Васил Априлов“ 15А, 4002

E-mail: n\_botush@yahoo.com

### Резюме

Костните промени, развиващи се в хода на захарния диабет (ЗД), обикновено не се разглеждат като характерно усложнение.

**Целта** на проучването е да се характеризират отклоненията в костната минерална плътност (КМП) при българска популация пациенти със ЗД тип 1.

**Материал и методи:** При 162 лица със ЗД тип 1 (97 жени и 65 мъже) и 100 сходни по пол и възраст клинично здрави лица (50 мъже и 50 жени) е измервана КМП на лумбални прешлени и проксимален фемур чрез двойноенергийна рентгенова абсорбциометрия (DPX-A).

**Резултати:** КМП на всички изследвани места е сигнификантно по-ниска при жените със ЗД тип 1 в сравнение с контролите ( $P=0,023$  за лумбалните прешлени,  $P=0,043$  за шийката на фемура,  $P=0,0005$  за трохантера). При мъжете със ЗД тип 1 в сравнение с контролите се отчита сигнификантна разлика в КМП за лумбалните прешлени ( $P=0,0025$ ) и трохантера ( $P=0,028$ ) и гранична за шийката на фемура ( $P=0,058$ ). При 68 (70,1%) от жените и 47 (72,3%) от мъжете със ЗД тип 1, както и при 61,3% от диабетичите с дебют на заболяването след 20-годишна възраст се установява Z score  $< -2,0$  на някоя от изследваните скелетни зони. И в двете групи, и при двата пола е намерена сигнификантна права корелация на теглото с КМП на лумбалните прешлени ( $r=0,521$ ;  $P=0,0005$  и  $r=0,302$ ;  $P=0,006$ ) и на трохантера ( $r=0,358$ ;  $P=0,009$  и  $r=0,264$ ;  $P=0,017$ ), съответно за мъже и жени.

**Заклучение:** При пациентите със ЗД тип 1 в настоящото проучване се открива понижена КМП както за лумбалния отдел на гръбначния стълб, така и за отделните зони на проксималния фемур, като теглото и антропометричните показатели и при двата пола нямат определяща роля. Нашите данни предполагат наличие на специфичен директен ефект на ЗД тип 1 върху КМП, както преди, така и след периода на достигане на върхова костна маса.

**Ключови думи:** захарен диабет тип 1; костна минерална плътност; двойноенергийна рентгенова абсорбциометрия; Z-score

### Въведение:

Преди повече от 65 години Albright и Reifenstein откриват, че захарният диабет (ЗД) е свързан със загуба на костна маса (1). От тогава връзката между костните промени и заболяването е предмет на редица проучвания, но резултатите

го момента са разнопосочни. Остеопорозата традиционно не се споменава като характерно усложнение на ЗД и не съществува единно определение *диабетна остеопатия*. Във връзка с различните патогенетични механизми, водещи до развитие на двата основни клинични типа ЗД – тип 1 и тип 2, се наблюдават и различни промени в костната минерална плътност (КМП), маркерите за костен turnover, честотата и вида на фрактурите. В по-голяма част от проучванията при ЗД тип 1 се установява намалена КМП на някои от изследваните скелетни места (2-9), докато в други (10,11) не се открива разлика в КМП между пациентите и здрави контроли. При ЗД тип 2 резултатите от измерената КМП са с още по-изразена хетерогенност, като в момента преобладава мнението, че при липса на други рискови фактори КМП е нормална или повишена, най-вероятно във връзка с хиперинсулинемията и наднорменото телесно тегло (12-15).

Независимо от промените в КМП, ЗД се асоциира с повишен фрактурен риск поради променено качество на костта. Така, редица проучвания (16-22) показват, че при ЗД тип 1 е налице повишен риск от всички невертебрални фрактури и, по-специално, от тези на бедрото. Въпреки, че пациентите със ЗД тип 1 са около 5-10 % от общия брой болни от ЗД, това са основно млади хора в активна трудоспособна възраст. Ето защо е много важно да се оценяват костните промени при тях и да се предприемат целенасочени мерки за възпрепятстване загубата на КМП и превенция на фрактурния риск.

**Целта** на настоящото проучване е да се характеризират отклоненията в КМП при българска популация пациенти със ЗД тип 1.

### Материал и методи:

За целите на проучването за периода 2008 - 2012 година в Клиника по Ендокринология и болести на обмяната при УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив, са обследвани 191 болни със ЗД тип 1. В проучването са включени 162 лица със ЗД тип 1-97 жени и 65 мъже, отговарящи на следните включващи критерии:

- 1) ЗД тип 1 с давност най-малко 1 г.;
- 2) възраст 20-40 г.;
- 3) BMI >19 kg/m<sup>2</sup>;
- 4) липса на съпътстващи заболявания и/или прием на медикаменти, оказващи влияние върху костния turnover;
- 5) запазени бъбречна и чернодробна функции;
- 6) запазен менструален цикъл при жените;
- 7) подписано информирано съгласие за участие в проучването.

тие в проучването.

Изключени са 29 души: 14 с начална бъбречна недостатъчност, 10 с хипотиреоидизъм, 2 с тиреотоксикоза, 2 с бременност и 1 с ранна менопауза. За сравнителния анализ на промените в остеодензитометричните показатели е изследвана сходна по пол, възраст и етническа принадлежност контролна група от 100 клинично здрави лица (50 жени и 50 мъже).

Измерването на КМП е извършвано посредством втора генерация двойноенергиен рентгенов дензитометър – DPX-A X-ray Bone Densitometer (версия 1, 13), LUNAR Corp, USA. С оглед възрастовата характеристика на изследваните лица за оценка промените в КМП е прилаган Z-score. Измервана е КМП на: 1) лумбални прешлени L1-L4 в предно-задна проекция; 2) проксимален фемур – бедрена шийка, зона на Ward и трохантер. При всички участници в проучването е измервана КМП на ляв проксимален фемур. Изследванията са извършвани от един и същ оператор.

Всички клинично лабораторни изследвания са извършвани в Централна клинична лаборатория при УМБАЛ „Св. Георги“. Биохимичните показатели са изследвани на клинично –химичен анализатор Konelab 60i, Thermo Electron Corporation (Финландия); HbA<sub>1c</sub> – чрез имуно-инхибиторен тест за количествено определяне; С-пептид – чрез хемилуминисцентен имунометричен тест.

Статистическият анализ е извършен с пакет за статистическа обработка SPSS, версия 15,0 за Windows. Резултатите са представени като средна аритметична  $\pm$  стандартна грешка на средната аритметична ( $\pm$ SEM), с изключение на клиничните и антропометричните параметри, които са представени като средна аритметична  $\pm$  стандартно отклонение. За всички сравнения е избрано ниво на значимост  $P < 0,05$ . Използвани са: вариационен анализ; t-критерий на Student за наличие на статистически значимо различие между изследваните показатели в отделните групи. За проверка нормалността на разпределението е използван тестът на Колмогоров-Смирнов.

### Резултати:

Средната възраст на жените със ЗД тип 1 е  $28,69 \pm 6,34$  г., на мъжете –  $29,80 \pm 6,90$  г., а в контролната група както следва: жени –  $26,41 \pm 2,91$  г., мъже –  $27,53 \pm 3,76$  г.,  $P > 0,05$ . Антропометричните показатели на лицата със ЗД тип 1 и здравите лица са сходни (Табл. 1).

Средната продължителност на ЗД е  $10,78 \pm 7,94$  г. (1-32 г.) и съвпада със средната продължителност на инсулиново лечение. Всички пациенти

Таблица 1.

Антропометрични показатели на лицата със ЗД тип 1 и здравите лица

Показател \ Група	Жени със ЗД тип 1 (n=97)	Контроли жени (n=50)	Мъже със ЗД тип 1 (n=62)	Контроли мъже (n=50)
Ръст (cm)	161,57 ± 6,2	163,65 ± 5,3	174,33 ± 6,7	176,24 ± 5,7
Тегло (kg)	61,16 ± 9,7	64,61 ± 5,7	71,51 ± 11,5	75,65 ± 9,5
ВМІ (kg/m <sup>2</sup> )	23,45 ± 3,5	24,25 ± 2,5	23,65 ± 3,0	25,63 ± 4,0

Резултатите са представени като средна аритметична ± стандартно отклонение

Таблица 2.

КМП в g/cm<sup>2</sup> и Z-score на лумбални прешлени (L1-L4) и отделните зони на проксимален фемур при жени със ЗД тип 1 и здрави жени.

Показател \ Група	Жени със ЗД тип 1 (n=97)	Контроли жени (n=50)	P
КМП (L1-L4)	1,1009 ± 0,013	1,1978 ± 0,027	P=0,023
Z-score	-0,662 ± 0,114	-0,183 ± 0,152	
КМП шийка	0,8591 ± 0,013	0,9236 ± 0,045	P=0,043
Z-score	-0,981 ± 0,112	-0,3423 ± 0,132	
КМП Ward	0,8053 ± 0,016	0,8465 ± 0,035	P=0,282
Z-score	-0,824 ± 0,104	-0,5568 ± 0,156	
КМП трохантер	0,6797 ± 0,019	0,8256 ± 0,013	P=0,0005
Z-score	-1,001 ± 0,104	-0,487 ± 0,109	

Резултатите са представени като средна аритметична ± средна грешка на средната аритметична (±SEM).

Таблица 3.

КМП в g/cm<sup>2</sup> и Z-score на лумбални прешлени (L1-L4) и отделните зони на проксимален фемур при мъже със ЗД тип 1 и здрави мъже.

Показател \ Група	Мъже със ЗД тип 1 (n=65)	Контроли мъже (n=50)	P
КМП (L1-L4)	1,1102 ± 0,018	1,3346 ± 0,016	P=0,0025
Z-score	-1,088 ± 0,145	-0,282 ± 0,168	
КМП шийка	0,9435 ± 0,037	0,9968 ± 0,015	P= 0,058
Z-score	- 0,738 ± 0,159	-0,392 ± 0,133	
КМП Ward	0,8505 ± 0,049	0,8842 ± 0,045	P=0,282
Z-score	-0,824 ± 0,167	-0,447 ± 0,154	
КМП трохантер	0,8295 ± 0,016	0,9256 ± 0,031	P= 0,028
Z-score	-0,739 ± 0,156	-0,5476 ± 0,139	

Резултатите са представени като средна аритметична ± средна грешка на средната аритметична (±SEM).

Таблица 4.

Корелационни коефициенти (r) между КМП (g/cm<sup>2</sup>) на изследваните скелетни места.

	КМП шийка	КМП трохантер	КМП Ward
КМП (L1-L4)	0,688**	0,681**	0,672**
КМП шийка		0,862**	0,928**
КМП трохантер			0,797**

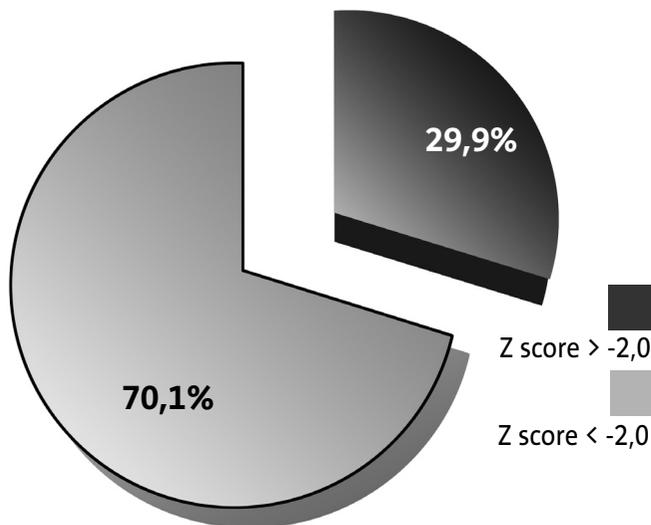
\*\* P<0,01

са на инсулиново лечение: 156 (96,3%) с базално-болусен режим, 6 (3,7%) с готови инсулинови смеси. При 143 (88,3%) лечението се осъществява с инсулинови аналози, а при 19 (11,7%) – с конвенционални човешки инсулини. При 23 (14,2%) е диагностицирана непролиферативна диабетна ретинопатия, а при 16 (9,8 %) – пролиферативна. При 16 (9,8 %) е установена диабетна нефропатия в стадий на микропротеинурия (микропротеинурия >30 mg/24h най-малко в 2 последователни измервания през 6 мес.). Всички пациенти са със запазена бъбречна функция, оценена чрез стойностите на серумен креатинин, и запазена гломерулна филтрация, определена чрез креатининовия клирънс (>1,3 ml/s), изчислен по формулата на Cockcroft-Gault. При 52 (32,1%) има симптоми на периферна сензорна полиневропатия.

Остеодензитометричните измервания на КМП в отделните зони на интерес при патологичната и контролната групи са представени в таблици 2 и 3. КМП на лумбалните прешлени (L1-L4) е с 0,0969 g/cm<sup>2</sup> по-ниска при жените със ЗД тип 1 в сравнение със сходните по възраст здрави жени (P=0,023). В трите изследвани зони на проксималния фемур се установява също по-ниска КМП, като разликите са най-изразени на трохантера, а в зоната на Ward не достигат сигнификантност (P= 0,282). В абсолютни стойности при жените със ЗД тип 1 КМП на шийката на фемура е по-ниска с 0,0645g/cm<sup>2</sup> (P=0,043), а на трохантера – с 0,1459 g/cm<sup>2</sup> (P=0,0005) в сравнение с

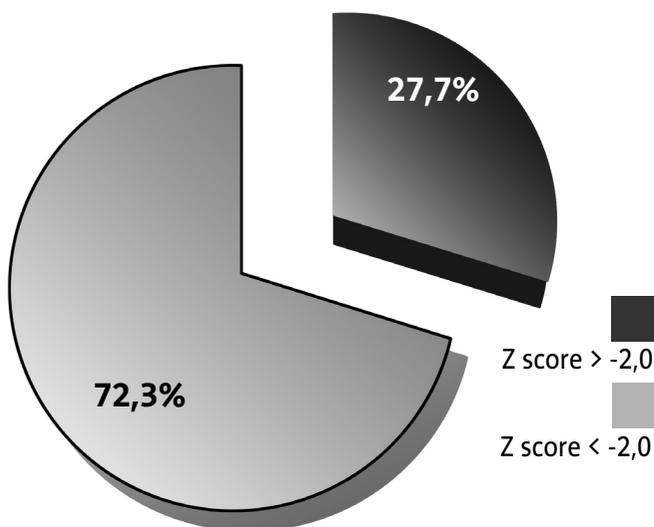
Фигура 1.

Разпределение на жените със ЗД тип 1 спрямо Z-score



Фигура 2.

Разпределение на мъжете със ЗД тип 1 спрямо Z-score



контролите (Табл. 2). По подобие на жените, при мъжете със ЗД тип 1 КМГ на лумбалните прешлени (L1-L4) е с 0,2244g/cm<sup>2</sup> по-ниска в сравнение с тази при сходните по възраст здрави мъже (P=0,0025), а на трохантера - с 0,0961g/cm<sup>2</sup> (P=0,028). Разликите в КМГ на шийката на фемура и зоната на Ward между двете групи, макар и по-ниски при диабетците, не достигат статистическа значимост (P=0,058, респ. P=0,182) (Табл. 3).

Отчита се сигнификантна права корелация между КМГ на различните изследвани скелетни места (Табл. 4). Оценката на промените в КМГ е извършвана на база на най-ниския измерен ре-

зултат на което и да е скелетно място. Спрямо стойност на Z score <-2,0 на някои от изследваните скелетни зони в групата със ЗД тип 1 се установява по-ниска от очакваната за възрастта и пола КМГ при 68 от жените (70,1%) (Фиг. 1) и 47 от мъжете (72,3%) (Фиг. 2). В групата на здравите контроли не се открива КМГ по-ниска с повече от 2 SD отклонения от средната за сходната по пол, възраст и раса популация. За да се минимизира ефектът на „нормално ниска“ за възрастта КМГ, допълнително са обработени данните на диабетците, при които заболяването е дебютирало след 20 годишна възраст - 63 души (42 жени и 21 мъже). Според Z score <-2,0 при 38 от тях (61,3%) се отчита по-ниска от очакваната за възрастта КМГ на лумбални прешлени и/или някои от зоните на проксималния фемур. Резултатите са показани на фигура 3.

И в двете изследвани групи (пациенти и контроли), и при двата пола се установява сигнификантна права корелация на телесното тегло с КМГ на лумбалните прешлени (r=0,521; P=0,0005 при мъжете и r=0,302; P=0,006 при жените). По отношение зоните на проксималния фемур такава корелация не се установява.

HbA<sub>1c</sub> показва сигнификантна отрицателна корелация с ръста (r=-0,356; P=0,026) и с телесното тегло (r=-0,424; P=0,007). Продължителността на диабета корелира сигнификантно с телесното тегло (r=0,299; P=0,016), но не и с ръста (r=0,104; P=0,409). С-пептидът корелира положително с КМГ на изследваните скелетни места.

За по-детайлно изучаване влиянието на продължителността на ЗД тип 1 върху КМГ, пациентите са разделени в четири групи: I група с продължителност на ЗД ≤ 5 г.; II група - над 5 и ≤ 10 г.; III група - над 10 г. и ≤ 15 г.; IV група >15 г. Резултатите от КМГ в четирите групи са представени в Таблица 5. Сравнението на КМГ на отделните скелетни места при пациентите с различна продължителност на заболяването показва статистически значимо по-ниска КМГ на лумбални прешлени с 0,0364 g/cm<sup>2</sup> (P=0,032), на шийката на бедрената кост с 0,0415 g/cm<sup>2</sup> (P=0,026) и на трохантера с 0,093 g/cm<sup>2</sup> (P=0,004) при пациентите от I и II група. Подобна статистически значима разлика се отчита и при сравняване на КМГ между I и III група (P=0,028 за L1-L4; P=0,024 за шийката на бедрената кост и P=0,031 за трохантера) и между I и IV група (P=0,013 за L1-L4; P=0,031 за шийката на бедрената кост и P=0,038 за трохантера). Сравняването на КМГ между II и III групи (P=0,126 за L1-L4; P=0,232 за шийката на бедрената кост и P=0,081

Таблица 5.

КМП (g/cm<sup>2</sup>) на отделните скелетни места по групи спрямо продължителността на ЗД тип 1 в години.

Показател	Продължителност на ЗД тип 1			
	I група ЗД ≤ 5 г.	II група 5 г. < ЗД ≤ 10 г.	III група 10 г. < ЗД ≤ 15 г.	IV група 15 г. ≤ ЗД
	n=37	n=32	n=53	n=40
КМП трохантер	0,7837 ± 0,021**	0,6907 ± 0,018	0,7188 ± 0,017	0,7220 ± 0,022
КМП Ward	0,8488 ± 0,054	0,8321 ± 0,025	0,8638 ± 0,022	0,7491 ± 0,028
КМП шийка	0,9103 ± 0,041*	0,8688 ± 0,023	0,8690 ± 0,019	0,8644 ± 0,026
КМП L1L4	1,1257 ± 0,018*	1,0893 ± 0,024	1,0828 ± 0,017	1,0792 ± 0,028

Резултатите са представени като средна аритметична ± средна грешка на средната аритметична (±SEM). \* P<0,05; \*\* P<0,01

за трохантера), II и IV групи (P=0,342 за L1-L4; P=0,124 за шийката на бедрената кост и P=0,083 за трохантера) и III и IV групи (P=0,328 за L1-L4; P=0,465 за шийката на бедрената кост и P=0,145 за трохантера) не показва статистически значими разлики. След 5<sup>ма</sup> година от изявата на ЗД тип 1 се наблюдава средно намаление на КМП на лумбални прешлени с 0,007 g/cm<sup>2</sup>/г. За шийката на бедрената кост това намаление е 0,008 g/cm<sup>2</sup>/г., за трохантера е 0,018 g/cm<sup>2</sup>/г. Не се отчита статистически значима разлика между КМП на отделните скелетни места при давност на диабета между 5 и 10 г. (II група) с тази при давност между 10 и 15 г. (III група) и над 15 г. (IV група).

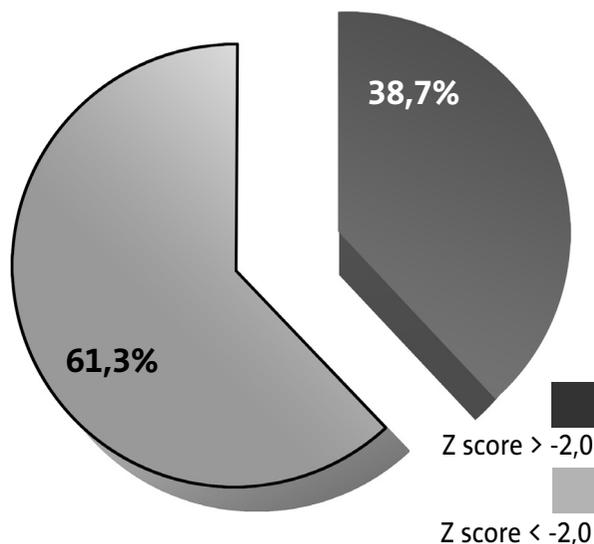
При пациентите с кратка продължителност на заболяването до 5 г. (I група) нивата на С-пептид (0,6016±0,138 ng/ml) са значимо по-високи (P<0,01) в сравнение с тези в групите с продължителност на заболяването 5-10 г. (II група) (0,2150±0,070 ng/ml), 10-15 г. (III група) (0,0767±0,232 ng/ml) и над 15 г. (IV група) (0,032±0,038 ng/ml), което корелира и с наблюдаваната статистически значимо по-ниска КМП на изследваните скелетни места с напредване продължителността на заболяването.

### Обсъждане

Проведените остеоензимометрични изследвания показват, че при пациентите със ЗД тип 1, както при мъжете, така и при жените, е налице понижена КМП за всички изследвани скелетни места в сравнение с контролната група клинично здрави лица на сходна възраст, което е в съответствие с данните на редица автори (2-9).

Фигура 3.

Разпределение на лицата с дебют на ЗД тип 1 след 20-годишна възраст спрямо Z-score



За оценка на костните промени при заболяването определено трябва да използва Z-score, поради неприменимостта на T-score с оглед на възрастовата група. Правата сигнификантна корелация на КМП на различните изследвани скелетни места показва, че остеоензимометрия може да бъде извършена само на едно от тях (лумбални прешлени или проксимален фемур) и по получените резултати да се съди за налични промени в останалите скелетни места, което би било удобно за клиничната практика. При жените със ЗД тип 1 от настоящото проучване намалението на КМП е най-силно изразено в зоната на трохантера, а при мъжете – в зоната на лумбалните прешлени. Разликите в костните

промени при мъже и жени спрямо отделните скелетни места, от една страна биха могли да бъдат обяснени с различното съотношение кортикална/трабекуларна кост в лумбалните прешлени и отделните зони на проксималния фемур, а от друга – с различното време на достигане на върхова костна маса на отделните скелетни места при двата пола.

Спрямо Z score <-2,0 над 70% от жените и мъжете със ЗД тип 1 попадат в групата на „понижка от очакваната за възрастта“ КМП. По-добри са резултатите в подгрупата диабетици с дебют на заболяването след 20-годишна възраст. Тези данни предполагат наличието на специфичен директен ефект на ЗД тип 1 върху КМП, както преди, така и след периода на достигане на върхова костна маса. Наличният при тип 1 ЗД дефицит на инсулин (23,24) и инсулиноподобен растежен фактор-1 (IGF-1), които са анаболни фактори и регулатори на костното образуване (25), би могъл да допринесе за намалената остеобластна функция, респективно намалената КМП.

В по-голяма част от литературните източници продължителността на ЗД тип 1 е пряко свързана с промените в КМП (5, 6, 8, 10). Налице са *in vivo* (26) и *in vitro* (27) данни, че продължителното въздействие на високата кръвна захар върху остеобластите води до нарушаване на функцията им чрез вътреклетъчно натрупване на сорбитол (27) и потиска пролиферацията и костната диференциация на мезенхимните стволови клетки (28). Характерното за захарния диабет и свързано с хипергликемията повишено образуване на крайните продукти на гликирането (AGEs) и натрупването им в костната тъкан води до нарушени биомеханични качества на костта вследствие променените биохимични и биофизични свойства на колагеновия матрикс (29, 30).

В настоящото проучване нивата на  $HbA_{1c}$  и продължителността на ЗД тип 1 (в години) не показват сигнификантна корелация с КМП на изследваните скелетни места, ако се разгледа групата като цяло. Това може би се дължи на голямата хетерогенност на групата диабетици по отношение продължителността на заболяването (от 1 до 32 години), както и на невъзможността за цялостна оценка на метаболитния контрол по изследваната стойност на  $HbA_{1c}$ . Обаче, сравнението на КМП на отделните скелетни места при пациентите с различна продължителност на ЗД показва статистически значимо снижение на КМП след 5 година от началото на заболяването, което може да се дължи на задълбочаващия се инсулинов дефицит. Така,

паралелно с наличната инсулинопения при пациентите със ЗД тип 1 се установява и намалена серумна концентрация на IGF-1 в сравнение с тази при здравите контроли. След 10-та година от началото на ЗД се наблюдава стабилизиране на КМП, което може би отразява кумулираща ефект на провежданото инсулиново лечение. За обяснение на получените от нас данни би било ценно да се проследи ефектът на метаболитния контрол върху КМП при ЗД тип 1 в целенасочено лонгитудинално проучване.

Отдавна е известно влиянието на антропометричните величини (тегло, индекс на телесна маса) върху КМП, като повишеното телесно тегло се счита протективен фактор срещу намаление на КМП, най-вероятно поради повишеното механично натоварване, стимулиращо чрез механорецепторите костното изграждане (31, 32). Нашите резултати показват, че между пациентите със ЗД тип 1 от двата пола и здравите лица липсва сигнификантна разлика в телесното тегло, височината и BMI. И в двете изследвани групи, и при двата пола се установява сигнификантна права корелация на телесното тегло само с КМП на лумбални прешлени, но не и с КМП на проксималния фемур. Поради това се налага изводът, че телесното тегло и пропорции не играят определяща роля за костните промени при ЗД тип 1.

**В заключение,** лицата със ЗД тип 1 са с понижена КМП. Ето защо те трябва да бъдат насочвани за измерване на КМП след навършване възрастта на завършен костен растеж (20-25 години) и при наличие на Z-score < -2,0 на някои от изследваните скелетни места подлежат на допълнителна оценка на костния метаболизъм чрез измерване на маркерите на костен turnover и/или остеодегностометрична оценка на костните промени, чрез повторно измерване на КМП на същото скелетно място след период от 12-18 месеца. Това би дало възможност да се определят рисковите за развитие на ниска КМП пациенти със ЗД тип 1 и да се предприемат съответни превантивни мерки.

# Bone Mineral Density in Patients with Type 1 Diabetes Mellitus

Botushanov, Nickolay P., Orbetzova, Maria M.

Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases, „Sv. Georgy“ University Hospital, Medical University, Plovdiv

---

## Address for correspondence:

Nickolay Botushanov, MD

Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases „Sv. Georgy“ University Hospital, MU, Plovdiv

Adress: Plovdiv, 15A Vasil Aprilov blvd.

E-mail: n\_botush@yahoo.com

## Abstract

Bone changes that develop in the course of diabetes mellitus (DM) are not usually regarded as a typical complication. The aim of this study was to characterize the variations in bone mineral density (BMD) in a Bulgarian population of patients with type 1 DM.

**Materials and methods:** BMD was measured at the lumbar spine and proximal femur by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) in 162 patients with type 1 DM (97 women and 65 men) and 100 age and sex matched healthy individuals (50 men and 50 women).

**Results:** BMD at all tested sites was significantly lower in the women with type 1 DM in comparison to the controls ( $P=0,023$  at the lumbar spine,  $P=0,043$  at the femoral neck,  $P=0,0005$  at the trochanter). As compared to the controls the men with type 1 DM showed a significantly lower BMD at the lumbar spine ( $P=0,0025$ ) and the trochanter ( $P=0,028$ ), and not at the femoral neck ( $P=0,058$ ). A Z-score lower than  $-2,0$  SD at any of the measured sites was established in 68 (70,1%) women and 47 (72,3%) men with type 1 DM, as well as in 61,3% of the diabetics with disease onset after the age of 20. Significant linear correlation was found between the body weight and BMD at the lumbar spine ( $r=0,521$ ;  $P=0,0005$  and  $r=0,302$ ;  $P=0,006$ ) and at trochanter ( $r=0,358$ ;  $P=0,009$  and  $r=0,264$ ;  $P=0,017$ ) for men and women, respectively.

**Conclusion:** In the current study a decreased BMD was found at both the lumbar spine and the separate areas of the proximal femur, while in both sexes the body weight and anthropometric parameters did not play a determining role. Our data suggest the presence of a specific direct effect of type 1 DM on BMD both before and after the period of reaching peak bone mass.

---

**Key words:** diabetes mellitus type 1, bone mineral density, dual-energy X-ray absorptiometry, Z-score

## Introduction:

More than 65 years ago Albright and Reifenshtein showed that diabetes mellitus (DM) is associated with bone mineral loss (1). Since then, the relationship between bone changes and the disease is a subject to a number of studies, but results so far are inconclusive. Osteoporosis is not traditionally mentioned as a characteristic complication of DM and so far there is no single definition of *diabetic osteopathy*. Due to the different pathogenic mechanisms leading to the development

of the two major clinical types of DM – type 1 and type 2, various changes in bone mineral density (BMD), bone turnover markers, frequency and type of fractures are observed. In most of the studies in type 1 DM, a reduced BMD was found at some of the examined skeletal sites (2-9), while (10,11) no difference was established in others between the patients and the healthy controls. In type 2 DM the results of the BMD measurements are even more heterogenic. Currently the prevalent opinion is that in the absence of other risk factors BMD is normal or elevated in type 2 DM most likely due to hyperinsulinaemia and obesi

ty generally accompanying the disease (12-15). Regardless of the changes in BMD, DM is associated with increased fracture risk due to altered bone quality. Thus, number of studies (16-22) showed that in DM type 1 there was an increased risk of all non-vertebral fractures and especially that of the femur. Nevertheless that patients with type 1 DM account for 5–10% of those with DM, at their majority they are young active people. With the expected increase in the absolute number and life expectancy of diabetic patients, the risk of developing complications different from those typical for the disease, and so far considered of no such great importance, like diabetic bone changes for example, comes to the forefront. Therefore in type 1 diabetic patients it is important to assess the bone changes and take appropriate measures to prevent bone loss.

**The aim** of this study was to examine the variations in BMD in Bulgarian patients with type 1 DM.

### Materials and Methods:

One hundred ninety one patients with type 1 DM were examined in the Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases at the University Hospital „Sv. Georgy“ in Plovdiv from year 2008 to 2012. One hundred sixty two of them (97 women and 65 man) met the study inclusion criteria: 1) type 1 DM for at least 1 year; 2) age between 20 and 40 years; 3) BMI>19kg/m<sup>2</sup>; 4) absence of co-morbidities and/or intake of medications that could affect bone turnover; 5) normal renal and liver function; 6) regular menstrual cycle for women; 6) signed informed consent to participate in the study. Twenty nine patients were excluded as follows: 14 with initial renal failure, 10 with uncontrolled hypothyroidism, 2 with thyrotoxicosis, 2 with pregnancy and 1 with premature menopause. We investigated age-, sex- and ethnically matched control group of 100 clinically healthy individuals (50 women and 50 men).

Bone mineral density (BMD) was measured by central dual-energy x-ray absorptiometry (DXA) (DPX-A X-ray Bone Densitometer, version 1,13, LUNAR Corp. USA). Z-score was used for the evaluation of the BMD changes because of the age range of the included subjects. BMD was measured at the following regions of interest: lumbar spine /L1-L4 in PA position/ and left proximal hip /femoral neck, Ward's area and greater trochanter/. All the measurements were performed by one technologist to minimize the possible precision error. All laboratory tests were performed in the Central Clinical Laboratory at University Hospital „Sv. Georgy“. Biochemical parameters were measured by chemical analyzer Konelab 60i, Thermo Electorn Corporation (Finland); HbA<sub>1c</sub> – by immunoinhibitory method for quantitative determination; C-peptide – by chemiluminescent immunometric test.

**Statistical analysis:** Analyses were performed using SPSS version 15,0 (PASW Statistics, Chicago,IL,USA) for Windows. All the data were presented as mean ± SEM ( $\bar{x} \pm S\bar{x}$ ), with the exception of clinical and anthropometric parameters, that were shown as mean ± SD for comparison between groups. Significance level of P < 0,05 was chosen for all comparisons. In addition to that, variational analyses and Student's t-criteria for statistically significant difference in the studied parameters between the different groups were used. We performed Kolmogorov-Smirnov test to check the data distribution.

### Results:

The average age in the diabetic group was 28,69±6,34 ys in women and 29,80±6,90 ys in men. In the control group the average age was as follows: women 26,41±2,91 ys, men 27,59±3,76 yrs (P>0,05). The anthropometric parameters of the patients with type 1 DM and the healthy controls showed no statistical difference (Table 1). Average duration of the DM was 10,78±7,94 ys (1-32 ys), the same being the average duration of insulin treatment. All patients were on insulin treatment: 156 (96,3%) on basal-bolus regimens, 6 (3,7%) on prefixed insulin mixtures; 143 (88,3%) were treated with insulin analogs and 19 (11,7%) with conventional human insulins. Twenty three (14,2%) of the patients were diagnosed with non-proliferative diabetic retinopathy, and 16 (9,8%) with proliferative diabetic retinopathy. Diabetic nephropathy in a stage of microproteinuria (albumin>30mg/24h in at least 2 consecutive measurements 6 months apart) was found in 16 (9,8%) patients. All patients were with normal renal function assessed by the values of serum creatinine, preserved glomerular filtration rate, determined by creatinine clearance (>1,3 ml/s) calculated by the formula of Cockcroft-Gault. Fifty two (32,1%) of the patients had symptoms of peripheral sensory polyneuropathy.

Osteodensitometric values of BMD at different regions of interest in the diabetic and control group are presented in Tables 2 and 3. BMD of the lumbar spine (L1-L4) was with 0,097g/cm<sup>2</sup> lower in the women with type 1 DM in comparison to the age matched healthy women (P=0,023). In the diabetic group a lower BMD was also found at all the examined areas of the proximal femur. Most pronounced differences were found at the trochanter area, while those at the Ward's area were not significant (P=0,282). In the women with type 1 DM, the BMD of the femur neck was lower by 0,064g/cm<sup>2</sup> (P=0,043), and that of the trochanter by 0,146g/cm<sup>2</sup> (P=0,0005) as compared to those in the controls (Table 2). Similarly to the data in women, BMD at the lumbar spine in the men with

type 1 DM (L1-L4) was with 0,224g/cm<sup>2</sup> lower in comparison to that in the age-matched healthy men (P=0,0025), and BMD of the trochanter was 0,096g/cm<sup>2</sup> (P=0,028) lower. The differences in BMD at the femoral neck and Ward's area between the two groups, although less pronounced in the diabetic patients, did not reach statistical significance (P=0,058, respectively P=0,182) (Table 3). Significant linear correlation was found between BMD at the examined different skeletal sites (Table 4). The evaluation of the changes in BMD was done on the basis of the lowest result at any of the skeletal sites. Lower than the expected for age and gender BMD was found in 68 women (70,1%) (Fig.1) and 47 men (72,3%) (Fig. 2) with type 1 DM according to the value of Z-score (<-2,0 SD) at any skeletal site. In the control groups individuals with BMD with Z-score <-2,0 SD were not found. To exclude the possible influence of diabetes upon the accumulation of peak bone mass we analyzed the BMD of those patients whose diabetes had started after the age of 20 years – 63 individuals (42 women and 21 men). According to Z-score <-2,0 SD, 38 of them (61,3%) had BMD lower than the expected for age and sex at any skeletal site. Results are shown on Figure 3.

A significant linear correlation was found between body weight and BMD at the lumbar spine in both examined groups (patients and controls) in both sexes (r=0,521; P=0,0005 in men and r=0,302; P=0,006 in women). No such correlation was found at the different areas of the proximal femur.

HbA<sub>1c</sub> showed a significant negative correlation with height (r=-0,356; P=0,026) and body weight (r=-0,424; P=0,007). The duration of the diabetes correlated significantly with the body weight (r=0,299; P=0,016), but not the height (r=0,104; P=0,409). C-peptide correlated positively with BMD of the examined skeletal sites. For a more detailed study on the influence of the duration of DM type 1 on BMD, the patients were divided into 4 groups: Group I with duration of DM ≤ 5 years; Group II 5 to 10 years; Group III 10 to 15 years, Group IV >15 years. Results of BMD of the 4 groups are presented in Table 5. Comparison of BMD in patients from Group I and Group II showed a statistically significant lower BMD: at the lumbar spine by 0,036g/cm<sup>2</sup> (P=0,032), at the femoral neck by 0,041g/cm<sup>2</sup> (P=0,026), and at the trochanter by 0,093g/cm<sup>2</sup> (P=0,004). Similar statistically significant difference was found when comparing the results of BMD in Group I and Group III (P=0,028 for the L1-L4; P=0,024 for the femoral neck and P=0,031 for the trochanter), as well as in Group I and Group IV (P=0,013 for the L1-L4; P=0,031 for the femoral neck, and P=0,038 for the trochanter). No statistically significant differences in BMD were found between Group II and Group III (P=0,126 for L1-L4; P=0,232 for the femoral neck and P=0,081 for the trochanter), Group II and Group IV (P=0,342 for the L1-L4; P=0,124 for the femoral neck, and P=0,083 for the trochanter),

and Group III and Group IV (P=0,328 for the L1-L4; P=0,465 for the femoral neck, and P=0,145 for the trochanter). An average decrease of BMD at the lumbar spine by 0,007g/cm<sup>2</sup>/year was observed after the 5<sup>th</sup> year of the onset of type 1 DM. For the femoral neck the decrease was 0,008g/cm<sup>2</sup>/year and for the trochanter 0,018g/cm<sup>2</sup>/year. There was no statistically significant difference in BMD at the different skeletal sites for diabetes duration between 5 to 10 years (Group II), between 10 and 15 years (Group III) and above 15 years (Group IV). In patients with the shortest diabetes duration (up to 5 years, Group I) the levels of C-peptide (0,6016±0,138 ng/ml) were significantly higher (P<0,01) compared to those in groups with disease duration between 5 and 10 years (Group II) (0,2150±0,070 ng/ml), 10-15 years (Group III) (0,0767±0,232 ng/ml) and above 15 years (Group IV) (0,032±0,038 ng/ml), which corresponded to the significantly lower BMD at the examined skeletal sites developing with the increase in the disease duration.

## Discussion:

Our osteodensitometric results showed that a reduced BMD was found at all measured skeletal sites in patients with type 1 DM, both men and women, in comparison to the age and sex-matched healthy controls. The data are consistent with that from numerous other studies (2-9). For evaluation of BMD in the age group 20-40 ys we have chosen Z-score, that should be used because of inapplicability of T-score. The observed significant positive linear correlation in BMD at different examined skeletal sites suggests that BMD could be measured at only one site (lumbar spine or proximal femur) and from the data we could extrapolate for the other skeletal sites. This is convenient for the routine clinical practice. In women with type 1 DM the decrease of BMD was most pronounced in the area of the trochanter, while in men, in the area of the lumbar spine. The difference in BMD at different skeletal sites in men and women with type 1 DM on the one hand might be explained by the different ratio of cortical/ trabecular bone at the lumbar spine and the proximal femur, and on the other hand – with the different time of reaching peak bone mass at various skeletal sites in both genders. According to the Z-score <-2,0 SD over 70% of the men and women with type 1 DM fell into the group of „lower than expected for the age“ BMD.

The results were similar in the subgroup of diabetic patients with debut of the disease after the age of 20. These data suggested the existence of a specific direct effect of type 1 DM upon BMD, both before and after the period of reaching peak bone

Table 1.

Anthropometric variables in the patients with type 1 DM and the healthy controls

Variable	Group	Women with type 1 DM (n=97)	Control women (n=50)	Men with type 1 DM (n=62)	Control men (n=50)
Height (cm)		161,57 ± 6,24	163,65 ± 5,3	174,33 ± 6,7	176,24 ± 5,7
Weight (kg)		61,16 ± 9,74	64,61 ± 5,7	71,51 ± 11,5	75,65 ± 9,5
BMI (kg/m <sup>2</sup> )		23,45 ± 3,50	24,25 ± 2,5	23,65 ± 3,1	25,63 ± 4,1

The results are presented as mean ± SD.

Table 2.

BMD in g/cm<sup>2</sup> and Z-score at the lumbar spine (L1-L4) and the different zones of the proximal femur in women with type 1 DM and control women.

Variable	Group	Women with type 1 DM (n=97)	Control women (n=50)	P
BMD L1-L4		1,1009 ± 0,013	1,1978 ± 0,027	P=0,023
Z-score		-0,662 ± 0,114	-0,183 ± 0,152	
BMD femoral neck		0,8591 ± 0,013	0,9236 ± 0,045	P=0,043
Z-score		-0,981 ± 0,112	-0,342 ± 0,132	
BMD Ward		0,8053 ± 0,016	0,8465 ± 0,035	P=0,282
Z-score		-0,824 ± 0,104	-0,556 ± 0,156	
BMD trochanter		0,6797 ± 0,019	0,8256 ± 0,013	P=0,0005
Z-score		-1,001 ± 0,104	-0,487 ± 0,109	

Results are presented as mean ± SEM.

Table 3.

BMD in g/cm<sup>2</sup> and Z-score at the lumbar spine (L1-L4) and the different zones of proximal femur in men with type 1 DM and control men.

Variable	Group	Men with type 1 DM (n=65)	Control men (n=50)	P
BMD L1-L4		1,1102 ± 0,018	1,3346 ± 0,016	P=0,0025
Z-score		-1,088 ± 0,145	-0,282 ± 0,168	
BMD femoral neck		0,9435 ± 0,037	0,9968 ± 0,015	P= 0,058
Z-score		- 0,738 ± 0,159	-0,392 ± 0,133	
BMD Ward		0,8505 ± 0,049	0,8842 ± 0,045	P=0,282
Z-score		-0,824 ± 0,167	-0,447 ± 0,154	
BMD trochanter		0,8295 ± 0,016	0,9256 ± 0,031	P= 0,028
Z-score		-0,739 ± 0,156	-0,547 ± 0,139	

Results are presented as mean ± SEM.

Table 4.

Correlation coefficients (r) between BMD (g/cm<sup>2</sup>) at the different skeletal sites.

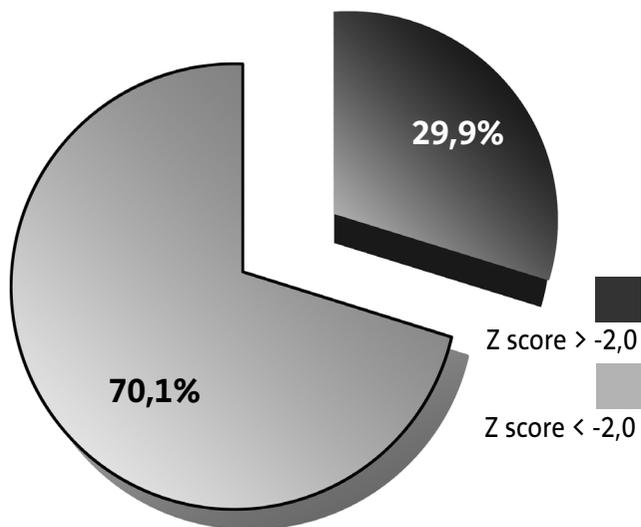
	BMD femoral neck	BMD trochanter	BMD Ward
BMD L1-L4	0,688**	0,681**	0,672**
BMD femoral neck		0,862**	0,928**
BMD trochanter			0,797**

\*\* P<0,01

mass. The specific for type 1 DM deficiency of insulin and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (23, 24), which are anabolic factors and regulators of bone formation (25), could contribute to the decreased osteoblasts function, and reduced bone formation, respectively. Most of the published data showed that the duration of type 1 DM was directly related to the changes in BMD (5, 6, 8, 10). There are *in vivo* (26) and *in vitro* (27) data, that prolonged exposure to high blood glucose levels leads to a disruption of osteoblasts function by intracellular accumulation of sorbitol (27) and inhibits the proliferation and bone differentiation of mesenchymal stem cells (28). The increased formation of advanced glycation end products (AGEs) that is typical for DM and is associated with hyperglycemia, and their accumulation in the bone tissue leads to impaired biomechanical properties of the bone as a result of the altered biochemical and biophysical properties of the collagen matrix (29, 30). In the present study the levels of HbA<sub>1c</sub> and the duration of type 1 DM showed no significant correlation with BMD at the examined skeletal sites, when the diabetic group was evaluated as a whole. This may be due to the great heterogeneity of the group in terms of duration of the diabetes (1 to 32 years), as well as to not precise assessment of the glycaemic control by a single value of HbA<sub>1c</sub>. However, a comparison of BMD at different skeletal sites in patients with different duration of type 1 DM showed statistically significant decrease in BMD after 5 years from the onset of the disease, which may be due to the

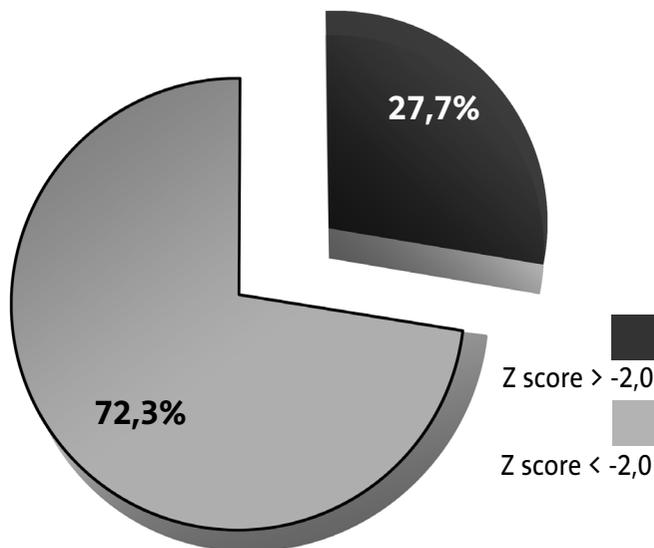
**Figure 1.**

Distribution of women with type 1 DM according to the Z-score



**Figure 2.**

Distribution of men with type 1 DM according to the Z-score



**Table 5.**

BMD (g/cm<sup>2</sup>) at the different skeletal sites in the groups according to the duration of type 1 DM (in years).

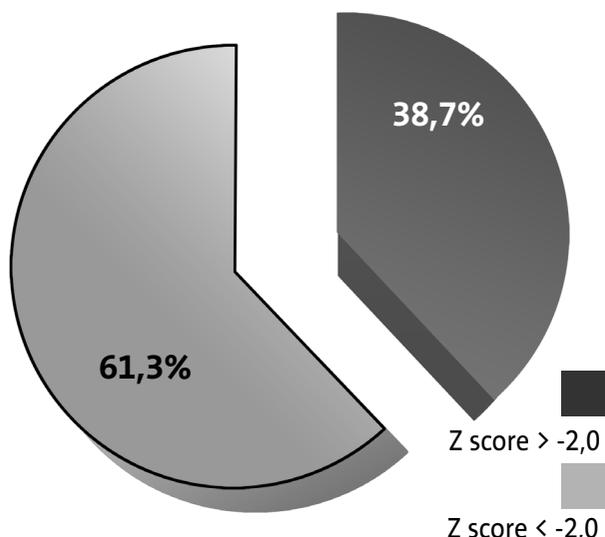
Variable	Duration of type 1 DM			
	Group I DM≤5 years	Group II 5 ys<DM≤10 ys	Group III 10 y <DM≤15 y	Group IV DM>15 years
	n=37	n=32	n=53	n=40
<b>BMD trochanter</b>	0,7837 ± 0,021**	0,6907 ± 0,018	0,7188 ± 0,017	0,7220 ± 0,022
<b>BMD Ward</b>	0,8488 ± 0,054	0,8321 ± 0,025	0,8638 ± 0,022	0,7491 ± 0,028
<b>BMD femoral neck</b>	0,9103 ± 0,041*	0,8688 ± 0,023	0,8690 ± 0,019	0,8644 ± 0,026
<b>BMD L<sub>1</sub>L<sub>4</sub></b>	1,1257 ± 0,018*	1,0893 ± 0,024	1,0828 ± 0,017	1,0792 ± 0,028

The results are presented as mean ± SEM

\* P<0,05; \*\* P<0,01

**Figure 3.**

Distribution of the patients with debut of type 1 DM after 20 years of age according to Z-score



deepening of insulin deficiency over time. This, parallel to the existing insulinopenia decreased serum concentrations of IGF-1 were observed in patients with type 1 DM as compared to healthy controls. A stabilization of BMD was observed after the 10<sup>th</sup> year of the DM debut, that may reflect the cumulative effect of the insulin treatment. For more detailed explanation of our findings, it would be valuable to follow-up the effect of the metabolic control on BMD in type 1 DM in additional longitudinal study.

The influence of the anthropometric variables (weight, body mass index) on BMD is well known. The increased body weight was considered to be a protective factor against bone loss probably due to the increased mechanical stress, which stimulates mechanoreceptors for bone formation (31, 32). Our results showed no significant difference in body weight, height and BMI in both patients with type 1 DM (men and women) and the healthy controls. In the both study groups, in both sexes, there was a significant linear correlation only between the body weight

and the BMD at the lumbar spine, but not between the BMD at the proximal femur. This leads to the conclusion that body weight did not play a decisive role for the bone changes in the patients with type 1 DM in the present study.

**In conclusion**, people with type 1 DM have decreased BMD. Therefore, they should be referred for measurement of BMD after reaching the age of completed bone development (20-25 years). If the of

Z-score is  $<-2,0$  SD at any of the measured skeletal sites, they should be referred to further evaluation of bone metabolism by measuring markers of bone turnover and/or second BMD measurement at the same location after a period of 12-18 months. This would make it possible to determine the risk for development of low BMD in the young patients with type 1 DM and to take appropriate preventive measures.

## References

1. Albright AB, Reifstein EC. The Parathyroid Glands and Metabolic Bone Disease. Selected Studies. *J Bone Joint Surg Am*, 1949;31(4):881-881b
2. Munoz-Torrez M, Jodar E, Escobar-Jimenez F, Lopezbarra P, Luna JD. Bone mineral density measured by dual X-ray absorptiometry in Spanish patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Calcif Tissue Int* 1996; 58: 316-319.
3. Mizagowski T, Czekalski S. A 2-year follow-up study on bone mineral density and markers of bone turnover in patients with long-standing insulin-dependent diabetes mellitus. *Osteoporos Int* 1998; 8: 399-403.
4. Jehle PM, Jehle DR, Mohan S, Böhm BO. Serum levels of insulin-like growth factor system components and relationship to bone metabolism in type 1 and type 2 diabetes mellitus patients. *J Endocrinol* 1998;159:399-306.
5. Tuominen JT, Impivaara O, Puukka P, Ronnema T. Bone mineral density in patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1999;22:1196-1200.
6. McNair P, Christiansen C, Christensen MS, Madsbad S, Faber OK, Binder C, Transboll. Development of bone mineral loss in insulin-treated diabetes: a 1.5 years follow-up study in sixty patients. *Eur J Clin Invest* 1981;11:55-59.
7. Forst T, Pfitzner A, Kann P, Schehler B, Lobmann R, Schäfer H. et al. Peripheral osteopenia in adult patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Med* 1995;12:874-879
8. Buyschaert M, Cauwe F, Jamart J, Brichant C, De Coster P, Magnan A, Donckier J. Proximal femur density in type 1 and 2 diabetic patients. *Diabetes Metab* 1992; 18:32-37.
9. Hui SL, Epstein S, Johnston Jr CC. A prospective study of bone mass in patients with type I diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60:74-80.
10. Gallacher SJ, Fenner JA, Fisher BM, Quin JD, Fraser WD, Logue FC et al. An evaluation of bone density and turnover in premenopausal women with type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med* 1993; 10:129-133.
11. Weber G, Beccaria L, deAngelis M, Mora S, Galli L, Cazzuffi MA, Turba F, Frisone G. Bone mass in young patients with type 1 diabetes. *Bone Miner* 1990;8: 23-30.
12. Sosa M, Dominguez M, Navarro MC, Segarra MC, Hernández D. Bone mineral metabolism is normal in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 1996;10:201-205.
13. Barrett-Connor E, Holbrook TL. Sex differences in osteoporosis in older adults with non-insulin dependent diabetes mellitus. *JAMA* 1992; 268:3333-3337.
14. Isaia GC, Ardisone P, Di Stefano M, Ferrari D, Martina V, Porta M, Tagliabue M, Molinatti GM. Bone metabolism in type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 1999;36:35-38.
15. Buyschaert M, Cauwe F, Jamart J, Brichant C, De Coster P, Magnan A, Donckier J. Proximal femur density in type 1 and 2 diabetic patients. *Diabetes Metab* 1992;1:32-37.
16. Nicodemus KK, Folsom AR. Type 1 and type 2 diabetes and incident hip fractures in postmenopausal women. *Diabetes Care* 2001;24: 1192-1197.
17. Ivers RQ, Cumming RG, Mitchell P, Peduto AJ. Diabetes and risk of fracture: The Blue Mountains Eye Study. *Diabetes Care* 2001;24:1198-1203.
18. Van Daele PLA, Stolk RP, Burger H, Algra D, Grobbee DE, Hofman A, Birkenhäger JC, Pols HA. Bone density in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 1995;122: 409-414.
19. Ahmed LA, Joakimsen RM, Bernsten GK, R. M. Joakimsen. Diabetes mellitus and the risk off non-vertebral fractures:The Tromso study. *Osteoporos Int* 2006;17:495-500.
20. Miao J, Brismar K, Nyren O, Ugarph-Morawski A, Ye W. Elevated hip fracture risk in type 1 diabetic patients: a population-based cohort study in Sweden. *Diabetes Care* 2005;28:2850-2855.
21. Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus, and the impact of insulin and oral antidiabetic medication on relative fracture risk. *Diabetologia* 2005;48:1292-1299.
22. Janghorbani M, Feskanich D, Willet WC, Hu F. Prospective study of diabetes mellitus and risk of hip fracture: The Nurses` Health Study. *Diabetes Care* 2006; 29:1573-1578.
23. Yang J, Zhang X, Wang W, Liu J. Insulin stimulates osteoblast proliferation and differentiation through ERK and PI3K in MG-63 cells. *Cell Biochem Funct* 2010; 28: 334-41
24. Capilla E, Teles-García A, Acerete L, Navarro I, Gutiérrez J. Insulin and IGF-I effects on the proliferation of an osteoblast primary culture from sea bream (*Sparus aurata*). *Gen Comp Endocrinol* 2011; 172: 107-14.
25. Jehle PM, Jehle DR, Mohan S, Böhm BO. Serum levels of insulin-like growth factor system components and relationship to bone metabolism in type 1 and type 2 diabetes mellitus patients. *J Endocrinol* 1998, 159:297-306.
26. Inaba M, Terada M, Nishizawa Y, Shioi A, Ishimura E. Protective effect of an aldose reductase inhibitor against bone loss in galactose-fed rats: possible involvement of the polyol pathway in bone metabolism. *Metabolism* 1999; 48:904-909.
27. Terada M, Inaba M, Yano Y, Hasuma T, Nishizawa Y, Shioi A, et al. Growth inhibitory effect of a high glucose concentration on osteoblast like cells. *Bone* 1988; 22:17-23.
28. Wang J, Wang B, Li Y, Wang D, Lingling E. High glucose inhibits osteogenic differentiation through the BMP signaling pathway in bone mesenchymal stem cells in mice. *EXCLI Journal* 2013;12:584-597.
29. Saito M, Marumo K. Roles of collagen enzymatic and advanced glycation end products associated crosslinking as a determinant of bone quality Nihon Rinsho. 2011; 69:1189-1197.
30. Tang SY, Zeenath U, Vashishth D. Effects of non-enzymatic glycation on cancellous bone fragility Bone.
31. Wardlaw G M. Putting body weight and osteoporosis into perspective. *Am J Clin Nutr* 1996 ; 63: 433-436.
32. Glauber H, Vollmer W, Nevitt M, Ensrud K, Orwoll E. Body weight versus body fat distribution, adiposity, and frame size as predictors of bone density. *JCEM* 1995; 80: 345-364.

## Колко стриктен трябва да бъде стриктният гликемичен контрол при лечение на захарен диабет тип 2

Коев, Драгомир Ж.

Медицински Център „Клиника професор Коеви“, Варна

## How Strict Should be the Strict Glycemic Control in the Treatment of Diabetes Mellitus Type 2

Koev, Dragomir J.

Medical Centre „Professor Koevi Clinic“

### Резюме

Лечението на захарния диабет (ЗД) тип 2 се основава на медицината на доказателствата. Международните и национални диабетни и ендокринологични организации непрекъснато утвършават препоръките за лечение на това заболяване в съответствие с актуалните постижения в ефективността на терапевтичните средства за осигуряване на добро здраве и дълголетие на болните. Независимо от това, препоръките на Американската Диабетна Асоциация (ADA) и Европейската Асоциация за Изучаване на Диабета (EASD) от 2012 г. остават един шаблон в терапията. Понастоящем все повече се осъзнава реалността, че всеки диабетно болен има свой индивидуален клиничен профил, включващ особеностите на неговите заболявания, начин на живот, индивидуални нужди и предпочитания. Ето защо, настоящите общовалидни препоръки за лечение на ЗД тип 2 не могат да се прилагат механично. Вече се осъзнава, че досегашните препоръки: всички болни да постигнат отличен гликемичен контрол с гликиран хемоглобин (HbA<sub>1c</sub>) <7% не са приемливи. Всеки болен е уникален и това изисква лечението да се съобрази с неговите индивидуални характеристики: възраст, начин на живот, тегло, придружаващи заболявания и прием на други медикаменти, социален статус, индивидуална реактивност към отделните медикаменти, риск от опасни хипогликемии, лични предпочитания и т.н. Постепенно се достигна до извода, че лечението на ЗД тип

### Abstract

The treatment of diabetes mellitus type 2 and its is based on the evidence-based medicine. International and national diabetic and endocrinological societies continuously improve their guidelines for the treatment of this wide-spread disease in accordance with the recent achievements in the control of diabetes and its complications. Nevertheless, the guidelines of the American Diabetes Association (ADA) and European Association for the Study of Diabetes (EASD) from the year 2012 still remain a cornerstone of the current treatment. Nowadays it becomes clear that every particular diabetic patient has his own individual profile of the disease as well as his own way of life, his own needs and preferences. That is why the current general guidelines for the treatment of type 2 diabetes are not suitable to all diabetic patients. It is obvious that it is impossible to construct a uniform guideline appropriate for all patients. The former recommendation to reach a perfect glycemic control for all patients with the target of HbA<sub>1c</sub> below 7% is not acceptable. On the contrary, it may be dangerous for vulnerable patients, especially in old persons prone to hypoglycemia. Every particular diabetic patient is unique and requires a treatment of diabetes in accordance with his individual profile – age, way of life, body weight, comorbidities, social status, individual sensitivity to the medication, personal preferences etc. The understanding has been reached, that individualization of diabetes treatment is the best contemporary approach.

2 трябва да е индивидуализирано, т.е. лечебният план трябва да отговаря на индивидуалния медицински и социален профил на болния. Досегашните критерии за стриктен гликемичен контрол трябва да се ревизират. Вместо общовалидната за HbA<sub>1c</sub> цел <7%, всеки болен от ЗД трябва да има индивидуална цел. Тази цел трябва да се обсъди между болния и лекуващия лекар. Това ще ангажира и двете страни да постигнат целта и да я поддържат във времето. Така може да се осигури не само по-добро здраве и по-дълъг живот, но и спокойствие, удовлетвореност и комфорт на болния, както и ангажираността му в лечебния процес. Лечението тип „конфекция“ трябва да стане „лечение по индивидуална мярка“.

### Ключови думи:

захарен диабет тип 2, HbA<sub>1c</sub>, гликемичен контрол, препоръки за лечение

It should be consistent with the individual medical and social profile, and to take into consideration the personal preferences of the patient. The former criteria for strict glycemic control should be revised. Every patient should have his/her individual target of HbA<sub>1c</sub>, depending on his/her characteristics, instead of universal target of the HbA<sub>1c</sub>. This is the way to guarantee good health, longevity, but also composure, satisfaction and comfort for the patient. The treatment type „ready-made“ should be transformed to a „made to measure“ type.

### Key words:

type 2 diabetes mellitus, HbA<sub>1c</sub>, glycemic control, treatment guidelines

Препоръките за лечението на ЗД тип 2 на Американската Диабетна Асоциация (ADA) и на Европейската Асоциация за Изучаване на Диабета (EASD) от 2012 г. препоръчват при новооткрит ЗД да се започне първоначално с метформин, а при неуспех с това лечение (HbA<sub>1c</sub> >7%), към него да се добави втори орален антидиабетен медикамент или базален инсулин. Ако и това не се постигне желаната цел от HbA<sub>1c</sub> <7%, да се направи тройна комбинация, в която доминиращо място имат сулфониурейните препарати (СУП) (1).

В тези препоръки не се дава алтернатива за подобряване на инсулиновата резистентност при изявени странични действия от лечението с метформин – стомашно-чревен дискомфорт, тежест в корема, гагене, повръщане, метален вкус в устата, диарии, а макар и рядко и кожни обриви, когато този медикамент трябва да се спре. Изпусната е възможността вместо метформин като първа опция да се назначи друг медикамент, който намалява инсулиновата резистентност, а именно пиоглитазон. Това е така, защото в САЩ този медикамент не е популярен, поради това, че е от същата фармацевтична група (тиазолидиндиони), от която е и забраненият Росиглитазон, спрян поради повишен риск от сърдечно-съдова смърт в клиничното проучване ACCORD. Той не се използва и в някои европейски страни, въпреки че не е свързан с повишена сърдечно-съдова смъртност и няма съществени тежки странични действия.

Както се казва в поговорката: «покрай сухото, гори и мокрото». В България, както и в повечето европейски и други страни, този медикамент е разрешен и се прилага успешно при лечението на ЗД тип 2. Независимо от това, пиоглитазон е включен по-нататък в последващите стъпки на терапевтичната схема – при комбинациите с два или три антидиабетни медикамента.

Друг недостатък на препоръките на ADA/EASD е недооценяването на медикаментите от групата меглитиниди – репаглинид и нагеглинид. Като краткосрочни стимулатори на инсулиновата секреция, те са подходящи за намаляване на постпрандиалната хипергликемия, като при евентуално съчетание с метформин или пиоглитазон те биха могли да реализират ефект, подобен на базално-болусната инсулинова терапия с дългодействащ и трикратно бързодействащ инсулин. Така се избягва рискът от хипогликемия, който е реален риск при обичайната комбинация на метформин с дългодействащите СУП.

В актуализираните препоръки на ADA от 2014 г. (2) се обръща внимание на необходимостта от индивидуализиране избора на лечебната схема – в зависимост от особеностите на заболяването при конкретния диабетно болен, като се отчитат предимствата и недостатъците на съответните медикаменти, т.е. лекуващите лекари следва да подберат най-подходящото лечение за своя болен. Препоръчва се стриктен гликемичен контрол (HbA<sub>1c</sub> <6,5%)

при отделни болни, предимно по-млади, без хипогликемии в хода на лечението, главно с наскоро открит диабет, с голяма очаквана продължителност на живота и без налични сърдечно-съдови заболявания. По-малко стриктен контрол ( $HbA_{1c}$  от 6,5% до 8%, което означава генощни колебания на гликемията от 7,0 до 12 ммол/л) при болни с анамнеза за тежка хипогликемия, по-малка очаквана продължителност на живота, напреднали микроваскуларни или макроваскуларни усложнения, много придружаващи заболявания и при дългогодишен ЗД, при който желаните стойности на гликирания хемоглобин много трудно могат да се достигнат, въпреки обучението, честия гликемичен контрол и ефективните дозировки на многобройните антидиабетни орални медикаменти и инсулини.

В обичайната практика у нас гликемичният контрол се основава на периодичните кръвозахарни профили, обикновено изследвана кръвна захар 3 или 4 пъти дневно преди основните хранения и госта по-рядко – постпрандиално. Ако в тези профили се появи единична кръвна захар с висока стойност, не трябва веднага да се правят промени в лечебната схема. Най-често се касае за инцидентни колебания, свързани с диетична грешка (консумация на мед, захарно изделие или подсладена напитка) или прием на медикамент повишаващ кръвната захар, например кортикостероид. Консумацията на повече хляб и местени изделия (кифли, банички, гевреци и др.) е традиция в България и нерядко може да има инцидентен прием на такъв хранителен продукт. В тези случаи решението трябва да е изчаквателно и да се проследят гликемиите в няколко последващи кръвозахарни профили, като се изчисли средната гликемия. Ако тя се окаже над 8,6 ммол/л – стойност, която отговаря на гликиран хемоглобин 7,0%, то тогава наистина ще е необходимо да се интенфицира лечението на диабета – с орални препарати или с подходяща инсулинова схема.

Тук е мястото да се подчертае, че не трябва да се подценява подгържането на диабетния диетичен режим, който ще подобри гликемичния контрол. Да се следи и телесното тегло, за да се стимулира редукация на затлъстяването, както чрез диетата, така и посредством по-голяма физическа активност. Не трябва да се забравя, че консумацията на по-голямо количество алкохол може да предизвика късна хипогликемия, особено при лечение с инсулин или СУП.

Лечението трябва да е индивидуализирано, както по отношение на поставените цели, така и за терапевтичната тактика, като се подчертава, че трябва да се вземат под внимание и предпочитанията на болния. Този подход е по-

перспективен, отколкото предишните алгоритми за лечение, но той също е трудно приложим в практиката и е нерационален, дори и като се имат пред вид допълнителни съображения, като например възраст на болния, вид и характер на трудова му дейност, физическа активност, хранителни навици, социален статус, телесно тегло, културни фактори, наличие на диабетни усложнения, придружаващи групи заболявания (особено сърдечно-съдовите), здравни приоритети, избягване на хипогликемии и постигане на по-ниска цена на лечението. След анализиране на горните съображения следва да се подбере индивидуалната прицелна стойност на желателния  $HbA_{1c}$ . Ако при диагностицирането на ЗД  $HbA_{1c}$  е повишен, а кръвната захар на гладно не е висока, да се атакува постпрандиалната хипергликемия. Въпреки добрите намерения, обаче, изборът остава доста труден и не винаги напълно индивидуализиран.

В становището на ADA/EASD от 2012 г. значението на постпрандиалната хипергликемия в цялостния гликемичен контрол оставаше недооценено, въпреки че то има главна роля за постигане желаното ниво на  $HbA_{1c}$ . Международната Диабетна Федерация (IDF) (1), както и ADA (2), обаче, публикуваха обновена версия на собствените си предишни препоръки, като признаха, че от най-голяма важност е да се постигне контрол както на гликемията на гладно, така и на постпрандиалната гликемия, което осигурява наистина оптимален гликемичен контрол. Високата постпрандиална гликемия повишава  $HbA_{1c}$  и индуцира ендотелна дисфункция, особено когато  $HbA_{1c}$  е близо до 7,0%. Ако болните имат стойности на кръвна захар на гладно в приемливи стойности, а висок  $HbA_{1c}$ , е необходимо да се следи постпрандиалната кръвна захар 1-2 часа след началото на храненето и да се назначи лечение, което да понижи постпрандиалната кръвна захар под 10 ммол/л, за да се понижи и  $HbA_{1c}$ . ADA и EASD препоръчват: при откриване на ЗД тип 2 с висока постпрандиална гликемия, силно изразена клинична симптоматика и висок  $HbA_{1c}$ , да се започне незабавно лечение с бързодействащ инсулин (без или с орални медикаменти) за понижаване на кръвната захар след хранене и то 3 пъти дневно в синхрон с главните хранения през деня. На второ място се поставя алтернативата да се започне с лечение с базален (дългодействащ) инсулин за постигане на  $HbA_{1c} < 7\%$ , дори и хипогликемията да е по-честа (2-4). Този подход е неприемлив за болните поради много причини: по-сложно лечение, необходимост от много по-чест гликемичен контрол, голям риск от хипогликемии, особено при нередовно хранене

и голяма физическа активност, трудно провеждане в условията на трудова заетост, влошено качество на живота, при пътувания на далечно разстояние от дома, екскурзии, а не на последно място и по-скъпото лечение, макар и реимбурсирано от НЗОК. Наистина, лечението с базален инсулин е по-малко обременяващо, но то носи същите рискове, както бързодействащият инсулин. Затова, от интерес на болния е да не приеме това лечение, а да започне лечение по стандартната схема с метформин или с инкретин-базирана терапия (GLP-рецепторни агонисти или DPP-4 инхибитори), отначало като самостоятелна терапия, а в случай на недостатъчно добър резултат – в комбинация с метформин. Такива са и комбинираният препарат Janumet и Euseas. Удобен за работещите болни е и GLP-рецепторният агонист Вудигеон, който се инжектира веднаж седмично и, ако това се прави в почивния ден на седмицата, не се нарушават работния ритъм и другите ангажменти в работните дни. Инсулиново лечение при новооткрит ЗД тип 2 следва да се включи като първа опция при наличие или висок риск от кетоацидоза, както и при екстремно високи гликемии или при спешна операция, или друго застрашаващо живота състояние.

Малко известен е и един друг факт, че различните етнически популации имат различни нарушения в инсулиновата секреция при ЗД тип 2. Например, при азиатската популация при един начален диабет главното нарушение е липсата на първата фаза на инсулиновата секреция, докато при европейската популация появата на диабета се дължи на инсулиновата резистентност. Ето защо, при азиатците първият медикамент при установяване на ЗД тип 2 е алфа-глюкозидазният инхибитор Аккарбоза (Glucobay), който намалява постпрандиалното повишение на кръвната захар, а не метформинът, както е при европейската популация, за да се намали инсулиновата резистентност.

Едно ново решение за индивидуализиране на лечението на диабета в практиката е да се ползва предложеният наскоро алгоритъм за медикаментозно лечение на болните от ЗД тип 2, изработен от Финландското Медицинско Дружество (5). То е създало компютъризирана система, която позволява да се намери on-line интерактивен източник за създаване на терапевтична система в съответствие с индивидуалните особености на пациента, като се следват „стъпка по стъпка“ предложенията за различните терапевтични възможности.

Неотдавна Италианската Диабетна Асоциация изготви и публикува терапевтичен план за

индивидуализирано лечение на ЗД (6). Той цели постигане на възможния най-безопасен глюкометаболитен контрол, съчетан с възможност за избор на оптимално лечение за най-честите фенотипове на ЗД тип 2. Това означава да се вземат под внимание следните показатели: възраст, индекс на телесната маса (ИТМ), наличие на макроваскуларни усложнения, риск от хипогликемия, съпътстваща сърдечна недостатъчност. Подчертава се необходимостта от домашен самоконтрол на гликемията с инструктиране на болния: в кои часове да се проверява кръвната захар и как да се води дневник за резултатите от изследването – по дни и часове, тъй като това е инструмент за оптимизиране на лечението. Схемата на лечението се съобразява с нивото на кръвната захар на гладно, преди хранене и постпрандиално. Всичко това се съчетава с обосновано структурирано вземане на решение за оптимизиране на терапевтичната схема. По този начин се осигурява адекватно лечение, съобразено с реалните условия на живот и хранене, с бързи корекции, както в лечението, така и в другите компоненти на гликемичния контрол (хранене, двигателна активност, стресови състояния, придружаващи заболявания, съпътстващи други медикаменти, напр. кортикостероиди и др.). Освен това, така се избягва „клиничната инерция“, при която назначеното веднаж лечение не се променя не само с месеци, но не рядко и с години. Тези алгоритми са достъпни също on-line на английски и на италиански език (7).

Наследените от предишните години строги стандарти за стриктен гликемичен контрол за цялата диабетна популация все още доминират в клиничната практика на ендокринолозите в България. Те се подклаждат и от някои фармацевтични фирми, които упорито внушават чрез своите реклами в медицинските списания, че целта на лечението «за повечето болни» от диабет е да се поддържа  $HbA_{1c} < 7\%$ . Това не отговаря на истината, тъй като 75% от диабетниците в България са в старческа възраст, а 38% от болните от коронарна болест на сърцето в България са със ЗД, от които 53% са с  $HbA_{1c} < 7\%$ , а още 35% имат  $HbA_{1c} < 6,5\%$ . Освен това 55% от диабетно болните са с артериална хипертония, а 75% са с висок LDL-холестерол по данни на проучването EUROASPIRE IV (8). Очевидно, това са много нежелани факти и са в разрез с изискванията за индивидуализиран подход в лечението на ЗД, да не говорим за повишения риск от сърдечно-съдова смърт. При всички гореизброени е необходим по-либерален контрол на гликемията, а не постигане на всяка цена  $HbA_{1c}$  под 7%, както внушава рекламата на една

фармацевтична фирма. Това не е случайно, тъй като интензифицираното лечение е свързано с по-големи продажби на антидиабетните лекарства и на инсулините и по-големи печалби на съответните фирми. Така, в САЩ след приемането на стандарта да се постигне  $HbA_{1c} < 7\%$  продажбите на инсулини се е увеличила с 50% през последното десетилетие (9). За сметка на това за периода от 01. 01. 2007 г. до 31. 12. 2011 г. в центровете за спешна медицинска помощ в САЩ годишно са постъпвали 97 648 болни с инсулин-продизвикана хипогликемия, като една трета от тях е трябвало да се хоспитализират поради тежкото им състояние. В над половината от всички болни кръвната захар е била под 2.8 ммол/л, като 50% от всички болни са били над 80 години. Най-честата причина за хипогликемиите са били: инжектиране на неподходящ инсулин в неподходяща доза и намален прием на храна (9). Друг рисков фактор за хипогликемия е назначаването на инсулиново лечение при болни лекуващи се със СУП, които продължават да ги приемат заедно с инсулина, което не е толкова рядка практика (10).

Догмата за „стриктен гликемичен контрол“ не издържа проверката на времето (11-14). Редича проучвания в последните две години показаха, че интензифицираното инсулиново лечение при ЗД тип 2 се съпровожда от увеличаване на явните и на скритите (неподозирани) хипогликемии, които са много по-опасни за здравето и живота на болните, отколкото предполагаемите здравни ползи, особено за лицата в старческа възраст (9,12-15). В това отношение аз имам лични наблюдения от хоспитализираните диабетно болни в болницата, в която понастоящем работя.

Лекарствата, с които се постига желаните добър контрол на отделните рискови фактори при ЗД тип 2, не винаги повлияват глобалния риск за здравето на болния (12, 16). Целта на лечението е да се утължи живота на болния без сърдечно-съдови инциденти, болезнена невропатия, бъбречна недостатъчност, ампутации и слепота, както и без риск от медикаментозни странични действия. Лекарствата, които понижават кръвната захар, не водят автоматично до утължаване на живота без диабетни усложнения. Ето защо, за да регистрира ново антидиабетно лекарство Американската агенция за лекарствата FDA (Food and Drugs Administration) понастоящем изисква доказателства, че то не само понижават кръвната захар, но и доказателства, че намалява риска от сърдечно-съдови инциденти с най-малко 80% (16).

Вече има много данни, че само стриктният гликемичен контрол не е достатъчен за добро-

то здраве на диабетно болния и за утължаване на живота му. Наскоро беше публикувана статия (15), в която се представя метаанализ на 20 клинични проучвания, сравняващи 15 269 рандомизирани болни от ЗД тип 2 на интензифицирано инсулиново лечение и 13 345 рандомизирани болни от ЗД тип 2 на конвенционално инсулиново лечение. Изключени са били лицата с налични чернодробни, бъбречни и други тежки заболявания. Проследяването е било 5 години. Крайните резултати са показали, че интензифицираното инсулиново лечение не е намалило общата смъртност, риска от нефатален миокарден инфаркт и нефропатия в сравнение с конвенционалното лечение (релативен риск 1,1). Само рискът от ретинопатия се е оказал значимо по-нисък при болните на интензифицирано лечение (релативен риск 0,80). За сметка на това, обаче, интензифицираното лечение се е съпровождало с 30% увеличение на риска от тежки хипогликемии (11).

Публикуваните досега препоръки се базират на експертни мнения при недостатъчно сигурни научни доказателства и при наличие на противоречия и неясноти. Крайното решение за индивидуализираното лечение на всеки конкретен болен от ЗД тип 2 остава на лекуващия го клиницист, който най-добре познава човека, когато лекува, неговото здравословно състояние, неговите нужди и особености, средата в която живее и възможностите му да се справи с предизвикателствата на лечението (17).

Всеки болен от ЗД тип 2 трябва да има своя индивидуална цел за стойността на гликирания хемоглобин, която трябва да се постигне и да се поддържа във времето. Тази цел трябва да се определи съвместно от лекуващия лекар и самия болен, като ежегодно трябва да се преценява дали тази цел ще остане занапред или ще трябва да се осъвремени при настъпили промени в здравето на болния и в начина му на живот. Стриктният гликемичен контрол понастоящем означава строго придържане към оптималната индивидуална стойност на  $HbA_{1c}$  чрез подходящ индивидуален терапевтичен план на лечението. За да има добро здраве и дълъг живот, обаче, болният от ЗД тип 2 трябва да има добър контрол не само на гликемията, но и на другите рискови сърдечно-съдови фактори.

1. Inzucchi S E, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al. Medical treatment of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-oriented approach: position statement of American Diabetes Association (ADA) and European Association for the study of diabetes (EASD). *Diabetes Care* 2012; 35, 6: 1364-1379.
2. **Standarts of medical care in diabetes – 2014**, American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2014; 37, Suppl.1: S14-S80.
3. **International Diabetes Federation**, Guideline for management of postmeal glucose in diabetes, 2012; [http:// www. idf. org/2011-guideline](http://www.idf.org/2011-guideline).
4. Hsu WC, Boyko EJ, Fujimoto WY, Kanaya A, Karmally W, Karter A, King GL, et al. Pathophysiologic differences among Asians, native Hawaiians and other islanders and treatment implications. *Diabetes Care* 2012; 35: 1189-1198.
5. Virkamaki A, Saltevo J. Finnish current guidelines for diabetes: interactive approach to improve individualised treatment. *Diabetologia* 2011; 54, 5: 1264-1265.
6. Ceriello A, Gallo M, Armentano V, Perriello G, Gentile S, De Micheli A. Personalizing treatment in type 2 diabetes: a self-monitoring of blood glucose inclusive innovative approach. *Diabetes Technol Ther* 2012; 14,4: 373-378.
7. **Italian Association of Medical Diabetologists**, AMD, 29 May 2012, <http://www.aemmed.it/algorithm/>.
8. Georgiev B. How we treat patients with coronary heart diseases. *Nauka Kardiologia* 2013; 14: 202-207 (In Bulgarian). (Георгиев, Б. Как лекуваме болните с доказана коронарна болест на сърцето, *Наука Кардиология* 2013; 14: 202-207).
9. Lee S J. So much insulin, so much hypoglycemia, *JAMA Intern. Med published on-line*, March 10, 2014.
10. Patrick AR. Trends in insulin initiation and treatment intensification among patients with type 2 diabetes. *J General Intern Med, Publ. on-line*, September 16, 2013.
11. Pham S, , Pham P-TT, ChiltonR. Glycemic control in type 2 diabetes: The tighter the better? *Clinical Diabetes* 2013; 31, 1: 25-27.
12. Finucane TE. The dogma of „tight control“ beyond the limits of evidence. *Arch Intern Med* 2006; 166(15): 1672.
13. Geller AJ, Shehab N, Lovegrove MC, Kegler SR, Weidenbach KN, Ryan GJ, Budnitz DS. National estimates of insulin-related hypoglycaemia and errors leading to emergency department visits and hospitalizations, *JAMA Intern Med* 2014, *Publ online*, doi: 10.1001/jamainternmed.2014.136.
14. Finucane TE „Tight control“ in geriatrics: the Emperor wears a thong, *J Amer Geriatr Soc* 2012; 650 (8): 1571-1575.
15. Hemmingsen B, Christensen LL, Wetterslev J, Vaag A, Gluud C, Lund SS, Almdal T. Comparison of metformin and insulin versus insulin alone for type 2 diabetes: systematic review of randomized clinical trials with meta-analysis and trial sequential analysis. *Brit Med J* 2012; 344 : e1771.
16. Lipska KJ, Krumholz HM. Comparing diabetes medications. Where do we set the bar? *JAMA Intern Med* 2014; 174 (3): 317-318.
17. Esposito K, Maiorino MI, Bellastella G, Giugliano D. New guidelines for metabolic targets in diabetes : clinician’s opinion does matter. *Endocrine* 2014 Feb 18. [Epub ahead of print]

## Address for correspondence:

**Проф. Драгомир Коев,**

Медицински Център „Клиника професор Коев-Ви“, гр. Варна 9002, ул. „Селиолу“ 34,  
E-mail: dragokoev@gmail.com

**Prof. Dragomir Koev,**

Medical Centre „Professor Koevi Clinic“  
Adress: Varna 9002, 34 Seliolu Str.  
E-mail: dragokoev@gmail.com

## Нискодиференциран, неанапластичен дифузен тиреоиден карцином в съчетание с тиреоидит на Хашимото

К. Христов<sup>1</sup>, М. Бъчварова<sup>1</sup>, Е. Хаджиева<sup>1</sup>, Б. Балева<sup>2</sup>, И. Красналияев<sup>3</sup>, П. Арнаудов<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Клиника по ендокринология, <sup>2</sup>Категра по образна диагностика, <sup>3</sup>Категра по обща и клинична патология, <sup>4</sup>Категра по хирургични болести, УМБАЛ „Св. Марина“, Варна

### Резюме

Описан е случай на ниско-диференциран тиреоиден карцином, замаскиран от тиреоидит на Хашимото. Касае се млада жена с бързопрогресираща задых и затруднено преглъщане. От преди 1 мес. е с новодиагностициран хипотиреоидизъм свързан с тиреоидит на Хашимото (TSH 104 mIU/l, TPO-Ab > 1500) и е започнато заместително лечение с левотироксин. От същото време е лекувана за лумбална дископатия без съществен ефект. Независимо от провежданото лечение щитовидната жлеза нараства, заедно с проявите на диспнея и дисфагия. Преди 3 год. при пациентката е установен карцином на шийката на матката и е проведена конизация. От проведеното УЗ изследване се установи двустранно увеличение на щитовидната жлеза, с дифузна хипоехогенност без огнищни промени; двустранно

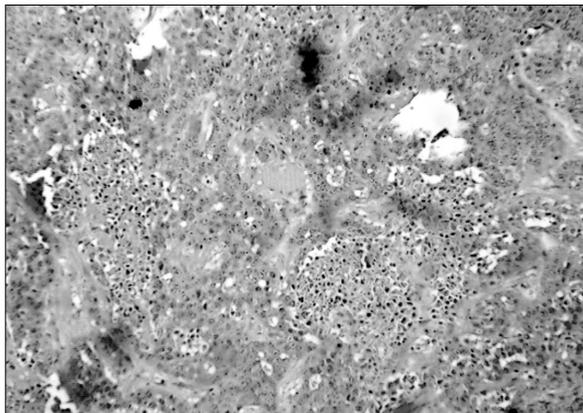
наличие на патологични лимфни възли и тромбоза на лявата югуларна вена. КТ изследване доказва ателектаза на десен горен белодробен дял, паренхимна маса в десен хилус, с недове отграничени очертания, пакети от лимфни възли медиастинално, чернодробни метастази, бъбречни метастази, гръбначни метастази, метастаза в десен яйчник и матката. Проведената ТАБ на щитовидна жлеза от няколко места установи малигнена цитологична категория без категоричност за първичния произход на промените в щитовидната жлеза. Бяха обсъдени първичен белодробен карцином с множествени органни метастази; карцином на шийката на матката с метастазиране; първичен тиреоиден карцином с метастазиране. Хистологичното и имунохистохимичното изследване на чернодробна тъкан взета по време на поставяне на гастростома доказва ниско-диференциран тиреоиден карцином.

**Ключови думи:** нискодиференциран, неанапластичен дифузен тиреоиден карцином, тиреоидит на Хашимото

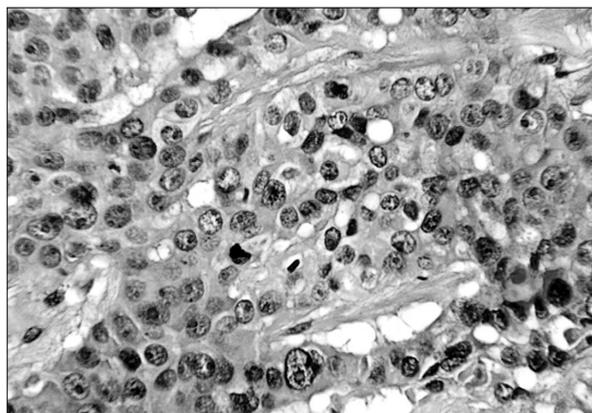
Хистологичното изследване от чернодробна тъкан, взета по време на поставяне на гастростома, установи добре отграничена туморна формация от разраснали гнезда и повлекла от атипични клетки с уголемени везикуларни ядра и плътна еозинофилна цитоплазма, множество атипични митози, наличие на зони с централни некрози и сквамозна диференциация (Фиг. 8). Имунохистохимично туморните клетки експресират TTF1(+), Galectin -3(+). (Фиг. 9).

**Фигура 8.** Хистологично изследване:

а) ХЕ – недиференциран епителен тумор с огнища на некроза.



б) ХЕ – недиференциран епителен тумор.



## Обсъждане:

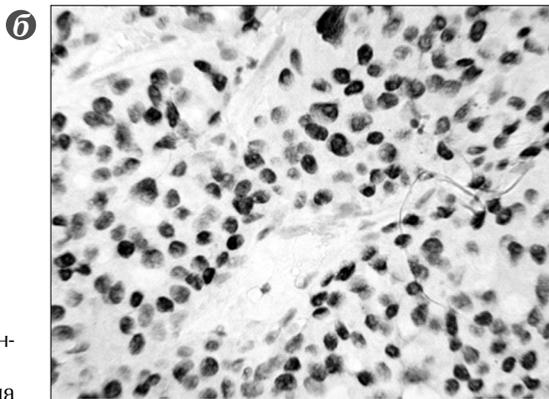
**Касае** се за жена на 37 год., която на фона на тиреоидит на Хашимото (TSH - 104 mIU/l; TPO Ab > 1500) с неясна давност развива нискодиференциран, неанпластичен дифузен тиреоиден карцином. Заболяването е много рядко, с бърза прогресия и разпространение на множествени метастази в цялото тяло, с фатален изход в рамките на няколко месеца. Световната здравна организация (2004 г.) го определя като фоликуларно-клетъчна неоплазма, която показва ограничени белези на фоликуларна диференциация и като морфология и клинично протичане, се разполага между диференцираните карциноми (фоликуларни и папиларни) и недиференцирания (анпластичен) карцином (3, 5).

Тази дефиниция акцентуира върху два важни момента: загубата на диференциация – неглангуларен, солиден, трабекуларен или инсуларен строеж и белези за високостепенна малигненост с наличие на некрози и висока митотична активност (1). На международната конференция в Торино (2006 г.) е постигнат консенсус за морфологичните критерии за диагностицирането на ниско диференцирания карцином на щитовидната жлеза: (1) солиден/инсуларен растеж; (2) липса на конвенционални нуклеарни промени, характерни за папиларния карцином; (3) наличие на поне едно от следните – а) конвулирани ядра, б) три или повече митози на 10 HPF и в) некрози (2, 4).

Описаният от нас тумор отговаря на споменатите по-горе хистологични критерии – солиден и трабекуларен строеж, висока митотична активност и некрози. Имунохистохимичното изследване и в частност имуноекспресията на Galectin-3 потвърди тиреоидния произход на метастазирания в черния гроб тумор.

Развитието на заболяването беше с неясно начало, на фона на скоро диагностициран тиреоидит на Хашимото, който го голяма степен е замаскирал ехографската находка (липса на огнищни/възлестни промени в паренхима на жлезата). Болките в поясна област, погрешно интерпретирани като дископатия, са били късна клинична изява на разпространеното заболяване. Наличието на известен малигнен процес – карцином на шийката на матката поведе началното диагностично мислене, но впоследствие произхода на метастазирание беше уточнен. За ехографската находка водеща беше патологичната лимфаденопатия при липса на ясно отграничени огнищни промени в тиреоидния паренхим, който беше дифузно хипоехогенен както при тиреоидит на Хашимото. За цялостната интерпретация на резултатите допринесе много и цитологичното изследване (папиларен строеж и макар и с единични интраядрени псевдоключвания) – белези, които липсват в метастатичния тумор, факт който сме склонни да интерпретираме като загуба на диференциация. Цитоморфологично категорично беше отхвърлено наличието на малигнен лимфом.

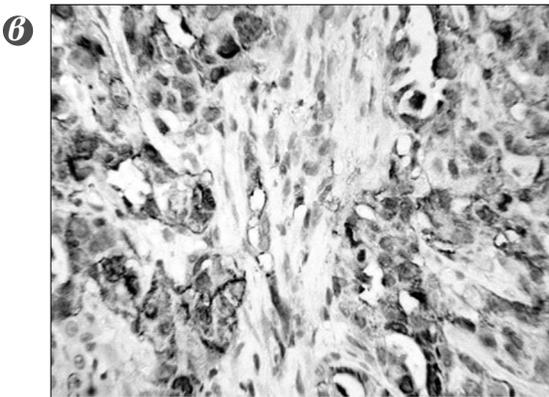
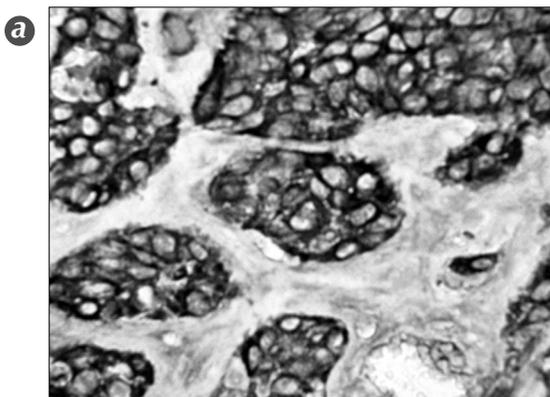
Изненадваща беше липсата на цитологични критерии за тиреоидит на Хашимото (въпреки данните от серологичното и хормонално изследване), обяснение за което може да бъде дифузната инфилтрация на щитовидната жлеза от малигнените клетки. Описаният случай е пример за маските на тиреоидита на Хашимото и асоциацията му с карцинома на щитовидната жлеза.



**Фигура 9.** Имунохистохимично изследване:

- а) CK7 – цитоплазматична и мембранна имуноекспресия
- б) TTF1 – положителна ядрена имуноекспресия
- в) Galectin 3 – положителна ядрена, цитоплазматична и мембранна имуноекспресия.

**Заключение:** морфологична картина на метастаза в черния гроб от ниско-диференциран тиреоиден карцином.





## Poorly Differentiated, Nonanaplastic Diffuse Thyroid Cancer in Combination with Hashimoto's Thyroiditis

K. Hristozov<sup>1</sup>, M. Bachvarova<sup>1</sup>, E. Hadzhieva<sup>1</sup>, B. Balev<sup>2</sup>, I. Krasnaliev<sup>3</sup>, P. Arnaudov<sup>4</sup>  
„St. Marina“ University Hospital, Varna, <sup>1</sup>Clinic of Endocrinology, <sup>2</sup>Clinic of Radiology,  
<sup>3</sup>Clinic of Pathology, <sup>4</sup>Surgery clinic

### Abstract

This case is about a young woman presenting with progressive dyspnea and difficulty swallowing, who was eventually diagnosed with a poorly differentiated diffuse thyroid cancer in combination with a Hashimoto's thyroiditis. One month prior to admission a levothyroxine substitution therapy had been started because of a newly diagnosed hypothyroidism due to Hashimoto's thyroiditis (TSH 104 mIU/l and TPO Ab > 1500). The thyroid gland continuously enlarged over time despite the treatment. At that time she had been hospitalized and treated for low back pain without significant relief. Her past medical history includes cervical cancer, followed by conization of the cervix three years ago. On admission to the hospital, the thyroid ultrasound revealed an enlarged thyroid gland with a

diffuse hypoechoic echotexture and no evidence of distinct thyroid nodules, bilateral cervical lymphadenopathy, considered pathologic, and thrombosis of left jugular vein. CT scan findings included right-upper pulmonary lobe atelectasis, parenchymal mass in the right pulmonary hilus with ill-defined margins, mediastinal lymph nodes forming into groups, metastases in the liver, kidneys and spine, as well as a metastasis in the uterus and the right ovary. FNA of multiple thyroid areas showed a malignant cytologic category but could not clarify the nature of the malignant process. The differential diagnosis included primary pulmonary carcinoma with multiple organ metastases, cervical metastatic carcinoma and primary thyroid carcinoma with metastases. The histological and immunohistochemical analysis of a liver lesion proved a poorly differentiated diffuse thyroid cancer.

**Key words:** Poorly Differentiated, Nonanaplastic Diffuse Thyroid Cancer, Hashimoto's Thyroiditis

**Case history:** On October 3, 2013, a 37-year-old woman, who has given birth to her second healthy child in February 2013, was admitted to the hospital with a 1-week history of difficulty breathing and swallowing, neck swelling and voice change. In order to exclude a malignant tumor (lymphoma, pulmonary neoplasm, thyroid gland neoplasm), she was referred to UMBAL „St. Marina“ on October 8, 2013, for diagnostic clarification. A whole-body computed tomography scan revealed a very large mixed goiter. The right lobe of the thyroid was enlarged, with an ill-defined hypodense zone in it. The lobe dislocated the large vessels of the neck to the right and caused a proximal-segment stenosis of the internal jugular vein. The maximal axial dimensions of the zone were 48/40 mm and cervical lymphadenopathy was present as well. Additionally, right-upper pulmonary lobe atelectasis, parenchymal mass in the right pulmonary hilus with ill-defined margins, mediastinal lymph nodes forming into groups, metastases in the liver, kidneys and spine, as well as a metastasis in the uterus and right ovary were described on the CT (Fig. 1, 2, 3).

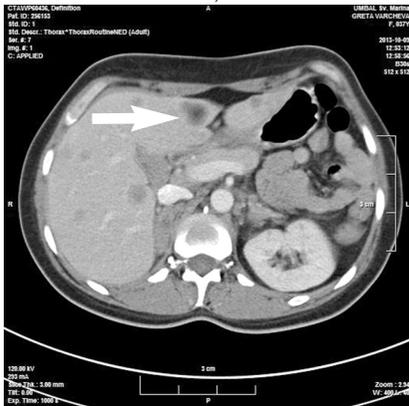
In September 2013 the patient had presented with a swelling in the neck area and a hoarse voice; she had been diagnosed with hypothyroidism due to Hashimoto's thyroiditis (TSH 104 mIU/l and anti-TPO Ab > 1500) and treatment had been started with levothyroxine 50 mcg/day. At that time she had been hospitalized and treated for low back pain, assessed as degenerative lumbar disk disease. A subacute thyroiditis had been suspected on the basis of neck pain and elevated CRP and ESR level, and a short-term therapy with GCs was started.

**Past medical history:** In June 2010 cervical cancer had been diagnosed, followed by conization of the cervix. Regular examinations by a gynecologist showed no evidence of local recurrence or metastases.

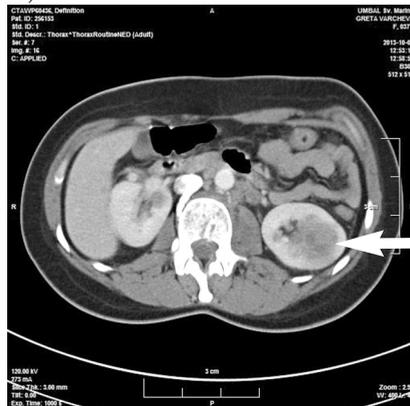
**Physical examination:** On physical examination, the patient was a normosthenic white middle-aged woman, afebrile, severely distressed. Examination of her neck revealed jugular venous distention and a diffusely enlarged hard thyroid gland, tender on palpation. There was local lymphadenopathy - enlarged lymph nodes in the occipital area and along the posterior border of the sternocleidomastoid muscle, firm to palpation, some of them arranged into groups. The vital sign evaluation revealed normal heart sounds, regular heart rate about 100 bpm, blood pressure of 90/60 mm Hg. Diminished, almost absent breathing sounds over the right upper lung field were noted on chest auscultation. Examination of the abdomen and lower extremities was basically unremarkable.

**Laboratory evaluation:** Laboratory testing revealed a hemoglobin measurement of 121 g/l, Hct 35, Leu 13,8, Er 4,5, Tr 308, an increased C-reactive protein level- 91,7mg/l, sodium level of 141 mmol/l, potassium level of 4,4 mmol/l, chlorides 103 mmol/l, BUN 6,9 mmol/l, creatinine 75 mcmmol/l, blood glucose 5,5 mmol/l, ASAT 31 U/l, ALAT 40 U/l, PI 80%, INR 0,91. Laboratory investigation of thyroid function showed an elevated thyroid stimulating hormone: TSH 25 mIU/l (on therapy with L-thyroxine 50 mcg/day) and positive thyroid peroxidase antibodies: TPO Ab > 1500. Arterial blood gas on room air showed a pH of 7,41, a partial carbon dioxide pressure (pCO<sub>2</sub>) of 5,36 kPa, a partial oxygen pressure (pO<sub>2</sub>) of 9,12 kPa, BE 0,7 mmol/l, sO<sub>2</sub> 94%. The urinalysis revealed single leucocytes in the urine sediment.

Figure 1. CT of the abdomen:  
a) liver metastasis



b) renal metastasis



c) spinal metastasis

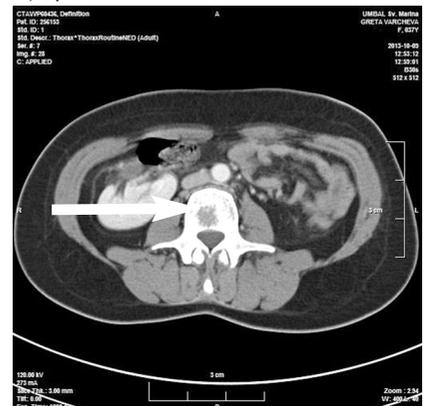
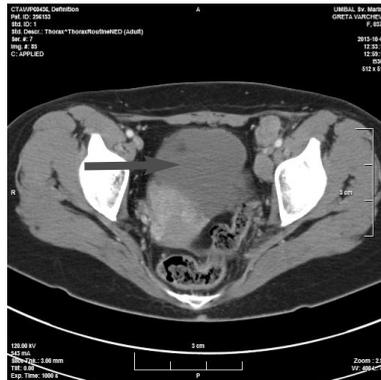


Figure 2. Pelvic and thoracic CT images:

a) ovarian metastasis



b) uterine metastasis



c) right upper pulmonary lobe atelectasis



Figure 3. A neck CT scan: A hypodense zone (40/48mm) with poorly defined margins, enlarged right thyroid lobe, displacing the vascular bundle to the right and causing a proximal stenosis of the internal jugular vein is evident. Bilateral lymphadenomegaly (submandibular, supraclavicular, posterior to the jugular vein and the carotid artery, in the posterior triangle of the neck) with size up to 17/18 mm is seen.



Thyroid gland ultrasonography: Enlarged left lobe of the thyroid gland with heterogenous hypoechoic micronodular echotexture; laterally and under the lower pole of the left thyroid lobe, rounded pathologic avascular lymph nodes are seen, some of them forming into groups, causing jugular vein occlusion. (Fig. 4)

**Figure 4.** Left thyroid lobe ultrasound (longitudinal scan)



The right thyroid lobe has similar ultrasound characteristics. While some areas show marked hypoechoic structure, there is no evidence of distinct thyroid nodules. Adjacent lymph nodes with suspicious US features of malignancy are visible (**Fig. 5**)

**Figure 5.** Right thyroid lobe ultrasound (longitudinal scan)



The thyroid isthmus is enlarged (anterior-posterior diameter >20mm) with heterogenous hypoechoic structure and adjacent pathologic lymph nodes (**Fig. 6**)

**Figure 6.** Thyroid isthmus ultrasound (transverse scan).

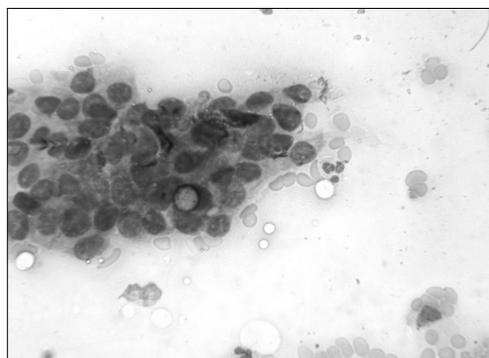
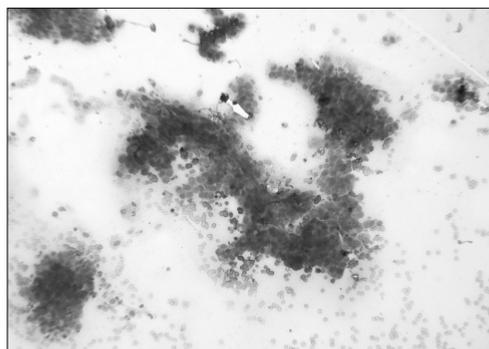
An FNA from both thyroid lobes and the isthmus was performed and the results showed malignant cytologic category: marked cellularity, papillary clusters with well-defined margins and single intranuclear pseudoinclusions. It was difficult to differentiate between primary thyroid carcinoma and metastasis on cytological grounds (**Fig. 7**).



**Figure 7.** FNA cytology morphology:

a) marked cellularity, papillary clusters

b) single intranuclear pseudoinclusions

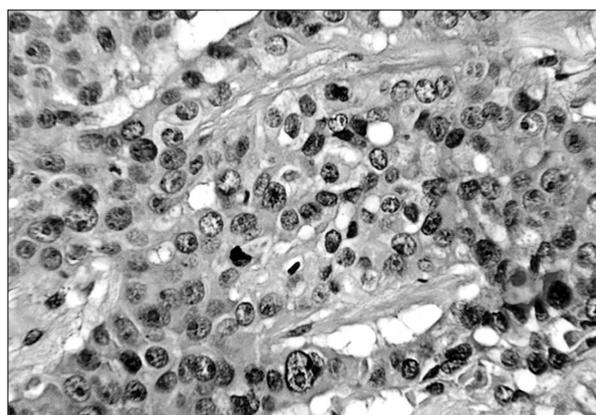
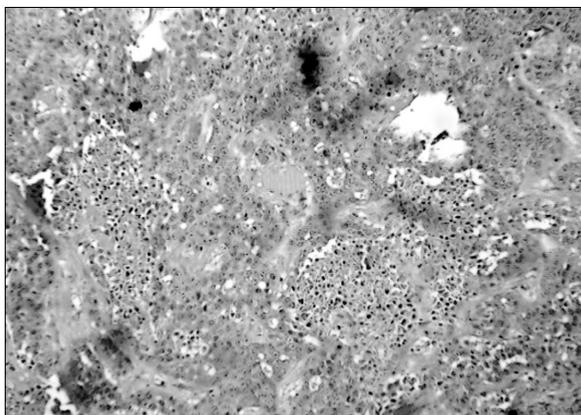


A gastrostoma was inserted to the patient and meanwhile liver tissue was excised. The histological result showed a tumor with distinct border, composed of atypical cells forming sheets and nests, with enlarged vesicular nuclei and solid eosinophilic cytoplasm. Multiple atypical mitoses could be seen as well as areas with central necrosis and squamous differentiation (**Fig. 8**). Immunohistochemical analysis was performed and the tumor cells were positive for TTF1 (+), Galectin-3 (+) (**Fig. 9**).

**Figure 8.** Histological examination:

a) HE stain-undifferentiated epithelial tumor with areas of necrosis

b) HE stain-undifferentiated epithelial tumor



## Discussion

This case describes a 37-year-old woman with poorly differentiated, nonanaplastic diffuse thyroid cancer coexisting with Hashimoto's thyroiditis (TSH – 104 mIU/l; TPO Ab > 1500). This is a very rare disease with a rapid progression and dissemination of multiple metastases throughout the body, which usually has a fatal outcome in several months. The world health organization (2004) defines the disease as follicular thyroid cancer, which has few features of follicular differentiation. It takes an intermediate position between the well differentiated neoplasms (follicular and papillary) and the non-differentiated (anaplastic) carcinoma (3, 5).

There are two major aspects in this definition: loss of differentiation – nonglandular components with a solid, trabecular or insular growth pattern, and features of high-grade malignancy – necrosis and high mitotic activity (1). A consensus meeting was held in Turin, Italy, where an agreement was reached concerning the diagnostic criteria for poorly differentiated thyroid carcinoma. These include (1) presence of a solid/trabecular/insular pattern of growth, (2) absence of the conventional nuclear features of papillary carcinoma, and (3) presence of at least one of the following features: convoluted nuclei; mitotic activity > or = 3 x 10 HPF; and tumor necrosis (2, 4).

The tumor described in this case report has the mentioned above histological criteria – solid and trabecular growth pattern, tumor necrosis and high mitotic activity. The immunohistochemical analysis and in particular the expression of Galectin-3 confirmed the thyroid origin of the metastatic liver lesions.

The disease described had an unclear onset, partly because of its combination with Hashimoto's thyroiditis,

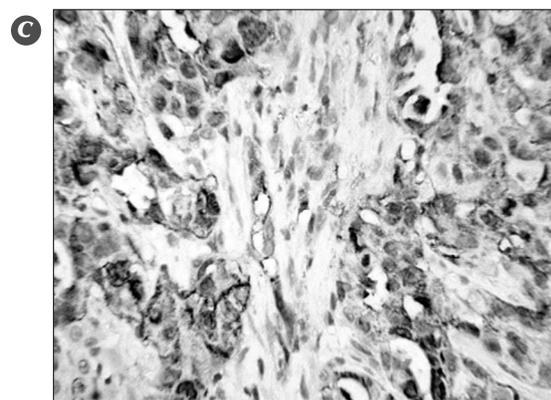
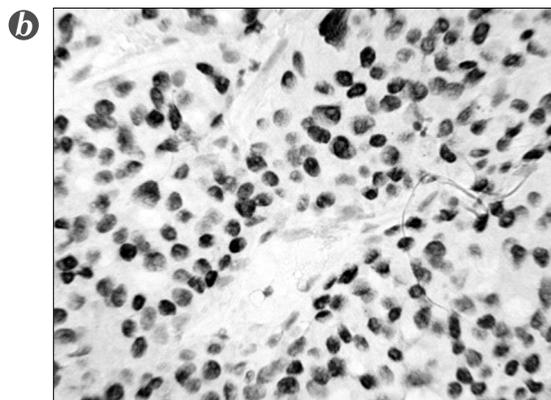
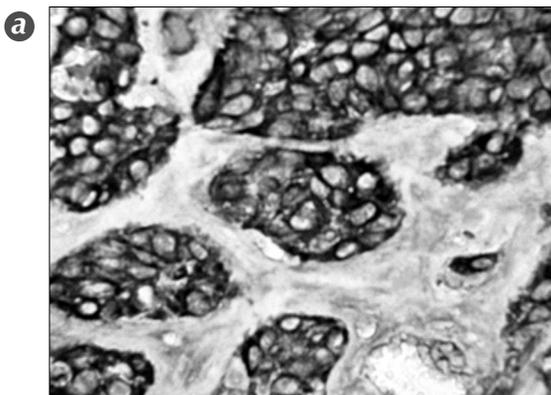
which made the thyroid ultrasonography hard to interpret (lack of thyroid nodules). The symptoms of low back pain, wrongly diagnosed as degenerative lumbar disc disease, were due to spinal metastases. The past medical history of cervical cancer misled the initial diagnostic process, but thereafter the primary origin of the metastatic disease was revealed. The cornerstone in the thyroid ultrasound exam was the pathologic cervical lymphadenopathy. The parenchyma of the gland was diffusely hypoechoic, typical of Hashimoto's disease, without distinct nodules. The FNA cytomorphology (papillary clusters, single intranuclear pseudoinclusions) was of great importance as well, absolutely rejecting the diagnosis of malignant lymphoma. The lack of these features in the metastatic tumor was probably due to loss of differentiation. As a matter of fact, there were no cytological criteria of Hashimoto's disease (though confirmed with serology and hormonal testing) probably due to the diffuse infiltration of the thyroid gland with malignant cells.

This case reveals the clinical masks of Hashimoto's disease and its possible association with thyroid cancer.

**Figure 9.** Immunohistochemistry (IHC):

- a) CK7 – cytoplasmic and membrane immune expression;
- b) TTF1 – positive nuclear immunoeexpression;
- c) Galectin 3 – positive cytoplasmic, nuclear and membrane immunoeexpression

**Conclusion:** morphological features suggestive of liver metastasis from poorly differentiated thyroid cancer



## References

1. **Rosai J.** Poorly differentiated carcinomas of the thyroid: introduction to the issue, its landmarks, and clinical impact. *Endocr Pathol.* 2004; 15:293-296.
2. **Volante M, Collini P, Nikiforov YE, et al.** Poorly differentiated thyroid carcinoma: the Turin proposal for the use of uniform diagnostic criteria and an algorithmic diagnostic approach. *Am J Surg Pathol* 2007; 31:1256-1264
3. **Sobrinho Simoes M, Albores-Saavedra J, Tallini G, Santoro M, Volante M, Pilotti S, Carcangiu ML.** Poorly differentiated thyroid carcinoma. WHO Classification of Tumors-Pathology and Genetics, Tumors of Endocrine Organs, IARC Press, Lyon (France), 2004,73-76.
4. **Asioli S, Erickon LA, Righi A, Jin L, Volante M, Jenkins S, Papotti M.** Poorly differentiated carcinoma of the thyroid: validation of the Turin proposal and analysis of IMP3 expression. *Mod Pathol* 2010; 23:1269-1278.
5. **Akslen LA, Li Volsi V.** Poorly differentiated thyroid carcinoma- it is important ( letter to the editor). *Am J Surg Pathol* 2000; 24:310.
6. **Volante M, Papotti M.** Poorly differentiated thyroid carcinoma: 5 years after the 2004 WHO classification of endocrine tumours. *Endocr Pathol* 2010; 21:1-6.

### Address for correspondence:

**Проф. г-р Кирил Христовов,**  
Клиника по ендокринология,  
УМБАЛ „Св. Марина“, гр. Варна 9002  
E-mail: k. hristozov@abv.bg

**Prof. K. Hristozov,**  
„St. Marina“ University Hospital, Varna  
Varna 9002  
E-mail: k. hristozov@abv.bg

# Българско дружество по ендокринология *Bulgarian Society of Endocrinology*

**Списание**  
**ЕНДОКРИНОЛОГИЯ** ISSN 1310-8131

**Journal**  
**ENDOCRINOLOGIA** ISSN 1310-8131

### Адрес на редакционната колегия:

Клиничен център – УСБАЛЕ  
„Акад. Иван Пенчев“ ул. „Здраве“ №2, 1431  
София;  
Проф. Мария Орбецова, Главен редактор  
тел. (02) 985 6001; факс (02) 987 4145;  
Мобилен: 0887771322 (Орбецова),  
E-mail: morbetzova@abv.bg

### Editorial Board address for correspondence:

Clinical Center of Endocrinology  
„Acad. Iv. Penchev“, University Hospital 2,  
Zdrave Str., 1431 Sofia, Bulgaria;  
Prof. Maria Orbetzova, *Editor in Chief*  
Tel (+359) 2-895 6001; Fax C 2-987 4145;  
Mobile (+359) 0887771322 (Orbrtzova),  
E-mail: morbetzova@abv.bg

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

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

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

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

The manuscripts should be submitted initially in Bulgarian (for materials from abroad – in English) as MS Word.doc files, formatted in 12 pt. Times New Roman typeface. The manuscript is then checked for compliance with the edition's requirements and sent to the reviewers. If accepted for publication after the review, the authors are

(за чуждестранните материали – на английски език). След рецензиране и приемане за печат в срок до 3 седмици окончателният вариант се предоставя с превод на английски език (с изключение на обзорите) на e-mail на главния редактор с придружително писмо на адреса на редакцията, подписано от авторите, с което потвърждават съгласието си за участие и декларират, че материалът не е отпечатван в други научни списания, освен като резюме на съобщение, изнесено на научен форум.

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

Структурата на статиите трябва да отговаря на следните изисквания:

#### **Титулна страница**

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

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

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

#### **Резюме**

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

#### **Основен текст**

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

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

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

#### **Title page**

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

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

c. Address of the corresponding author in Bulgarian and English language – name, postal address (business or home as preferred), phone number, fax number, email address.

#### **Abstract**

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

#### **Main text**

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

#### **Tables and figures**

Each table should be on a separate page after the bibliography with the table caption preceding

поясени в текста при първата им поява. За мерните единици е задължителна международната система SI. Цитатите вътре в текста се отбелязват само с номерата им в книгописа, оградени с малки скоби.

### Таблицы и илюстрации

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

### Книгопис

Книгописът се представя на отделна страница. Броят на цитираните източници е препоръчително да не надхвърля 25 (за обзорните статии 40) като следва да включва актуални източници от последните 5 години, както и публикации от български автори, работили по съответния проблем. Подредането на източниците да става по реда на поява в текста. Книгописът се оформя съгласно Унифицираните изисквания за публикации в областта на биологията и медицината и е опростена версия на стил Ванкувър (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3142758/>). Всички автори се отбелязват с фамилно име, последвано от инициалите. При повече от шест автори, след шестия се поставя et al. Следва цялото заглавие на цитираната статия (с главна буква е само началната дума), название на списанието изписано съкратено според Index Medicus, година, том, брой на книжката в малки скоби (незадължителен при издания с непрекъснато

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

### References

The references should be presented on a separate page at the end of the manuscript. It is recommended that the number of references should not exceed 25 titles for original research articles and 40 titles for the reviews. It is advisable that sources on the topic from the recent five years be used. The references are listed in their order of first appearance in the text. They should follow the Vancouver format and the Uniform requirements (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3142758/>). All authors should be listed for papers with up to six authors; for papers with more than six authors, the first six only should be listed, followed by et al. The authors are followed by the full title of the paper (Only the first word is capitalized). The journal title is abbreviated in conformity with the latest edition of Index Medicus, followed by year, volume, issue in parentheses (not necessary for periodicals with a continuous pagination throughout the volume) and full first and last page. Chapters of books are cited in the same way, the full name of the chapter first, followed by „In:“, full title of the book, editors, publisher, town, year, first and last pages of the cited chapter.

### Examples

#### Reference to a journal article:

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

#### If the original cited paper is in Bulgarian:

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

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

### Примери:

#### Статия от списание:

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

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

#### Глава (раздел) от книга:

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

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

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

### References to a book chapter:

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

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

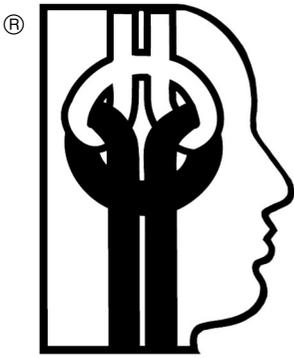
### Address for sending the manuscripts and other editorial correspondence

#### Editorial Board Address for Correspondence:

Clinical Center of Endocrinology,  
„Acad. Iv. Penchev“, University Hospital, 2  
Zdrave Str., 1431 Sofia, Bulgaria;  
Prof. Maria Orbetzova, *Editor in Chief*  
Tel (+359) 2-895 6001; Fax 02-987 4145;  
Mobile (+359) 887771322  
E-mail: morbetzova@abv.bg

#### Адрес на редакционната колегия:

Клиничен център – УСБАЛЕ,  
„Акад. Иван Пенчев“  
ул. „Здраве“ №2, 1431 София;  
Проф. Мария Орбецова, *Главен редактор*  
тел. (02) 985 6001; факс (02) 987 4145;  
Мобилен: 0887771322,  
E-mail: morbetzova@abv.bg



# ЕНДОКРИНОЛОГИЯ

# ENDOCRINOLOGIA

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

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

**Главен редактор**

Проф. д-р Мария ОРБЕЦОВА, гм

**Редактор на английския текст**

Д-р Александър ШИНКОВ

**Отговорен редактор**

Румен НИНОВ

**© Първа корица и графичен дизайн**

Румен НИНОВ

**Editor-in-chief**

Prof. Maria ORBETZOVA, MD PhD

**English language editor**

Alexander SHINKOV, MD

**Art director** Rumen NINOV

© **Cover&Design** Rumen NINOV

**Технически секретар**

Маргарита СЛАВЧЕВА

E mail: mora4a2@abv.bg

**Technical secretary**

Margarita SLAVCHEVA

E mail: mora4a2@abv.bg

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

- SCOPUS Elsevier Bibliographic Databases, Netherlands
- National Library of Medicine, Bethesda
- The Librarian Royal Society of Medicine, London
- WHO Health Organization Library, Geneva
- Academic National de medicine Bibliotheque, Paris
- Canadian Institute for Scientific and Technical Information, Ottawa
- ВИНТИ/РАН-МИННАУКЕ РОССИИ, Москва
- ДЕРЖАВНА НАУКОВА МЕДИЧНА БИБЛИОТЕКА, Киев

Списание „Ендокринология“  
се индексира в следните  
база-данни/ The journal  
„Endocrinologia“ is indexed by:

- SCOPUS Elsevier  
Bibliographic Databases (since  
2001)
- EMBASE
- Bulgarian Citation Index  
(since 1996)

**Адрес на редакционната колегия:** Клиничен център – УСБАЛЕ, „Акад. Иван Пенчев“ ул. „Зграбе“ №2, 1431 София; тел. (02) 985 6001; факс (02) 987 4145; Мобилен: 0887771322 (проф. Орбецова), email: morbetzova@abv.bg, Маргарита Славчева – технически секретар (mobile 0889 295884) email: mora4a2@abv.bg

**Editorial Board:** Clinical Center of Endocrinology „Acad. Iv. Penchev“ University Hospital 2, Zdrave Str., 1431 Sofia, Bulgaria; Tel (+0359) 2-895 6001; Fax C 2-987 4145; Mobile (+359) 0887771322 Prof. Maria Orbetzova; email: morbetzova@abv.bg, Technical Secretary – M. Slavcheva (mobile 0889 295884 ), email: mora4a2@abv.bg