



# ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ENDOCRINOLOGIA

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

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

**Гл. редактор:** Боян Лозанов  
**Научен секретар:** Филип Куманов

**Editor-in-Chief:** Bojan Lozanov (Sofia)  
**Scientific Secretary:** Philip Kumanov (Sofia)

**Редакционна колегия:**

А.-М. Борисова, Г. Дашев, Л. Дянков,  
С. Захаријева, Г. Кирилов, Д. Коев,  
К. Коприварова, Ив. Мендизов,  
М. Протич, Вл. Христов

**Editorial Board:**

А.-М. Borissova (Sofia), V. Christov (Sofia),  
G. Dachev (Sofia), L. Diankov (Sofia), G. Kirilov (Sofia)  
D. Koev (Sofia), K. Koprivarova (Sofia), I. Mendizov (Sofia),  
M. Protich (Sofia), S. Zakharijeva (Sofia)

**Редакционен съвет:**

П. Ангелова-Гатева, Б. Василева,  
Г. Кирилов, Л. Коева,  
Ал. Александров, М. Андреева,  
Н. Овчарова, Т. Сечанов,  
С. Симеонов, Ив. Цинликов

**Advisory Board:**

P. Angelova-Gateva (Sofia), G. Kirilov (Sofia),  
L. Koeva (Varna), Al. Alexandrov (Sofia),  
M. Andreeva (Sofia), N. Ovcharova (Sofia),  
T. Sechanov (Sofia), S. Simeonov (Plovdiv),  
B. Vasileva (Sofia), I. Tzinlikov (Pleven)

**Международен научен съвет:**

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

**International Scientific Board:**

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

Списание се индексира от:  
• ExtraMed (London)  
• Elsevier Science (Amsterdam)  
• Raymon Mulford Library (Ohio)  
• Български цитатен указател

ISSN 1310-8131

Списание

# ЕНДОКРИНОЛОГИЯ

том VII, кн. 3, 2002

## Съдържание

### Обзори

**Г. Кирилов, Б. Лозанов**

Клинико-лабораторна стратегия за преценка на тиреоидния статус ..... 4

**А. Томова, О. Косева, Ф. Куманов**

Инхибин - предсказаният хормон ..... 15

**М. Янева, С. Захариева**

Ектопични и абнормни хормонални рецептори при надбъбречната форма на синдрома на Кушинг ..... 28

**Здр. Абаджиева, Г. Кирилов, Ф. Куманов**

Надежден и лесно осъществим метод за преценка на биологично активния тестостерон ..... 36

**С. Владева**

Микроелементи и захарен диабет - реалности и надежди ..... 42

### Оригинални статии

**Ж. Бонева, Вл. Христов**

Оценка на ефекта на Reductil (Sibutramine hydrochloride) при лечение на пациенти със затлъстяване ..... 49

Указания за авторите ..... 56

Адрес на редакционната колегия: Специализирана болница за активно лечение по ендокринология, нефрология и геронтология „Акад. Иван Пенчев“  
ул. „Д. Груев“ №6, 1303 София; тел. (0359) (02) 987 7201; факс (0359) (02) 874 145  
Проф. Б. Лозанов – главен редактор, доц. Ф. Куманов – научен секретар  
<http://www.medicalnet-bg.org>

- ExtraMed (London)
- Elsevier Science (Amsterdam)
- Raymon Mulford Library (Ohio)
- Bulgarian Citation Index

## Journal

---

# ENDOCRINOLOGIA

---

vol. VII, number 3, 2002

## *Contents*

### Reviews

**G. Kirilov, B. Lozanov**

Clinical and Laboratory Strategy for Thyroid Status Assessment ..... 4

**A. Tomova, O. Koseva, Ph. Kumanov**

Inhibin - the Predicted Hormone ..... 15

**M. Yaneva, S. Zacharieva**

Ectopic and Abnormal Hormone Receptors in Adrenal Cushing's Syndrome ..... 28

**Z. Abadjieva, G. Kirilov, Ph. Kumanov**

A Reliable Simple Method of Bioavailable Testosterone Assessment ..... 36

**S. Vladeva**

Microelements and Diabetes Mellitus - Realities and Expectations ..... 42

### Original Articles

**Zh. Boneva, Vl. Christov**

Reductil (Sibutramine Hydrochloride) Effect in Treating Obese Patients ..... 49

**Instructions to Authors** ..... 56

## Клинико-лабораторна стратегия за преценка на тиреоидния статус

Г. Кирилов, Б. Лозанов

Клиничен център по ендокринология и геронтология  
Медицински университет - София

## Clinical and Laboratory Strategy for Thyroid Status Assessment

G. Kirilov, B. Lozanov

Clinical Center of Endocrinology and Gerontology  
Medical University - Sofia

### Резюме

Усъвършенстването на чувствителността и специфичността на биохимичните тиреоидни изследвания доведе до значимо подобряване на диагностичната и лечебната стратегия на тиреоидните заболявания. Целта на тази обзорна статия е да даде съвременна представа за възможностите и недостатъците на *in vitro* тиреоидните изследвания, които най-често се прилагат в клиничната практика. Независимо от съвременните методологични постижения все още употребяваните понастоящем тиреоидни тестове са със значителни различия и притежават някои технически недостатъци, които често изненадват лекарите. Подобни проблеми се предизвикват от нарушения в свързващите протеини, повлияващи резултатите на  $ST_4$ , тиреоглобулиновите автоантитела, които интерферират при серумното определяне на Tg, медикаменти или при тежки нетиреоидни заболявания, които са причина за неочаквани тиреоидни резултати. Поради това се препоръчва поддържане на активно сътрудничество между лабораторията и лекарите, за да

### Abstract

Improvements in sensitivity and specificity of biochemical thyroid tests account for considerable progress in clinical strategies for diagnosing and treating thyroid disorders. This is a survey paper designed to present an updated overview of the potentials and shortcomings of the *in vitro* thyroid tests most commonly used in clinical practice. Regardless of recent methodological progress along this line, current thyroid tests still exhibit wide variability and a number of technical drawbacks physicians are not infrequently unaware of. It is a matter of problems relating to binding protein abnormalities affecting the results of  $FT_4$  tests, thyroglobulin autoantibodies interfering with serum Tg measurements, medication, or severe nonthyroid diseases giving rise to unexpected results of thyroid tests. It is recommended to maintain active laboratory/physician team-work with a view to ensure that quality and cost-effectiveness of the analyses would be practically implemented in a logical sequence for assaying the results at variance, and gaining better insight into existing incompatibilities. Discrepan-

---

може качеството и икономическата ефективност на анализите да бъдат използвани в логична последователност за преценка на отклоняващите се резултати и изясняване на несъвпаденията. Необходимо е несъответствията да се интерпретират внимателно, като се използва колаборативният подход между лабораторията и лекарите.

---

**КЛЮЧОВИ ДУМИ:** тиреоидни изследвания, тиреоидни хормони, ТСХ, тиреоглобулин, тиреоидни автоантитела, калцитонин.

---

### **СОЦИАЛНА ЗНАЧИМОСТ НА ТИРЕОИДНИТЕ ЗАБОЛЯВАНИЯ**

Заболяванията на щитовидната жлеза се характеризират със значителна честота, сериозен увреждащ ефект върху здравето и качеството на живот, голям разход за диагностика и лечение и което е оптимистично - с висок процент на успешно лечение и ефективни възможности за превенция. Налице са високо ефективни подходи за лечение на хипертиреозидизма, хипотиреозидизма, нодозната гуша, тиреоидния карцином и йодния дефицит. Според наскоро публикувани данни от проучването за национално здраве и хранене (NHANES III) сред американската популация хипотиреозидизъм е намерен в 4,6%, от които 0,3% клиничен и 4,3% субклиничен хипотиреозидизъм, а хипертиреозидизъм имат 1,3% (0,5% клиничен и 0,7% субклиничен вариант) (10). Тиреоидните дисфункции допринасят за увеличаване на болестността от сърдечно-съдови и нервно-психични заболявания, особено сред възрастни и стари хора, повишават честотата на остеопороза, хиперлиппротеинемия, хиперхомоцистеинемия и атеросклероза (6, 11). При бременни наличието им е риск за нормалното протичане на бременността, а също и за развитието на плода и новороденото. Напоследък тиреоидните експерти лансират становището, че ранното откриване на тиреоидните нарушения чрез масов скрининг (ТСХ + ТПО-Ат), подобно на скрининга за неонатален хипотиреозидизъм, би имало значителен здравен ефект, който би оправдал изразходваните сред-

cies along this line should be interpreted with great caution against the background of close cooperation between laboratory and physicians.

---

**KEY WORDS:** thyroid tests, thyroid hormones, TSH, thyroglobulin, thyroid autoantibodies, calcitonin.

---

ства (8). По данни на Американската тиреоидна асоциация в САЩ годишният разход за рутинно изследване на тиреоидния статус възлиза на стотици милиони долари. Ето защо професионалното познаване на съвременните възможности и алгоритми за хормонална диагностика на тиреоидните заболявания е особено важно за своевременното им диагностициране и рефлектира пряко върху икономическата ефективност и разходите за диагностика.

### **ОСНОВНИ ПРИНЦИПИ В ХОРМОНАЛНАТА ДИАГНОСТИКА НА ТИРЕОИДНИТЕ ЗАБОЛЯВАНИЯ**

След въвеждане на първите радиоимунологични анализи (РИА) на тиреоидните хормони (ТХ) през последните 30 години е в ход непрекъснато усъвършенстване на чувствителността и специфичността на биохимичните тиреоидни изследвания, което доведе до забележителен прогрес в диагностичната стратегия и диагностика на тиреоидните заболявания (1, 2, 3). На съвременния етап разполагаме с широк спектър от методи, базиращи се на серумни измервания на концентрациите на циркулиращите общ тироксин и общ трийодтиронин ( $OT_4$  и  $OT_3$ ), на техните свободни фракции ( $CT_4$  и  $CT_3$ ), а също така и на свързващите ги протеини като тироксин-свързващ глобулин (ТСГ), транстиретин (ТТР), тироксин-свързващ преалбумин (ТСПА) и тироксин-свързващ албумин (ТСА). Особено голям напредък бе постигнат след въвеждане на ултрасензитивните анализи на хипофизния ти-

реотропин (ТСХ), с което стана възможно само чрез единично изследване на ТСХ да бъдат диагностицирани хипер- и хипотиреоидизъмът, включително и субклиничните им форми, респективно стадии на заболяванията. Серумното измерване на протеинния прекурсор на ТХ - тиреоглобулинът (Тг), се утвърди като единствен биохимичен туморен маркер за следоперативно мониториране на болните с диференциран тиреоиден карцином (ДТК) (2, 16), а калцитонинът - като 100% специфичен маркер за медуларния тиреоиден карцином (МТК).

Като изходна точка в хормоналната диагностика на тиреоидните заболявания се приема потвърденият наскоро физиологичен принцип, че всеки индивид има собствена неповторима тиреоидна функция, което е доказано чрез изследване на биологичните вариации на отделните тиреоидни показатели в продължение на едногодишен период при здрави лица (5).

Установяването на факта, че автоимунитетът е главна патогенетична причина за тиреоидните дисфункции доведе до създаване на чувствителни и специфични тестове за измерване на автоантитела към тиреоидната пероксидаза (ТПО-Ат), тиреоглобулина (Тг-Ат) и тиреотропиновите рецептори (ТРАт).

Известно е, че клиницистите се нуждаят от качествена лабораторна подкрепа, осигуряваща точната диагностика, необходима за икономически ефективното лечение на тиреоидните заболявания. За съжаление случаите, когато клиничното съмнение за това е очевидно и лабораторният тест има само утвърдителен характер, са по-редки в сравнение с мнозинството болни, които представят неубедителна клинична симптоматика, и само биохимичното изследване на тиреоидния статус е в състояние обективно и със сигурност да докаже, че пациентът е с тиреоиден проблем. Като типични примери ще посочим субклиничните варианти на хипер- и хипотиреоидизма, които могат да има атипична или моносимптомна клинична изява, особено при лица в напреднала възраст (4).

**Целта** на настоящата обзорна статия е да представи в синтезиран вид актуалната клинично-лабораторна информация върху съвременното състояние на проблема за лабораторната преценка на тиреоидния статус, съобразявайки се

със световните стандарти и съществуващите понастоящем ръководни насоки за *in vitro* тиреоидна диагностика.

## **ПРЕД-АНАЛИТИЧНИ ФАКТОРИ, ПОВЛИЯВАЩИ РЕЗУЛТАТИТЕ ОТ ТИРЕОИДНИТЕ АНАЛИЗИ**

Към най-съществените пред-аналитични фактори, които оказват значително въздействие върху *in vitro* анализа и последващата интерпретация на тиреоидните изследвания, се причисляват:

### **Физиологични величини**

- взаимоотношенията ТСХ/Т<sub>4</sub>
- демографски и генетични фактори
- хранене
- възраст
- бременност

### **Патологични фактори**

- нарушена функция на щитовидната жлеза
- чернодробни и бъбречни нарушения
- лекарствени средства
- системни заболявания

### **Причини, обусловени от кръвната проба**

Поради ограничения обем ще дискутираме само тези от тях, които са с най-голямо клинично-лабораторно значение. При нормална хипоталамо-хипофизна функция негативното feedback инхибиране от ТХ върху секрецията на ТСХ от хипофизата е причина за инверсната логаритмично-линейна (log/linear) взаимовръзка между серумните концентрации на СТ<sub>4</sub> и ТСХ. Незначителните отклонения в концентрацията на СТ<sub>4</sub> предизвикват експоненциално усилен отговор на ТСХ. Това означава, че в ранните фази на настъпваща тиреоидна дисфункция минималните промени върте в референтния диапазон на СТ<sub>4</sub> водят до сигнификантно патологично отклонение на серумния ТСХ, който по тази логика е многократно по-чувствителният и по-ранно реагиращият биохимичен параметър за детектиране на тиреоидната функция (10). Последната може да се прецени или директно чрез измерване на ТХ, или непряко посредством секрецията на ТСХ, която отразява биологичното (тъканно) действие на ТХ върху хипофизния ТСХ.

**Клинични ситуации, в които серумният ТСХ не отразява реалистично тиреоидния статус:**

- нарушена хипоталамо-хипофизна функция
- нестабилизирани тиреоидни статуси - в ранната фаза от лечението на първичния хипотиреоидизъм или при промяна дозировката на L-тироксина (6-8 седмици), а също и в първите месеци от лечението на хипертиреоидизма, когато ТСХ все още е потиснат
- ТСХ продуциращи хипофизни аденоми
- фармакологични агенти, влияещи върху секрецията на ТСХ - най-често бета-блокери и глюкокортикостероиди

От практическа гледна точка е важно да споменем, че референтният интервал на ТХ не се влияе сигнификантно от демографски и индивидуални фактори: пол, раса, сезони, фаза на менструалния цикъл, тютюнопушене, физическа активност, гладуване, веностаза и др. При бременност се повишава серумното ниво на ТСГ, достигащо максимум на 12-14-ата гестационна седмица, успоредно с нивата на  $OT_4$  и  $OT_3$ . През първия триместър  $CT_4$  слабо се повишава с кореспондиращо леко намаление на ТСХ, но стойностите му остават в нормалния интервал. С напредване на бременността  $CT_4$  леко намалява, а ТСХ остава нормално. Концентрацията на Тг нараства в хода на бременността, което е свързано с физиологичната тиреоидна хиперплазия, и се връща към нормалното си ниво на 6-8-ата седмица след раждане. Всички тиреоидни параметри (аналити) показват голяма междуиндивидуална вариабилност в сравнение с вътреиндивидуалната, която е стабилна (5). Това се отнася особено за серумния Тг, тъй като отделните индивиди имат различна маса на щитовидната жлеза и различен ТСХ статус (17). Най-променяща се е серумната концентрация на ТСХ. Това се дължи на краткотрайния полуживот на ТСХ (около 60 min), а също и на денонощните (ултрадианните и диурналните) флукутации, които не се отклоняват от нормалния референтен обхват на ТСХ (0,3-4,0 mIU/l). В някои проучвания е намерено (Wickham follow-up study), че лицата с нива на ТСХ > 2 mIU/l и присъствие на ТПО-Ат имат повишен последващ риск за развитие на хипотиреоидизъм (8). Тези данни ве-

роятно ще предизвикат ревизия на горната референтна граница на ТСХ, която ще бъде коригирана към по-ниски стойности. Физиологичните вариации обаче не оказват влияние върху диагнозата на тиреоидните заболявания и правят възможно вземане на кръвна проба за ТСХ по всяко време на деня при амбулаторно болни лица. Като се има предвид, че всеки индивид има собствен генетично зададен тесен референтен интервал на  $CT_4$  (genetic  $FT_4$  set point), тиреоидните експерти препоръчват архивиране резултатите за  $CT_4$  и ТСХ, даже и когато те са нормални, за да може в бъдеще да служат като индивидуални референтни стойности.

Като правило много медикаменти влияят както *in vivo*, така и *in vitro* върху тиреоидните изследвания, което може да обуслови погрешна диагностична интерпретация и да наложи допълнително тестване и в крайна сметка осъбяване на диагностичния процес. От практическа гледна точка трябва да се имат предвид следните най-често използвани медикаменти като: кортикостероиди, бета-блокери, допамин, фуросемид, фенитоин, карбамазепин, йодиди, амиодарон и литий. Например кортизоните препарати намаляват нивото на  $T_3$  и снижават ТСХ. Пропранололът блокира конверсията на  $T_4$  в  $T_3$  и води до повишение на ТСХ.

При пациентите с тежки нетиреоидни заболявания (НТЗ) съществуват патофизиологични предпоставки за промени в нивата на тиреоидните анализи, което затруднява тиреоидната диагностика и резултатите стават неинтерпретируеми. Най-характерно е преходното намаление на ТСХ в стойности, не по-ниски от 0,2-0,02 mIU/l.

**НАСОКИ И ПРЕПОРЪКИ  
ЗА ЛАБОРАТОРНО-МЕДИЦИНСКАТА  
ПРАКТИКА ЗА ДИАГНОСТИКА  
И МОНИТОРИРАНЕ  
НА ТИРЕОИДНИТЕ ЗАБОЛЯВАНИЯ**

- Препоръчва се, от гледна точка на рационалната и икономически изгодната алгоритмична диагностика, лабораториите да съхраняват на 4-8 °C всички серумни проби за тиреоидни изследвания най-малко до 1 седмица след изработването и съобщаването на резултатите, с цел лекарите да имат възможност за допълнител-

ни уточняващи назначения. Пробите за Тг при пациенти с ДТК следва да се съхраняват (архивират) най-малко за 6 месеца на  $-20^{\circ}\text{C}$ .

- При амбулаторни пациенти със стабилен тиреоиден статус, т. е. с нормално физиологично съотношение на  $T_4$  и ТСХ, ТСХ е по-чувствителният показател, сравнен със  $CT_4$ , за диагностициране на латентните (субклиничните) форми на хипер- и хипотиреоидизма.

- При амбулаторни пациенти с нестабилен тиреоиден статус е обратното -  $CT_4$  е диагностично по-надеждният анализ от ТСХ.

- При хоспитализирани болни комбинацията ТСХ +  $CT_4$  дава най-полезна и пълна информация. Обръща се внимание, че за тежко болни с НТЗ референтният интервал на ТСХ е значително разширен - от 0,05 до 10,0 mIU/l.

- Неочаквани резултати от тиреоидните изследвания, които са дискордантни на клиничното състояние, най-често се регистрират при централния хипотиреоидизъм, ТСХ-секретиращите хипофизни тумори, синдромите на резистентност към ТХ, наличието на хетерофилни миши антитела (НАМА), интерфериращи при *in vitro* анализите.

- При бременни с хипотиреоидизъм, които са на заместително лечение с  $L-T_4$ , тиреоидният статус трябва да се проверява с комбинацията ТСХ +  $CT_4$  най-малко на всеки тримесър.

- Като правило терапевтична цел на субституиращата терапия с  $L-T_4$  е поддържане на нива на ТСХ в границите 0,5-1,5 mIU/l. При болни с тежки сърдечно-съдови и системни заболявания ТСХ следва да се поддържа  $> 3,0$  до 6,0 mIU/l, т. е. в субклиничен хипотиреоидизъм.

- При пациенти с ДТК, които са на супресивна терапия с  $L-T_4$ , най-често 2,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  тегло, се цели субклинично хипертиреоидно ниво на ТСХ: 0,1-0,3 mIU/l. Възрастта и кардиологичният статус обаче винаги трябва да се имат предвид при определяне на дозировката.

- Преди започване на лечение с антиаритмика амиодарон, за който е известно, че предизвиква чести тиреоидни дисфункции - хипо- и хипертиреоидизъм, задължително трябва да се изследват ТСХ,  $CT_3$ ,  $CT_4$  и ТПО-Ат. На всеки три месеца се проследяват ТСХ,  $CT_3$  и  $CT_4$ .

- Най-често отклоненията в стойностите на  $OT_4$  и  $OT_3$  са резултат на нарушеното им свър-

зване с транспортните протеини - ТСГ и др. Прилагат се конкуритивни (РИА или алтернативни) или неконкуритивни ИМА. За анализа задължително се използва инхибитор като 8-анилинонафтален-сулфат (ANS), който блокира хормоналното свързване на ТХ със серумните протеини и с това се улеснява свързването му с анти тялото. Разликата в нормативния интервал за отделните методи за  $OT_4$  и  $OT_3$  се дължи на факта, че все още няма утвърдени международни референтни препарати за  $L-T_4$  и  $L-T_3$ . Приети са референтни стойности за  $TT_4$ : 55-160 pmol/l и за  $TT_3$ : 1,1-3,0 pmol/l.

### АНАЛИТИЧНИ МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА $CT_4$ , $CT_3$ И ТСХ

*Методите за определяне на  $CT_4$  и  $CT_3$  се подразделят на индиректни (индекс) методи ( $FT_4$ -index,  $FT_3$ -index), директни имуноаналитични техники и преки абсолютни измервания (18). За целите на тиреоидната диагностика у нас изключително се използват, поради лесно изпълнение и експресност, различните видове имуноанализи на свободните хормони - двойностъпални с белязан хормон/обратно титрационни, едностъпални с белязан хормон-аналог и методи с белязано анти тяло, подобни на ИМА. Последните са особено разпространени напоследък и се прилагат на автоматизираните имуноанализатори. Абсолютните директни методи с ултрафилтрационна техника намират приложение само в специализираните референтни лаборатории. Те са практически неприложими за клинични цели. Клиницистите трябва да са наясно, че макар и усъвършенствано, имуноаналитичното определяне на свободните фракции на  $T_4$  и  $T_3$  не измерва само свободния хормон. Тези методи в известна степен са зависими от свързващите протеини и точното им название напоследък се замени с термина "оценка за свободния хормон" (free hormone estimate -  $FT_4E$ ,  $FT_3E$ ). Референтните стойности за  $CT_4$  са 9-23 pmol/l, за  $CT_3$  - 3,5-7,5 pmol/l.*

*Методи за определяне на ТСХ. Единодушно е мнението, че най-важният критерий, по който се избира и оценява даден аналитичен метод за ТСХ, е неговата "функционална чувствителност", а не аналитичната, която фактически де-*

финира долната граница на чувствителност на анализа. Функционалната чувствителност се изчислява посредством 20%-ия коефициент на вариация на междуаналитично измерване (inter-assay). Препоръчва се на производителите на китове, които категоризират имунометричните методики като втора, респективно трета генерация ТСХ, да описват реалистичната функционална чувствителност, която трябва да бъде дефинирана самостоятелно и от лабораторията по утвърден протокол, като тя следва да се потвърди и от други аналогични лаборатории (1). Общоприето е, че за съвременната диагностика на тиреоидните дисфункции функционалната чувствителност на даден ТСХ метод трябва да бъде  $< 0,02 \text{ mIU/l}$ .

В алгоритъма на тиреоидните изследвания при амбулаторни пациенти самостоятелно определяне на ТСХ е на първа линия за доказване или отхвърляне на налична тиреоидна дисфункция (12, 13). Само ако ТСХ се отклонява от нормата, тогава на втори план идва в съображение  $СТ_4$ . При хипертиреозидизъм задължително се изследва  $СТ_3$  за изключване на  $T_3$ -токсикоза, а при хипотиреозидизъм се назначава ТПО-Ат за наличие на АТЗ.

### **КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНИ НЕСЪОТВЕТСТВИЯ ПРИ ТИРЕОИДНИТЕ ИЗСЛЕДВАНИЯ**

Тъй като комбинираното изследване на  $СТ_4 + ТСХ$  е най-рационално в алгоритъма за оценка на тиреоидния статус, по-долу се спират на най-честите клиничко-лабораторни противоречия ("странни тиреоидни резултати"), които се констатират в клиничната практика:

**Несъвпадение между  $СТ_4$  и ТСХ, където  $СТ_4$  е несъвпадащият параметър:**

1.  $СТ_4$  нормален-ТСХ повишен - най-често при субклиничния хипотиреозидизъм.

2.  $СТ_4$  нормален-ТСХ понижен - характерно е за субклиничен хипертиреозидизъм. Ако  $СТ_3$  също е нормален, се изключва  $T_3$ -тиреотоксикоза, която се среща в 5% от случаите на дифузната токсична гуша (Базедова болест и тиреоидит на Hashimoto) и в 25% при нодозната токсична гуша.

3.  $СТ_4$  с отклонение (повишен или пони-

жен)-ТСХ нормален - най-често при нарушено свързване с ТСГ или другите транспортни протеини. Препоръчва се определяне на  $СТ_4$  по друг алтернативен метод. При хоспитализирани пациенти се отчита влиянието на медикаментите върху тиреоидния статус.

4.  $СТ_4$  нормален-ТСХ с отклонения. Да се има предвид, че при тежко болни с НТЗ ТСХ търпи транзиторни промени - в 10% е понижен ( $0,02-0,3 \text{ mIU/l}$ ) и в 10% е повишен ( $4-20 \text{ mIU/l}$ ). Ако в такива случаи, най-често при възрастни лица, ТСХ е силно потиснат  $< 0,02 \text{ mIU/l}$ , а  $СТ_3$  е парадоксално нормален, най-вероятно се касае за трудно диагностицируем хипертиреозидизъм.

**Несъвпадение между ТСХ и  $СТ_4$ , където ТСХ е несъвпадащият параметър:**

1.  $СТ_4$  понижен-ТСХ несъответстващо нисък ( $< 10 \text{ mIU/l}$ ) - често при централен хипотиреозидизъм, тъй като се продуцира биологично неактивен ТСХ.

2.  $СТ_4$  повишен-ТСХ несъответстващо висок ( $> 0,1 \text{ mIU/l}$ ) - най-често ефект от НАМА или много рядко при ТСХ-секретиращи хипофизни тумори. Препоръчва се измерване на ТСХ по друг метод и определяне  $\alpha$ -субединицата на ТСХ.

3.  $СТ_4$  нормален-ТСХ с отклонения - среща се при лабилен тиреоиден статус и по време на лечение на хипотиреозидизма с  $L-T_4$ . Правилото е, че след промяна на дозировката на  $L-T_4$  ТСХ трябва да се изследва не по-рано от 2 месеца доза. Това е времето за пренастройване (TSH-reset) на секрецията на ТСХ спрямо новата тироксинемия.

4.  $СТ_4$  повишен-ТСХ несъответстващо нормален - най-често това е отражение на методологични проблеми или се касае за синдроми на генетична резистентност към ТХ.

На фиг. 1 в схематичен вид са представени насоките за интерпретация на резултатите от тиреоидните изследвания, които не се подчиняват на логичните обичайни констелации при хипо- и хипертиреозидизъм (8).

### **ТИРЕОИДНИ АВТОАНТИТЕЛА**

Автоимунните тиреоидни заболявания (АТЗ) предизвикват клетъчна увреда и променят тиреоидната функция чрез хуморални и клетъчно-медиранни механизми. Това се дължи на

свързване на сензитираните Т-лимфоцити или аутоантитела (имуноглобулини) с клетъчната мембрана на тиреоцитите с последващи литични или хиперпластични процеси. Също така нарушената тиреоидна функция може да се обуславя от действието на стимулиращи или блокиращи аутоантитела спрямо ТСХ-рецепторите на клетъчната мембрана. Три са главните тиреоидни аутоантитела (ТААт), които са важни за биохимич-

ното диагностициране на АТЗ: антиуреопероксидазни (ТПО-Ат), антиуреоглобулинови (Тг-Ат) и тиреотропин-рецепторни (ТРАт). При някои болни с АТЗ - в 20% от случаите, ТААт могат обаче да са негативни, а позитивизиране се намира и при други нетиреоидни аутоимунни заболявания: захарен диабет тип 1, пернициозна анемия и др. Положителни находки се установяват и при еутиреоидни здрави лица (неизяснено), в



**Фиг.1** Общи насоки за интерпретация на атипичните тиреоидни функционални изследвания (8)

**Fig.1.** General guide for interpretation of abnormal thyroid function tests (8)

FTE - free hormone estimate / оценка за свободния хормон

FTI - free thyroxine index / индекс на свободния тироксин

AB - antibody / антитяло

NL - normal / нормално

FDH - familial disalbuminemic hyperthyroxinemia / фамилна дисалбуминемична хипертироксинемия

GRTH - generalized resistance to thyroid hormones / генерализирана резистентност към ТХ

IEF - isoelectric focusing analysis / изоелектричен фокусиращ анализ

Alb.PPT. - albumin precipitation analysis / албумин преципитационен анализ

NTIS - non-thyroidal illness syndrome / синдром на нетиреоидни заболявания

RT<sub>3</sub> - reverse T<sub>3</sub> / обрарен Т<sub>3</sub>

GnRH - gonadotropin releasing hormone / гонадотропин освобождаващ хормон

MRI - magnetic resonance imaging / магнитно резонансна визуализация

процеса на стареене, по време на лечение с амиодарон, терапия на хепатит С с интерферон и др. Наскоро бяха публикувани данни, че в САЩ честотата на лицата с позитивни Тг-Ат е 10,4%, а за ТПО-Ат е 11,3%. Позитивирането им е по-изразено при жени, отколкото при мъже, и се увеличава с възрастта. Освен това ТПО-Ат имат сигнификантна връзка с хипо- и хипертиреозидизма, докато за Тг-Ат това правило не е валидно (10).

**Методите за определяне на ТААт** често са с различна специфичност, която се дължи на:

- различия в разпознаване на епитопните места
- замърсяване на антигенния реагент с други автоантигени
- аналитичния метод (РИА или ИРМА) и естеството на използвания детектиращ сигнал - 125-<sup>I</sup>, луминисцентен, ензимен и др.
- използване на различни вторични стандарти

На сегашния етап стандартизацията на китовите за ТААт е незадоволителна. Интернационалните референтни препарати (IRP), произведени от Националния съвет за биологични стандарти и контрол, Великобритания - MRC 65/93 за Тг-Ат и MRC 66/387 за ТПО-Ат, са от 35 години и са произведени от сборни лиофилизирани серуми на пациенти с АТЗ. За ТРАт също все още няма референтен материал. Почти единодушно е експертното мнение, че трябва да се използват само чувствителни и специфични имуноанализи за ТПО-Ат (най-разпространени са РИА), които са с високо пречистени естествени или рекомбинантни човешки ТПО-антигени. Те трябва да заменят изцяло старите нечувствителни, полуколичествени аглутинационни методи за определяне на антимикрозомалните антитела (известни като МАт). Поради горните съображения не можем да посочим общоприети международни референтни стойности на ТПО-Ат.

**Клинична употреба на определяне на ТПО-Ат**

- диагностика на АТЗ
- като биохимичен маркер за риск от АТЗ
- рисков фактор за хипотиреозидизъм по време на лечение с интерферон, интерлевкин-2 или литиева терапия
- рисков фактор за тиреоидна дисфунк-

ция по време на лечение с амиодарон

- рисков фактор за възникване на следродови тиреоидити
- рисков фактор за аборт или за неуспех при *in vitro* фертилизация
- рисков фактор за неонатален хипотиреозидизъм

**Клинично-лабораторни препоръки за използване на Тг-Ат**

• Определяне на Тг-Ат се прилага на първо място като допълнителен тест за прецизиране при измерване на серумния Тг, защото наличните циркулиращи нива на Тг-Ат интерферират при серумното определяне на Тг.

• Диагностичната полза от самостоятелно измерване на Тг-Ат не е голяма, понеже както при лица с определими нива на Тг-Ат, така и при тези с негативна находка, рядко се установява тиреоидна дисфункция. Препоръчва се Тг-Ат да не се назначават механично, заедно с ТПО-Ат.

• Тг-Ат имат прогностична стойност при дългогодишното проследяване на Тг-Ат позитивните пациенти с ДТК (12).

**Клинична употреба на определянето на ТРАт**

За практически цели повечето ендокринологични лаборатории прилагат радиорецепторния анализ (РРА) за измерване на ТРАт (синоним ТРАК). Тези антитела са насочени срещу епитопи от ектодомена на ТСХ рецептора. Анализът не разграничава между стимулиращите и блокиращите ТСХ-рецепторни антитела. През последните 5 години в клиничната тиреоидология навлязоха нови методи от II генерация с рекомбинантни човешки ТСХ рецептори и човешки стандартен материал. Те притежават 98% диагностична чувствителност при болестта на Basedow и 99% специфичност за здрави лица (7).

**Основните индикации** за определяне на ТРАт са:

- За установяване етиологията на хипертиреозидизма, когато тя е неясна клинично.
- Като показател за имунологична ремисия при болестта на Basedow - негативен ТРАт.
- При пациенти, за които е налице съмнение, че имат "еутиреоидна тиреоид-асоциирана офталмопатия (ТАО)".
- При бременни с минала или настояща история за болестта на Basedow.

## ТИРЕОИДНИ ТУМОРНИ МАРКЕРИ

### Тиреоглобулин

Определянето на серумния Тг като туморен маркер за дългогодишно мониториране лечението на ДТК и през 2002 г. си остава методологично предизвикателство (16). Всеки един от основните методи, които са в употреба - РИА и двустранните ИМА, притежават както предимства, така и недостатъци, но основното затруднение идва от наличието на ендогенни интерферирани в имуноаналитичната реакция Тг-Ат (17). Тъй като типът на аналитичните методи обуславя до голяма степен клинично-лабораторните несъответствия, по-долу ще отделим внимание на някои техни особености:

- *РИА методи за определяне на Тг.* При наличие на Тг-Ат се отчитат както фалшиво положителни, така и фалшиво отрицателни стойности на Тг, което е в зависимост от вида на разделяне на комплекса антиген-антитяло от свободния аналит. Като правило РИА по-малко се влияят от интерференцията с Тг-Ат, но са по-нечувствителни и с тенденцията да отчитат по-високи от реалните нива.

- *ИРМА методи.* Те са по-чувствителни и специфични, но взаимодействието с ендогенните Тг-Ат оказва съществен ефект върху резултатите, които могат да са недействително ниски. В присъствие на Тг-Ат се измерват фалшиво занижени стойности на Тг. Поради това при Тг-Ат позитивни пациенти неопределимостта на Тг не е сигурно доказателство за рецидивиращ тумор и обратното - високите нива на Тг доказват наличността на Тг, но винаги трябва да се има предвид, че концентрацията му може да е по-ниска от действителната.

С въвеждането в Европа на новия международен референтен стандарт за Тг - CRM-457 (15) много лаборатории утвърдиха за регионите с адекватен йоден прием *референтни стойности* на серумния Тг: 3 до 40 ng/ml, средна стойност 12 ng/ml. Отскоро задължително правило за всички лаборатории, които извършват анализи на Тг като туморен маркер, е да провеждат предварително скриниране на постъпилите серуми за наличие на Тг-Ат, без което е невъзможна правилната интерпретация на резултатите. *Recovery тестът*, с прибавяне на познати коли-

чества Тг към изследваната проба, който се практикува при някои методи, се счита вече за ненадежден и излишен.

### Клинична употреба на серумния Тг (16)

Концентрацията на серумния Тг зависи от три фактора - обем на щитовидната жлеза, физическата цялост на тъканта ѝ и степента на стимулация, обусловена от нивото на ТСХ или ТРАт.

- Серумният Тг е полезен показател за диагностициране на *thyreotoxicosis factitia* - ниски нива.

- За преценка активността на възпалителните тиреоидити, например подостър тиреоидит и тиреоидит след лечение с амиодарон - високи нива.

- Предоперативното определяне на серумния Тг не е задължително, но може да ориентира за Тг секреторния капацитет на тумора. Счита се, че предоперативни стойности над 40 ng/ml показват, че туморът е ефективен секретор на Тг и с това се предопределя чувствителността му като следоперативен туморен маркер.

- Основно показание си остава следоперативното мониториране на Тг за преценка ефективността на хирургичната интервенция и лъчетерапия с <sup>131</sup>I и за дългогодишното проследяване на пациентите с ДТК за рецидив на тумора.

- За тиреоидектомирани (атиреозни) пациенти няма нормални стойности на Тг - той трябва да бъде неизмерим (< 1 ng/ml), даже и когато нивото на ТСХ е повишено.

- Като ориентировъчно правило ще посочим, че 1 g нормална тиреоидна тъкан продуцира приблизително 1-2 ng/ml Тг, когато ТСХ е в норма. Ако серумният Тг е определен на фона на L-T<sub>4</sub> терапия, промените в туморния растеж могат да се следят и без спиране на лечението.

- Ако серумният Тг е неопределим по време на терапия с L-T<sub>4</sub>, определянето му след стимулация с ТСХ (спиране на L-T<sub>4</sub> или приложение на hrTSH) повишава диагностичната му чувствителност. Величината на стимулация на Тг в отговор на hrTSH е по-ниска, отколкото след спиране на лечението с L-T<sub>4</sub> - 10-кратно срещу 16-кратно повишение спрямо супресираното ТСХ ниво за нормална тиреоидна тъкан, тиреоиден тумор или метастази от ДТК (9). Диагнос-

тичното целотелесно скениране с  $^{131}\text{I}$  не е необходимо при тези пациенти с ДТК, които още в началото на лечението показват неопределими нива на серумния Тг след стимулация (14).

### **Калцитонин (Кт) и ret-Proto-oncogen**

Измерването на Кт за предоперативна диагностика на медуларния тиреоиден карцином (МТК) и по-нататъшно следоперативно следене трябва да се провежда с двустранни ИМА (ИРМА, ИЛМА), които са строго специфични за  $^{32}\text{I}$  аминокиселинния зрял Кт, който е основният туморен маркер за МТК (8). Като долна граница за нормален Кт се приемат стойности под 10 pg/ml. Ще изтъкнем накратко следните по-важни препоръки за клинично-лабораторното приложение на определянето на Кт:

- Лекостепенното повишение на Кт над 10 pg/ml е ранен биохимичен маркер за диагноза на МТК в стадия на микрокарцином.
- Установена е позитивна корелация между туморната маса на МТК и серумното ниво на Кт.
- Серумният Кт трябва да се определя както преди, така и 6 месеца след хирургичното лечение. Рецидиви се изключват само ако базалното ниво на Кт или след стимулация с пентагастрин е неопределимо.
- Тъй като всички пациенти, родени с RET мутации, развиват МТК, а 5-10% от спорадичните МТК са носители на такива мутации, строго се препоръчва RET анализ при всички пациенти със спорадичен МТК.

### **АВТОМАТИЗИРАНЕ НА ТИРЕОИДНИТЕ АНАЛИЗИ**

Докато при РИА съществуват значителни трудности за автоматизираното им извършване, тъй като се изисква физична сепарация на антияло-свързания от свободния маркиран аналит, то при хомогенните ИРМА и другите алтернативни ИМА, основаващи се на моноклонални антитела, беше постигнат значителен прогрес по отношение пълното им автоматизиране и роботизиране. Основните постижения се свеждат до повишена производителност, редуциране на персонала, модулен принцип и роботизирани системи, които включват едновременно имуно-

аналитични определяния заедно с клинично-химични на един инструмент. Засилва се тенденцията за прехвърляне на тиреоидните изследвания от по-малките специализирани хормонални, най-често с радиоизотопен профил лаборатории, към големите общи клинични лаборатории. Предимството е, че пълното автоматизиране е икономически по-ефективно, но от друга страна, то има един много съществен недостатък - липса на лабораторно-експертна интерпретация на тиреоидните тестове и неучастие на лабораторния специалист в дискусиата с клинициста върху необичайните и несъвпадащите резултати.

### **ЗНАЧЕНИЕ НА ВЗАИМООТНОШЕНИЯТА ЛАБОРАТОРИЯ - ЛЕКАРИ**

Задължително условие е специалистите от аналитичните лаборатории да осъществяват активна колаборация с лекарите, които използват техните изследвания с цел да се направи научно обоснован избор на най-подходящата характеристика на дадено тиреоидно изследване. Активното сътрудничество е предпоставка, че качеството и икономическата ефективност на анализа ще бъдат използвани в логична последователност за преценка на нарушенията в тиреоидната функция и изясняване на несъответствията. От една страна, лекарите би трябвало да изискват от лабораторията, с която кореспондират, да изпраща проби в друга лаборатория за анализ и изследването да се проведе с алтернативен метод при условие, че резултатите показват клинично-лабораторна дискордантност. От друга страна, лабораториите също трябва да предоставят на лекарите в детайли методологичните принципи, функционалната чувствителност на метода, междуаналитичната прецизност и аргументираните си предпочитания спрямо други методи. Всяка лаборатория, извършваща тиреоидни изследвания, следва да утвърди колаборация с една или повече подобни лаборатории, които използват различни от нея тиреоидни анализи. Повторното измерване на аналита в пробата с алтернативен метод има ключово значение за изясняване на смущаващите резултати.

В **заключение** ще завършим с илюстрация на някои сериозни диагностични грешки,

които обикновено се дължат на непознаване и неправилна интерпретация на лабораторните тиреоидни изследвания:

- Пропусък в диагнозата хипопитуитаризъм вследствие фалшиво нормален имунореактивен серумен ТСХ, което се дължи на несъвпадение между биологичната (понижена) и имунологичната активност на тиреотропина.

- Предприемане аблация на щитовидната жлеза въз основа на еутиреоидна хипертироксинемия вследствие генетичен дефект в свърз-

ващите протеини за ТХ (фамилна дисалбуминемична хипертироксинемия - FДН или синдроми на резистентност към ТХ).

- Невъзможност да се определи действително съществуващото високо ниво на Тг при пациенти с метастазиращ ДТК поради влияние на ендогенни Тг-Ат или т. нар. "hook-effect" при ИРМА.

- Да се пропусне диагнозата Т3-тирео-токсикоза при силно изтощени и слаби възрастни пациенти, когато СТ<sub>3</sub> е фалшиво нормален.

## КНИГОПИС/REFERENCES

1. Кирилов, Г. Съвременни насоки и препоръки за лабораторна диагностика на тиреоидните заболявания (радиоимунологични и алтернативни имуноанализи). *Рентгенол Радиол*, 41, 2002, 100-106.

2. Кирилов, Г. Тиреоглобулинът като туморен маркер в следоперативния контрол на диференцирания тиреоиден карцином - методологични и клинични особености. *Рентгенол Радиол*, 37, 1998, 8-11.

3. Кирилов, Г. Хормонална диагностика на тиреоидния статус. В: Ендокринология. Ред. Б. Лозанов. Тилия, София, 2000, 292-302.

4. Лозанов, Б. (ред.). Ендокринология. Тилия, София, 2000.

5. Andersen, S. et al. Narrow individual variations in serum T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> in normal subjects: A clue to the understanding of subclinical thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 2002, 1068-1072.

6. Caraccio, N. et al. Lipoprotein profile in subclinical hypothyroidism. Response to levothyroxine replacement, a randomized placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 2002, 1533-1538.

7. Costagliola, S. et al. Second generation assay for thyrotropin receptor antibodies has superior diagnostic sensitivity for Graves' diseases. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, 1999, 90-97.

8. De Groot, L. et al. The thyroid and its diseases. 2002 [www.thyroidmanager.org](http://www.thyroidmanager.org).

9. Haugen, B. et al. A comparison of recombinant human thyrotropin and thyroid hormone withdrawal for the detection of thyroid remnant or cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, 1999, 3877-3885.

10. Hollowell, J. et al. Serum TSH, T<sub>4</sub>, and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): national health and nutrition examination survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 2002, 489-499.

11. Kanaya, A. et al. Association between thyroid dysfunction and total cholesterol level in an older biracial population. *Arch Intern Med*, 162, 2002, 773-779.

12. Ladenson, P. et al. American Thyroid Association Guidelines for detection of thyroid dysfunction. *Arch Intern Med*, 160, 2000, 1573-1575.

13. Nordyke, R. et al. Alternative sequences of thyrotropin and free thyroxine assays for routine thyroid function testing. Quality and cost. *Arch Intern Med*, 158, 1998, 266-272.

14. Pacini, F. et al. Diagnostic 131-iodine whole-body scan may be avoided in thyroid cancer patients who have undetectable stimulated serum Tg levels after initial treatment. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 2002, 1499-1501.

15. Rafferty, B., R. Gaines. Comparison of pituitary and recombinant human thyroid-stimulating hormone (rhTSH) in a multicenter collaborative study: establishment of the first World Health Organization reference reagent for rhTSH. *Clin Chem*, 45, 1999, 2207-2215.

16. Spencer, C. et al. Detection of residual and recurrent differentiated thyroid carcinoma by serum thyroglobulin measurement. *Thyroid*, 9, 1999, 11, 435-431.

17. Spencer, C. et al. Serum thyroglobulin (Tg) antibodies: prevalence, influence on serum thyroglobulin measurement and prognostic significance in patients with differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 83, 1998, 1121-1127.

18. Wang, R. et al. Accuracy of free-thyroxine measurements across natural ranges of thyroxine binding to serum proteins. *Thyroid*, 10, 2000, 31-39.

### АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Доц. д-р Георги Кирилов  
Клиничен център по ендокринология,  
и геронтология, СБАЛЕНГ  
ул. Д. Груев 6, 1303 София  
E-mail: [kirilov@uheg.medicalnet-bg.org](mailto:kirilov@uheg.medicalnet-bg.org)

### ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Assoc. Prof. Georgi Kirilov, MD  
Clinical Center of Endocrinology  
and Gerontology  
6 D. Gruev Str., 1303 Sofia, Bulgaria  
E-mail: [kirilov@uheg.medicalnet-bg.org](mailto:kirilov@uheg.medicalnet-bg.org)

## Инхибин - предсказаният хормон

А. Томова, О. Косева, Ф. Куманов

Клиничен център по ендокринология и геронтология  
 Медицински университет - София

## Inhibin - the Predicted Hormone

A. Tomova, O. Koseva, Ph. Kumanov

Clinical Center of Endocrinology and Gerontology  
 Medical University - Sofia

### Резюме

Обзорът очертава ендокринната роля на гонадния инхибин А и инхибин В при хора. През 1932 г. McCullagh съобщава, че воден екстракт от тестиси пречи на образуването на т. нар. кастрационни клетки в хипофизата на плъхове, с което за пръв път се допуска съществуването на нестероиден секреторен продукт от гонадите. Инхибинът е гликопротеинов хормон, който се отделя от Сертолиевите клетки на тестиса и от гранулозните и тека клетките на яйчника. Той се състои от  $\alpha$ -субединица, свързана чрез две дисулфидни връзки с една от двете  $\beta$ -субединици - с  $\beta_A$ -субединицата се формира инхибин А, а с  $\beta_B$ -субединицата - инхибин В. Инхибин В контролира секрецията на ФСХ по механизма на отрицателната обратна връзка. При възрастните продукцията на инхибин В зависи от ФСХ и от състоянието на сперматогенезата. Нивата на серумния инхибин показват ясна положителна корелация с обема на тестисите и с броя на сперматозоидите. Инхибин В и ФСХ заедно са почувствителен и специфичен маркер за сперма-

### Abstract

This is a survey paper outlining the endocrine role of gonadal inhibin A and inhibin B in the human. McCullagh in 1932 reported that an aqueous testicular extract interferes with the formation of "castration cells" in the rat pituitary, and thus the existence of a nonsteroidal gonadal secretory product from testes was presumed for the first time. Inhibin is a glycoprotein hormone secreted by the Sertoli cells of testis, and the granulosa and theca cells of ovary. It is made up of an  $\alpha$ -subunit disulfide-linked to one of two  $\beta$ -subunits, the  $\beta_A$ -subunit to form inhibin A or the  $\beta_B$ -subunit to form inhibin B. Inhibin B controls FSH secretion through a negative feedback mechanism. In the adult inhibin B production depends both on FSH and spermatogenic status. Serum inhibin B levels exhibit clearcut positive correlation with testicular volume and sperm counts. Inhibin B and FSH jointly are a more sensitive and specific marker for spermatogenesis than either one alone. The role played by inhibin in female reproductive physiology has been explored, including determination of specific inhibin

тогенезата, отколкото всеки един от тях поотделно. Ролята на инхибина в репродуктивната физиология при жените е изследвана, включително и като са определяни подединиците на инхибина както в яйчника, така и концентрацията им в кръвообращението по време на менструалния цикъл. Според съвременните схващания инхибин В може да служи като показател за функцията на Сертолиевите клетки при мъжете с безплодие и като прогностичен белег при жените, подложени на лечение с оглед индуциране на овулация.

**КЛЮЧОВИ ДУМИ:** инхибин, фоликулостимулиращ хормон, сперматогенеза, хипогонадизъм.

Инхибинът е хормон, за чието съществуване се е предполагало няколко десетилетия, преди той да бъде изолиран. Въз основа на принципите на обратната връзка в хормоналните системи било допуснато наличието на нестероиден гонаден фактор, който участва в регулацията на хипофизата. Неговата функция се състои в специфично редуциране на секрецията на фоликулостимулиращия хормон (ФСХ) от хипофизата. Продукцията на инхибина на свой ред се стимулира от този гонадотропин. Още през 1932 г. McCullagh (52) за пръв път постулира съществуването на инхибина, като предполага, че тестисът е мястото на неговото образуване. Авторът е показал, че воден екстракт от тестиси е в състояние да предотврати образуването на т. нар. "кастрационни клетки" в хипофизата. Едва 50 години по-късно инхибинът е изолиран, но по ирония на съдбата - от говежда фоликуларна течност (65).

Дълго време ролята на инхибина в регулацията на ФСХ не е изследвана поради несъвършените методи. С тях не е било възможно разграничаването на димерните форми от свободните, биологично неактивни  $\alpha$ -субединици и от високомолекулните прекурсорни форми. Данните от проучвания в миналото показват, че лутеинизиращият хормон (ЛХ) и ФСХ стимулират независимо един от друг инхибиновата сек-

subunits in the ovary, as well as concentration of circulating inhibins across the menstrual cycle. According to updated concepts for inhibin physiology and pathophysiology in humans, inhibin B may serve as a marker of Sertoli cell function in infertile men, and as a prognostic indicator in women undergoing ovulation induction therapy.

**KEY WORDS:** inhibin, follicle-stimulating hormone, spermatogenesis, hypogonadism.

реция. Заблуждението се е дължало на отчитането на свободни  $\alpha$ -субединици от Лайдигово-клетъчен произход (37).  $\alpha$ -субединицата на инхибина няма инхибиращо действие върху ФСХ или друг доказан биологичен ефект, същевременно част от нея се секретира от извънгонадни източници, което допълнително затруднява интерпретацията на резултатите от проучванията преди т. нар. ера на dimeric assay. С усъвършенстване на методите за определяне на биологично активните димерни форми на инхибин А и инхибин В, както и на про  $\alpha$ -С фрагмента на  $\alpha$ -субединицата се натрупват все повече данни за ролята на инхибина като основен регулатор на синтезата на ФСХ, за неговото паракринно действие в гонадните и екстрагонадните тъкани, разширяват се хоризонтите на клиничното му приложение.

### СТРУКТУРА НА ИНХИБИНА И СЪВЪРЗАНИТЕ С НЕГО ПРОТЕИНИ

Инхибинът представлява хетеродимер, съставен от две субединици -  $\alpha$  и  $\beta$ , свързани с дисулфидна връзка.  $\beta$ -субединицата има две подформи -  $\beta_A$  и  $\beta_B$ , чието окомплектоване с  $\alpha$ -субединицата води съответно до получаване на инхибин А ( $\alpha\beta_A$ ) и инхибин В ( $\alpha\beta_B$ ) (таблица 1). При мъже и мъжки фетуси в циркулацията се

**Таблица 1.** Форми и структура на инхибина и сродните активини

**Table 1.** Forms and structure of inhibin and related activins

Форми/ Forms	Структура/ Structure
Инхибин А/Inhibin A	$\alpha\beta_A$
Инхибин В/Inhibin B	$\alpha\beta_B$
Активин А/Activin A	$\beta_A\beta_A$
Активин В/Activin B	$\beta_B\beta_B$
Активин АВ/Activin AB	$\beta_A\beta_B$

открива само инхибин В, докато нивата на инхибин А не се долавят (2, 37, 73). Най-често нормите за инхибин В са в стойности от 100 до 400 ng/l, определени чрез ензимно свързан имуносорбентен метод (ELISA) (29, 61).

Инхибиновите  $\alpha$  и  $\beta$  субединици се синтезират като пропротеини от отделни гени и първичният транслационен продукт (про  $\alpha$ -N -  $\alpha$ -C и про  $\beta_A$ , про  $\beta_B$ ) претърпява по-нататъшни промени, преди да се включи в образуването на зрелите инхибини или активини (37, 70). Свободните  $\alpha$ -субединици не супресират ФСХ. Ето защо биоактивността на инхибина зависи от формирането на димерна  $\alpha/\beta$  структура.

**Активин.** Димерът от  $\beta$ -субединиците на инхибина е наречен активин. В зависимост от съчетанието на  $\beta_A$  и  $\beta_B$  субединиците се получават хомодимерните форми - активин А ( $\beta_A\beta_A$ ) (45,69) и активин В ( $\beta_B\beta_B$ ) (45), както и хетеродимерът активин АВ ( $\beta_A\beta_B$ ). Биологичното им действие се състои в стимулиране на секрецията на ФСХ от хипофизата (16, 45), като до този момент не е установено никакво влияние върху регулацията на ЛХ. Счита се, че инхибинът блокира некомпетитивно стимулираното от активина освобождаване на ФСХ. Активин А се открива в семенната течност на здрави мъже, но е недоловим след вазектомия (64).

Доказана е хомоложност между инхибин В и активина с известни паракринни регулаторни растежни фактори, като например туморен растежен фактор b (TGF - b) (16, 78). Близост в структурата има и между С-терминалния край на Мюлеровия инхибиращ хормон и  $\beta$ -субединицата на инхибина. От тези данни произтича хипотезата, че освен ендокринния ефект на инхибина и активина на ниво хипофиза те упраж-

няват интрагонадно паракринно или автокринно действие, регулирайки функцията на Лайдиговите и Сертолиевите клетки, както и синтезата на ДНК в герминативните клетки (51, 78). В яйчника тези димери регулират тека и гранулозните клетки (36).

Съществуват най-малко два свързващи протеина за инхибина и активина: фолистатин и алфа 2 - макроглобулин (70).

**Фолистатин.** В тази група се включват три мономерни гликопротеина (съответно 32, 35 и 39 кД), които нямат хомоложност със структурата на инхибина и активина. Фолистатинът има висок афинитет на свързване с активина, неутрализирайки биологичното му действие на нивото на хипофизата, т. е. ефектът на този гликопротеин е обратен на активина и в много случаи подобен на инхибина (70). Някои автори смятат, че целият активин А в циркулацията е свързан с фолистатина (56). Съществуват данни, че фолистатинът свързва и инхибина чрез неговата  $\beta$ -субединица (51).

Фолистатин се произвежда в костния мозък, яйчниците, хипофизата и в тестисите (42, 58). Открива се и в семенната течност, като се предполага, че се секретира в нея от епитела на простатата и семенните мехурчета, тъй като при вазектомия концентрацията му не се променя (10).

По-задълбоченото проучване на регулацията, секрецията и действието на фолистатина може да бъде от голяма важност за цялостното разбиране на физиологичния контрол и действието на инхибина и активина върху репродуктивната система и в други тъкани.

**Алфа 2 - макроглобулин.** Това е протеин с висок капацитет, но с нисък афинитет, свързващ инхибина и активина. Концентрацията му в серума е висока. Той свързва голям брой растежни фактори, включително и TGF - b (51). Счита се, че алфа 2 - макроглобулинът не оказва влияние върху биологичното действие на активина и инхибина (51).

## ГОНАДНА И ЕКСТРАГОНАДНА СЕКРЕЦИЯ НА ИНХИБИНА И СВЪРЗАНИТЕ С НЕГО ПРОТЕИНИ

Както вече се спомена, инхибин А се доказва в кръвообръщението само при жени, до-

като при мъжете той е в концентрации, неустойчивими със съвременните методи (37). Интерес представлява също фактът, че при жените се наблюдават промени в инхибина в хода на менструалния цикъл. Инхибин А е основната форма, произвеждана от доминантния яйчников фоликул и жълтото тяло, докато инхибин В е продукт на по-малките фоликули и е преобладаващата разновидност в ранната фоликуларна фаза (34).

Съществува всеобщо съгласие, че в тестиса основното място за синтеза на инхибин В са Сертолиевите клетки (5, 21, 79). Доказано е, че в зрелите и феталните Сертолиевы клетки се локализируют  $\alpha$  и  $\beta_B$  субединици (8, 10, 49). През 1998 г. Andersson et al., като използват високо-специфични моноклеарни антитела срещу  $\alpha$  и  $\beta_B$  субединиците, установяват, че герминативните, а не Сертолиевите клетки са тези, които дават по-активно имунооцветяване за  $\beta_B$  и че  $\alpha$ -субединицата се намира само в клетките на Сертоли, докато  $\beta_B$  се локализира в пахитенните сперматоцити и в кръглите сперматиди (5). Така рехва представата за клетките на Сертоли като единствен източник на инхибин В при полово зрели мъже! Ето защо при липса на герминативни клетки в зрелия тестис, например Sertoli-cell-only-syndrome, се открива само биологично неактивна  $\alpha$ -субединица.

В подкрепа на тези факти са наблюденията на Foucault et al. (32), че чисти култури от Сертолиевы клетки секретират димерен инхибин В, като синтезът значително се повишава при наличието на герминативни клетки. Това налага хипотезата за димеризация на субединици, които са продукт на различни клетъчни типове, за да се оформи биологично активната зряла форма на инхибин В. Оказва се, че инхибин В се произвежда в Сертолиевите клетки, но зависи от наличието на специфични типове герминативни клетки.

Вероятно пахитенните сперматоцити и сперматидите в по-ранни стадии са главните модулатори на инхибиновия синтез (5, 7). По-нататъшните проучвания в тази насока биха имали голямо клинично значение. Ако точно се установи кой герминативноклетъчен тип основно повлиява концентрацията на инхибин В, концентрацията му може да бъде не само маркер на сперматогенезата, но и показател за нивото

на прекъсването на сперматогенезата при мъже с необструктивна азооспермия, а също и при разработване на мъжката хормонална контрацепция (11).

В Лайдиговите клетки на хора и гризачи също е доказана информационна РНК за инхибиновите субединици -  $\alpha$  и  $\beta_B$ . В Лайдиговите клетки също може би се синтезира инхибин В и/или активин (8, 49). Проучванията *in vitro* при плъхове отчитат нарастване на имунореактивния и биоактивния инхибин В в отговор на стимулация с човешки хорионгонадотропин (ЧХГ), който е сроден на ЛХ (28, 62). Според други съобщения (77) секретира се само имунореактивен, не и биоактивен инхибин В. По-нови проучвания, използващи методи за отчитане на димерните форми на инхибина, не установяват покачането му при стимулация с ЧХГ, но се наблюдава значително повишаване на продукцията на про  $\alpha$ -С от Лайдиговите клетки (41). Young et al. (2000) съобщават, че нивата на инхибина след едномесечна стимулация на хипогонади с ЛХ не се променят, макар че, както следва да се очаква при това въздействие, покачва се тестостероновата концентрация (79).

В обобщение може да се каже, че нивата на инхибина отразяват в голяма степен взаимодействието между герминативните и Сертолиевите клетки. Нарушаването на това взаимодействие при Sertoli-cell-only-syndrome може да бъде едно от обясненията за изключително ниските нива на инхибина при тази патология (5), въпреки че Сертолиевите клетки общо взето са запазени при този синдром. Както беше споменато по-горе в изложението, синтезът на  $\beta_B$ -субединицата поне до известна степен зависи от сперматогенезата. Нивата на инхибин В след пубертета отразяват основно взаимодействието между герминативните и Сертолиевите клетки.

Тези обобщения обясняват противоречивите и трудни за интерпретация резултати, получени при проучванията върху инхибина, използващи по-старите методи за определянето на този хормон, при които са отчитани както димерните, така и свободните  $\alpha$ -субединици.

$\alpha$ ,  $\beta_B$  и  $\beta_A$  субединиците се откриват и в редица екстрагонадни структури - хипофиза, костен мозък, бъбреци, гръбначен и главен мозък, надбъбреци и плацентата. В надбъбречната

жлеза висока имунореактивност за  $\alpha$ -субединицата показват предимно *zona reticularis* и *zona fasciculata* (50, 68), но не и *zona glomerulosa* и медулата (68). Salmenkivi et al. (2001) установяват значителна имунореактивност на медулата за  $\beta_B$  и слаба активност за  $\beta_A$  във вътрешните зони на кората (66). Счита се, че експресията на  $\alpha$ -субединицата в надбъбрека е много по-висока, отколкото на  $\beta$ , и свободни  $\alpha$ -субединици вероятно се образуват в излишък в надбъбречните жлези (70). АКТХ проявява стимулиращ ефект върху експресията на гена за  $\alpha$ -субединицата (55, 68, 71). Все още не е напълно изяснено дали тази екстрагонадна секреция оказва влияние върху нивата на инхибина в кръвообращението. В кръвта от надбъбречните вени има повишена концентрация на инхибин-подобна имунореактивност в сравнение с *vena cava* или периферните вени, от друга страна, при двустранна орхидектомия със съвремените методи не долавят инхибин в циркулацията (2). Много неизвестни стоят пред въпроса за екстрагонадната секреция на инхибина и неговата паракринна и автокринна роля в гонадите и надбъбреците. Неотдавнашни проучвания на Cipriano et al. (2001) показват, че липсата на инхибин се съчетава при мишки с поява на тестикуларни и яйчникови тумори от гранулозо/Сертолиева клетъчна линия, както и на адrenalни тумори (24).

### РЕГУЛАЦИЯ НА СЕКРЕЦИЯТА НА ИНХИБИНА

Още първите проучвания, ползващи новите набори за димерните форми на инхибин, потвърдиха хипотезата, че гонадният инхибин В се стимулира от ФСХ и на свой ред е част от аферентното рамо на дългата обратна връзка от тестиса, което селективно регулира секрецията на ФСХ от хипофизата (2, 17, 37, 47) (фиг.1).

През 1997 г. Anderson et al. (9) в свое проучване забелязват обратна корелация между нивата на инхибин В и ФСХ при здрави мъже, както и сигнификантна положителна корелация между инхибин В и концентрацията на сперматозоидите в спермата. Натрупват се все повече данни, показващи, че нивото на инхибин В е по-високо при мъже с нормална фертилна функция в сравнение с тези с инфертилитет и нару-

шение на сперматогенезата. Най-високи нива на инхибин В са наблюдавани в групата на млади подобрани донори на сперма (37), а недоловими - при двустранно орхидектомирани мъже (2).

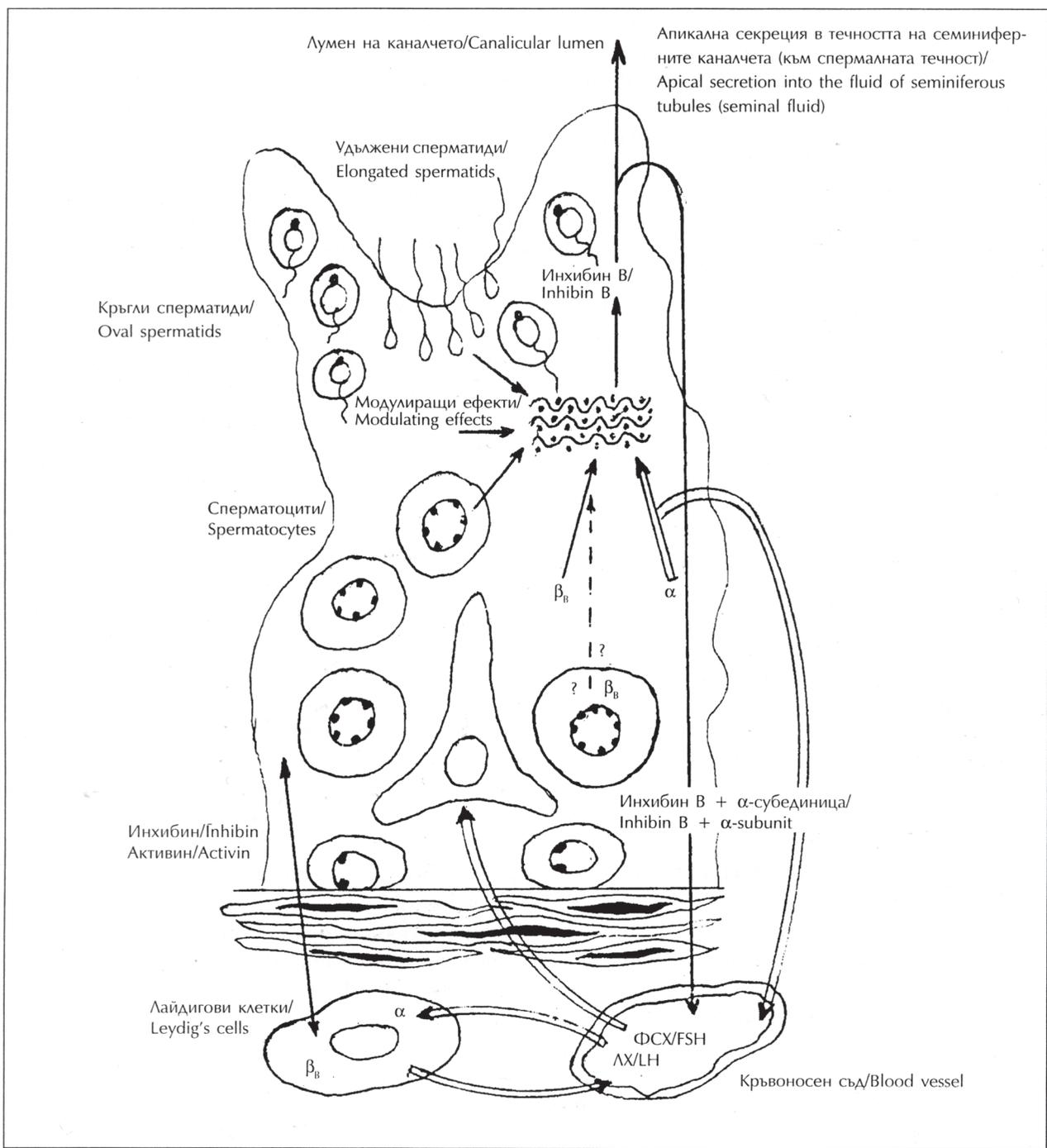
Изследвано е въздействието на гонадотропин рилизинг хормона (GnRH) върху клетъчни култури от хипофиза на плъх, третирани с инхибин, като се предполагат два различни механизма на действие на инхибина върху хипофизарните клетки.

При ниски концентрации на инхибина се потиска синтезата и освобождаването на ФСХ, докато при по-високи концентрации се предизвиква деградацията на складирания вътреклетъчно гонадотропин (38). Инхибинът намалява стимулираната от GnRH секреция на ФСХ, като променя броя на рецепторите за гонадолиберина (74), в резултат на което намалява максималният секреторен капацитет на гонадотрофите (30).

Обратна връзка между ФСХ и инхибин В се наблюдава както при здрави мъже, така и в широкия диапазон на разнообразната патология (2, 43) независимо от намаляване броя на герминативните клетки.

При проспективно проучване на Wallace et al. (73) върху мъже, получаващи химиотерапия по повод на злокачествени хематологични заболявания, е установено значително понижение на инхибин В с реципрочно покачване на ФСХ поради индуцираното от химиотерапията тестикуларно увреждане, но промяната в нивата на ЛХ и тестостерона е била незначителна. Концентрацията на свободните  $\alpha$ -субединици значително се покачва, отразявайки продължителния стимулиращ ефект на ФСХ върху Сертолиевите клетки. Наблюдава се дисоциация между продукцията на мономерните форми (ФСХ-зависими) и димерните активни форми на инхибин В.

В подкрепа на тези данни са и резултатите от тестикуларни биопсии на инфертилни мъже (15). При тях имунооцветяването за  $\alpha$ -субединицата е повишено в сравнение с биопсиите от тестиси на здрави мъже. Интерес представлява фактът, че оцветяването за  $\alpha$ -субединицата се позитивира и в Сертолиевите, но и в Лайдиговите клетки. Вероятно Лайдиговите клетки под въздействието на повишената ЛХ стимулация допринасят за нарастването на  $\alpha$ -субединицата. Същевременно проучвания *in vitro* (53) по-



**Фиг. 1.** Регулация и разделяне на продукцията на инхибин В в тестиса. Показано е образуването на инхибиновите субединици от Лайдиговите и Сертолиевите клетки под влияние на гонадотропините с възможна допълнителна продукция на  $\beta_B$  субединицата от сперматоцитите. Означено е модулиращото влияние на по-късни стадии на сперматогенезата. Димерната форма на инхибин В бива секретирана двупосочно - към течността в семенните каналчета и към интерстициума. Взаимното модулиране на функциите на Сертолиевите и Лайдиговите клетки се осъществява и от активините и инхибините (по R. A. Anderson, 2001). **Fig. 1.** Regulation and partitioning of inhibin production within the testis. Production of inhibin subunits by both Leydig and Sertoli cell under gonadotropin stimulation is shown, with possible additional production of  $\beta_B$  subunit by spermatocytes. The modulatory influence of later stages of spermatogenesis is indicated. Dimeric inhibin B is secreted both into the lumen of seminiferous tubule and into the interstitium. Bidirectional modulation of Sertoli and Leydig cell function by inhibins and activins is realized (R. A. Anderson, 2001).

казват, че ФСХ не е абсолютно необходим за секрецията на инхибина. За поддържане на нормалното му количество изглежда са необходими и двата гонадотропина. ЛХ регулира секрецията на  $\beta$ -субединицата на инхибина. Предвид посочените данни може да се предположи, че вероятно  $\alpha$  и  $\beta$  субединиците са под независим хормонален контрол.

Секрецията на инхибин В при полово зрели мъже е частично, но не изцяло под контрола на гонадотропините. Това добре се демонстрира в проучвания върху мъже с хипогонадотропен хипогонадизъм по време на лечение с GnRH (57, 67). Пулсативното подаване на същия се последва от сигнификантно покачване на инхибин В, корелиращо негативно с ФСХ във всички изследвани точки по време на апликацията. Интерес представляват данните, че преди лечението базалните нива на инхибин В при тези хипогонади са били сигнификантно по-ниски от здравите контроли, но с много големи вариации в групата.

Открита е значима положителна корелация на базалните нива на инхибин В с тестикуларния обем и с концентрацията на сперматозоидите в спермата, като възможността да се индуцира добра сперматогенеза у хипогонадотропните хипогонади при лечението с GnRH положително корелира с тези показатели (8, 17). Данните подсказват, че независимата от гонадотропините секреция на инхибин В е маркер за съзряването на семиниферните тубули на тестиса, така че при повторно включване на гонадотропинова стимулация по-бързо се получава зряла сперматогенеза. Прекъсването на терапията с GnRH при хипогонадите в посоченото проучване или супресията на гонадотропиновата секреция при здрави мъже (57) води до значително спадане на инхибин В, но нивата му никога не намаляват под 30% от първоначалните (за здравите мъже) или достигнатите (при хипогонадите), дори и при продължителна супресия. Тези наблюдения пораждат хипотезата, че след като веднъж секрецията на инхибин В е била индуцирана, около половината от продукцията на хормона се запазва дори и при значително и продължително намаляване на гонадотропната секреция (2, 9). Трябва да се отбележи обаче, че секрецията на  $\alpha$ -субединицата се понижава, ко-

ето е още едно доказателство за разделната регулация на  $\alpha$ -субединицата и димерните форми (50). Подобни данни са намерени и при мъже, третирани със супрафизиологични дози тестостерон като прототип на мъжка контрацепция. В резултат на това настъпва рязко потискане на гонадотропините до недоловими концентрации и силно потискане на сперматогенезата, въпреки че само при около 60% от мъжете настъпва азооспермия (9). При пряко увреждане на тестисите обаче се наблюдава значително по-изразено спадане на инхибин В до недоловими стойности, както е при двустранна орхидектомия или тестикуларно облъчване (59, 60, 73).

При възрастни продукцията на инхибин В зависи както от ФСХ, така и от състоянието на сперматогенезата. Най-общо има много добра корелация със степента на увредата на сперматогенезата: най-ниски са нивата на инхибин В, когато сперматогенезата е прекъсната на най-ранно ниво. По неизвестни причини обаче има случаи на Sertoli-cell-only-syndrome с нормални нива на инхибина (31). Инхибин В и ФСХ заедно са по-чувствителни и специфични маркери за сперматогенезата, отколкото всеки поотделно. Все още е ограничено използването на инхибин В в клиничната практика за отделния болен.

Към направените дотук обобщения може да се добави и изводът, че в по-голямата си част секрецията на инхибин В е гонадотропин зависима, но има и значителна независеща от гонадотропините компонента, която отразява взаимоотношението между Сертолиевите и герминативните клетки (35).

Фактът, че момчетата преди пубертета имат инхибин В, без да е отключена още сперматогенезата, докато при възрастни инхибин В корелира със сперматогенезата, подсказва, че настъпва промяна в регулацията на продукцията на инхибин В в хода на пубертета.

При хора в репродуктивна възраст серумният инхибин показва ясни денонощни колебания, тясно свързани с тези на тестостерона: в ранните утринни часове на деня концентрацията му е най-висока, а най-ниски стойности се отбелязват в късния следобед и вечерта (20). Наблюдава се и годишен ритъм на инхибина, който е в съответствие с този на ЛХ, ФСХ и тестостерона с високи стойности през месеците юни и юли и

понижение през август (54).

Инхибинът е важен модулатор на репродуктивната функция както на ендокринно ниво чрез регулация на биосинтезата на ФСХ от хипофизата, така и на паракринно и аутокринно ниво като вътрешногонаден регулаторен фактор. Напоследък някои изследвания на гена на  $\alpha$ -субединицата на инхибина при мишки подкрепят хипотезата, че инхибинът и активинът регулират секрецията на ФСХ *in vivo* и са естествено необходими за нормалната гонадна функция (22). Hayes et al. (2001) при подробни хормонални изследвания на здрави мъже и кастрати достигат до извода, че инхибин В чрез обратната връзка се явява най-големият регулатор на секрецията на ФСХ при мъже (35).

### **ПРОМЕНИ В НИВАТА НА ИНХИБИН В ОТ РАЖДАНЕТО ДО ЗРЕЛОСТТА**

При мъжките фетуси, за разлика от женските, са установени нива на инхибин В в пъпната вена, близки до тези на зрял мъж (6). Между 3-ия и 6-ия месец след раждането серумната концентрация на инхибин В стига до стойности, които значително надхвърлят обичайните при здрави зрели мъже. Повишените нива се запазват до около 2-годишна възраст, когато постепенно спадат (6).

Прави впечатление, че периодът на повишена концентрация на инхибин В значително надвишава времето, през което ФСХ, ЛХ и тестостеронът са покачени, същите обичайно спадат до ниски стойности около 6-9-ия месец след раждането (4). Едно от възможните обяснения за феномена е, че повишеният инхибин В през този период отразява нарастването на броя на Сертолиевите клетки (25).

През детството инхибин В следва хиатуса в дейността на хипоталамо-хипофизо-гонадата ос и концентрацията му започва да нараства с началото на пубертета, като дори изпреварва увеличаването на тестикуларния обем (4, 26). Преди пубертета регулацията на инхибин В се различава от тази при здравите мъже, като се наблюдава положително взаимоотношение между циркулиращите нива на инхибин В и ФСХ (4, 6). При момчетата инхибин В нараства рано в пубертета и бързо достига нивата, характерни за

зрял мъж, докато секрецията на ФСХ продължава да нараства до по-късни етапи на пубертетното развитие (4). Ето защо спермархе също се достига в ранните стадии на пубертета и може да настъпи при все още слабо изразено окосмяване и нарастване на тестикуларния обем. Наблюдаваната положителна корелация на инхибин В с ЛХ, съответно с тестостерона през ранните фази на пубертета, предполага, че Лайдиговоклетъчни фактори могат да играят важна роля в съзряването и стимулацията на Сертолиевите клетки. Подобни резултати са получени и от Nachtigall et al. при проследяване на хипогонадотропни мъже, третирани с GnRH, което представлява експериментален модел на предизвикано полово съзряване (57).

Известен паралел с пубертетното развитие може да се направи и с наблюдаваното от Anderson et al. (9) активиране на хипоталамо-хипофизо-гонадата ос след прекъсване на гонадотропната супресия с екзогенен тестостерон. В ранните стадии на възстановяването също е отчетена положителна връзка между секрецията на ФСХ и концентрацията на инхибин В, последвана от установяване на негативна корелация в по-късните етапи.

Интересно е, че взаимоотношенията между ФСХ и инхибин В, наблюдавани при пубертетното съзряване при момчетата или при възстановяване на хипоталамо-хипофизо-гонадата ос при мъже, имат свой паралел в променящата се корелация между инхибин В и ФСХ по време на менструалния цикъл. С регресиването на corpus luteum и спадането на стероидната концентрация настъпва покачване на ФСХ, водещо до нарастване и на секрецията на инхибин В от множеството малки фоликули. Повишените нива на инхибин В определят по-нататъшното покачване на ФСХ, отношения на отрицателна обратна връзка се установяват с появата на доминантен фоликул (34, 75).

Плазмената концентрация на инхибин В се променя по време на менструалния цикъл. През ранната фоликулинова фаза тя рязко се покачва, а на следващия ден след нарастването на ФСХ започва да спада прогресивно до края на фоликулиновата фаза. Два дни след достигането на най-високото ниво на ЛХ по средата на цикъла инхибин В отбелязва кратко отчетливо по-

вишение, след което концентрацията намалява до ниски стойности през време на лутеалната фаза. Обратно, концентрацията на инхибин А е ниска по време на ранната фоликулинова фаза, покачва се по време на овулацията и е най-висока по средата на лутеалната фаза. Неедновременните и нееднопосочните промени в концентрациите на инхибин А и инхибин В, наблюдавани по време на менструалния цикъл, подсказват, че тези форми вероятно имат различна физиологична роля (34). Инхибин В корелира със секрецията на естрадиола от яйчниците и изглежда отразява функцията на фоликула. Инхибин А доминира в циркулацията през лутеиновата фаза, но е в ниски концентрации във фоликулиновата фаза и даже постменопаузално. Възможно е дори инхибин А да играе роля в потискането на ФСХ при жените. Не е изключено да има и извъняйчников източник на инхибин А (1).

Изследванията показват сигнификантно повишаване на нивата на активин А с възрастта при двата пола, по-специално в последните десетилетия от живота, като липсва корелация с ФСХ. Серумните концентрации на инхибин В и на тестостерона показват понижаване при мъжете, което е в резултат на намаляване на тестикуларната функция с възрастта и последващото повишение на серумните ЛХ и ФСХ. Спадането на инхибин В се наблюдава в относително ранна възраст (35-55 години), докато намалението на тестостерона е в по-големите възрастови групи. Нивата на инхибин В показват слаба обратна корелация с възрастта и значително понижаване на отношението на инхибин В към ФСХ в серума поради относително умереното намаление на инхибина в сравнение с четирикратното повишение на ФСХ (48).

Инхибин В може би играе важна роля в ендокринологията на перименопаузата. Нивата му се намаляват рязко при жени с нормален цикъл на възраст 35-47 години, като корелират с покачването на ФСХ и могат да предшестват промените в естрадиола (14). Нивата на ЛХ и ФСХ при тях са много високи около 50-годишна възраст, но показват непрекъснато намаление, дължащо се на остаряването на хипофизата (12). Инхибин В и инхибин А са недоловими в яйчниците и в периферната кръв при постменопаузални жени (1).

## **ИНХИБИН В КАТО МАРКЕР ЗА ЕКЗОКРИННАТА ФУНКЦИЯ НА ТЕСТИСИТЕ**

Инхибин В все повече се налага като нов маркер за екзокринната функция на тестиса в репродуктивната патология като добавка към изследването на серумния ФСХ и спермограмата. Счита се, че инхибин В е по-директен маркер за Сертолиевоклетъчната функция и сперматогенезата от ФСХ, защото гонадотропинът е обект на сложна регулация от хипоталамичния GnRH, стероидните хормони, инхибина, активина и фолистатина (35, 39, 61).

Съществува тясна позитивна корелация между броя на сперматозоидите и серумните нива на инхибин В (40), а също и между тестикуларния обем и този хормон (8).

По време на детството инхибин В пряко отразява наличието и функцията на тестикуларната тъкан и това може да намери приложение в диагностичния процес при болни с крипторхизъм или интерсексуалитет (3, 4, 44).

Pierik et al. (2001) предлагат изследването на базалния инхибин В като допълнителен прогностичен фактор за ефикасността на варикоцелектомията, заедно с ФСХ, андрогенните нива и отговора на тестостерона към стимулация с ЧХГ (61). Счита се, че посочените хормонални измервания могат по-точно от спермограмата да предскажат успеха на хирургичната интервенция и да са от полза при оценка на тестикуларната функция (61) и сперматогенезата (33, 61).

В циркулацията при мъже се установяват активин А и фолистатин, като при обструктивна азооспермия нивата на активин А са понижени, а при различните други нарушения в спермата - повишени (56).

Значението на периферния инхибин В като показател за състоянието на герминативния епител, включително и сперматогенезата в тестиса на болни с необструктивна азооспермия, не е добре изяснено. При някои проучвания (13) се намира, че серумният инхибин В е добър прогностичен маркер за оценка на тестикуларните сперматозоиди, но други автори твърдят, че той не би могъл да предскаже успеха на екстракцията на сперматозоиди от тестиса (18, 29).

Вероятно значение в изучаването на мъж-

---

ката гонадна патология и физиология ще имат по-задълбочените проучвания върху нивата на инхибин В не само в плазмата, но и в семенната течност. Тя съдържа висока концентрация на инхибин В, въпреки че нивата му значително варират и в групата на мъжете с нормална сперматогенеза (8). Инхибин В е неустановим в семенната течност след вазектомия, което предполага неговия тестикуларен произход (8). Интересен факт, който все още няма обяснение, е, че в спермата не се установяват  $\alpha$ -субединици, които иначе се откриват във всички други биологични течности при човека.

Концентрациите на инхибин В в семенната течност и в кръвната плазма показват сигнификантна корелация (8). Азооспермията от obstructивен или необstructивен тип обикновено се асоциира с неустановимо ниски нива на инхибин В в семенната течност (11). Съществуват данни от проучвания върху животни, че вероятно отделянето на инхибин в кръвта и в семенната течност имат различни регулаторни механизми (46).

Другите свързани с инхибина пептиди също се намират в семенната течност. За отбелязване обаче е, че про  $\alpha$ -С не е установен (8). Измерват се високи концентрации на фолиостатин, но не ясно дали той се отделя от тестиса, тъй като подобни концентрации се намират и след вазектомия при здрави мъже (10). Фолиостатин се установява в тестиса при възрастни, докато при фетуса е недоловим (49). Той показва положителна

корелация с възрастта, но не и с времето на въздържание. Това може да се дължи на увеличаване размера на простатата с възрастта. Активин А също присъства в семенната течност (10) и е недоловим след вазектомия. Тези данни показват, че инхибинът, активинът и фолиостатинът са важни за регулирането на функционалната активност на семиниферния епител при възрастни.

Разгледаните по-горе действия, свързани с инхибина, се отнасят за хипоталамо-хипофизо-гонадната ос. Напоследък са установени допълнителни действия, свързани със семейството на инхибиновите пептиди, подсказващи възможната им роля в туморогенезата: инхибинът е повишен при болни с гранулозноклетъчни тумори и при постменопаузални жени с муцинозен овариален карцином (19), имуноактивност за  $\alpha$ -субединицата на инхибина е намерена при всички случаи с надбъбречни аденоми и карциноми (23), инхибинът има и туморосупресивен ефект при малигнен процес на простатата (63), а активин А е със свръхекспресия при колоректалния карцином (76). Инхибин А е полезен маркер при пренаталния скрининг за синдром на Down през второто тримесечие на бременността (72) и повишението му може да послужи като предвестник за развитието на еклампсия (27).

Тези изследвания показват не само значението на инхибиновите пептиди за правилното функциониране на гонадната ос, но очертават и широки хоризонти за приложение в цялата клиничната медицина.

## КНИГОПИС/REFERENCES

1. Ala-Fossi, S. L., J. Maenpaa, M. Blauer, R. Aine, P. Tuohimaa, R. Punnonen. Inhibin A and B in peri- and postmenopause. *Maturitas*, 30, 1998, 3, 273-281.
2. Anawalt, B. D., R. A. Bebb, A. M. Matsumoto, N. P. Groome, P. J. Illingworth, A. S. McNeilly, W. J. Bremner. Serum inhibin B levels reflect Sertoli cell function in normal men and men with testicular dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab*, 81, 1996, 9, 3341-3345.
3. Andersson, A. M. Inhibin B in the assessment of seminiferous tubular function. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 14, 2000, 3, 389-397.
4. Andersson, A.-M., A. Juul, J. H. Petersen, J. Muller, N. P. Croome, N. E. Skakkebaek. Serum inhibin B in healthy pubertal and adolescent boys: relation to age, stage of puberty, and follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, testosterone, and estradiol levels. *J Clin Endocrinol Metab*, 82, 1997, 12, 3976-3981.
5. Andersson, A. M., J. Muller, N. E. Skakkebaek. Different roles of prepubertal and postpubertal germ cells and Sertoli cells in the regulation of serum inhibin B levels. *J Clin Endocrinol Metab*, 83, 1998, 12, 4451-4458.
6. Andersson, A. M., J. Toppari, A.-M. Haavisto, J. H. Petersen, T. Simel, N. E. Skakkebaek. Longitudinal reproductive hormone profiles in infants: peak of inhibin B levels in infant boys exceeds levels in adult men. *J Clin Endocrinol Metab*, 83, 1998, 675-681.
7. Anderson, R. A. Clinical studies: inhibin in the adult male. *Mol Cell Endocrinol*, 180, 2001, 109-116.
8. Anderson, R. A., D. S. Irvine, C. Balfour, N. P. Groome, S. C. Riley. Inhibin B in seminal plasma: testicular origin and relationship to spermatogenesis. *Hum Reprod*, 13, 1998, 4, 920-926.
9. Anderson, R. A., E. M. Wallace, N. P. Groome, A. J. Bellis, F. C. Wu. Physiological relationships between inhibin B, follicle stimulating hormone secretion and spermatogenesis in normal men and response to gonadotrophin suppression by exogenous testosterone. *Hum Reprod*, 12, 1997, 4, 746-751.
10. Anderson, R. A., L. W. Evans, D. S. Irvine, M. A. McIntyre, N. P. Groome, S. C. Riley. Follistatin and activin A production by the male reproductive tract. *Hum Reprod*, 13, 1998, 12, 3319-3325.
11. Anderson, R. A., R. M. Sharpe. Regulation of inhibin production in the human male and its clinical applications. *Int J Androl*, 23, 2000, 3, 136-144.
12. Baccarelli, A., P. S. Morpurgo, A. Corsi, I. Vaghi, M. Fanelli, G. Cremonesi, S. Vaninetti, P. Beck-Peccoz, A. Spada. Activin A serum levels and aging of pituitary-gonadal axis: a cross-sectional study in middle-aged and elderly healthy subjects. *Exp Gerontol*, 36, 2001, 8, 1403-1412.
13. Ballesca, J. L., J. Balasch, J. M. Calafell, R. Alvarez, F. Fabregues, M. J. de Osaba, C. Ascaso, J. A. Vanrell. Serum inhibin B determination is predictive of successful testicular sperm extraction in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod*, 15, 2000, 8, 1734-1738.
14. Battistini, M., E. W. Freeman, J. A. Grisso, M. Sammel, L. Hollander, B. Garcia-Espana. Pilot study of racial differences and longitudinal changes in inhibin B in the late reproductive years. *Fertil Steril*, 77, 2002, 1, 193-195.
15. Bergh, A., S. Cajander. Immunohistochemical localization of inhibin-alpha in the testes of normal men and in men with testicular disorders. *Int J Androl*, 13, 1990, 6, 463-469.
16. Blumenfeld, Z., M. Ritter. Inhibin, activin, and follistatin in human fetal pituitary and gonadal physiology. *Ann NY Acad Sci*, 943, 2001, 34-48.
17. Bohring, C., W. Krause. Serum levels of inhibin B in men with different causes of spermatogenic failure. *Andrologia*, 31, 1999, 137-141.
18. Brugo-Olmedo, S., S. de Vincentiis, J. C. Calamera, F. Urrutia, F. Nodar, A. A. Acosta. Serum inhibin B may be a reliable marker of the presence of testicular spermatozoa in patients with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril*, 76, 2001, 6, 1124-1129.
19. Burger, H. G., A. Baillie, A. E. Drummond, D. L. Healy, T. Jobling, P. Marners, D. M. Robertson, B. Susil, N. Cahir, Y. Shen, K. Verity, P. J. Fuller, N. P. Groome, J. K. Findlay. Inhibin and ovarian cancer. *Vopr Onkol*, 45, 1999, 4, 369-373.
20. Carlsen, E., C. Olsson, J. H. Petersen, A.-M. Andersson, N. E. Skakkebaek. Diurnal rhythm in serum levels of inhibin B in normal men: relation to testicular steroids and gonadotropins. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, 1999, 5, 1664-1669.
21. Carreau, S. Human Sertoli cells produce inhibin in vitro: an additional marker to seminiferous epithelium development. *Hum Reprod*, 10, 1995, 8, 1947-1949.
22. Cho, B. N., M. L. McMullen, L. Pei, C. J. Yates, K. E. Mayo. Reproductive deficiencies in transgenic mice expressing the rat inhibin alpha-subunit gene. *Endocrinology*, 142, 2001, 11, 4994-5004.
23. Cho, E. Y., G. H. Ahn. Immunoexpression of inhibin alpha-subunit in adrenal neoplasms. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 9, 2001, 3, 222-228.
24. Cipriano, S. C., L. Chen, K. H. Burns, A. Koff, M. M. Matzuk. Inhibin and p27 interact to regulate gonadal tumorigenesis. *Mol Endocrinol*, 15, 2001, 6, 985-996.
25. Cortes, D., J. Muller, N. E. Skakkebaek. Proliferation of Sertoli cells during development of the human testis assessed by stereological methods. *Int J Androl*, 10, 1987, 589-596.
26. Crofton, P. M., P. J. Illingworth, N. P. Groome, H. F. Stirling, I. Swanston, S. Gow, F. C. Wu, A. McNeilly, C. J. Kelnar. Changes in dimeric inhibin A and B during normal early puberty in boys and girls. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 46, 1997, 1, 109-114.
27. Cuckle, H., I. Sehmi, R. Jones. Maternal serum inhibin A can predict pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynecol*, 105, 1998, 10, 1101-1103.
28. Drummond, A. E., G. P. Risbridger, D. M. de Kretser. The involvement of Leydig cells in the regulation of inhibin secretion by the testis. *Endocrinology*, 125, 1989, 1, 510-515.
29. Von Eckardstein, S., M. Simoni, M. Bergmann, G. F. Weinbauer, P. Gassner, A. G. Schepers, E. Nieschlag. Serum inhibin B in combination with serum follicle-stimulating hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but cannot predict the presence of sperm in testicular tissue samples. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, 1999, 7, 2496-2501.
30. Farnworth, P. G., D. M. Robertson, D. M. de Kretser,

- H. G. Burger. Effects of 31 kDa bovine inhibin on FSH and LH in rat pituitary cells in vitro: antagonism of gonadotrophin-releasing hormone agonists. *J Endocrinol*, 119, 1988, 2, 233-241.
31. Foresta, C., A. Bettella, F. Petraglia, M. Pistorello, S. Luisi, M. Rossato. Inhibin B levels in azoospermic subjects with cytologically characterized testicular pathology. *Clin Endocrinol*, 50, 1999, 6, 695-701.
32. Foucault, P., M. A. Drosdowsky, S. Carreau. Germ cell and Sertoli cell interactions in human testis: evidence for stimulatory and inhibitory effects. *Hum Reprod*, 9, 1994, 11, 2062-2068.
33. Fujisawa, M., M. Dobashi, T. Yamasaki, M. Kanzaki, H. Okada, S. Arakawa, S. Kamidono. Significance of serum inhibin B concentration for evaluating improvement in spermatogenesis after varicocele. *Hum Reprod*, 16, 2001, 9, 1945-1949.
34. Groome, N. P., P. J. Illingworth, M. O'Brien, R. Pai, F. E. Rodger, J. P. Mather, A. S. McNeilly. Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 81, 1996, 4, 1401-1405.
35. Hayes, F. J., N. Pitteloud, S. De Cruz, W. F. Jr. Crowley, P. A. Boeppel. Importance of inhibin B in the regulation of FSH secretion in the human male. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 2001, 11, 5541-5546.
36. Hutchinson, L. A., J. K. Findlay, F. L. de Vos, D. M. Robertson. Effects of bovine inhibin, transforming growth factor-beta and bovine activin-A on granulosa cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 146, 1987, 3, 1405-1412.
37. Illingworth, P. J., N. P. Croome, W. Byrd, W. E. Rainey, A. S. McNeilly, J. F. Mather, W. J. Bremner. Inhibin-B: a likely candidate for the physiologically important form of inhibin in men. *J Clin Endocrinol Metab*, 81, 1996, 4, 1321-1325.
38. Jenner, A. A., J. de Koning, G. P. van Rees. Effect of inhibin-like activity on LH-RH-stimulated release of FSH by pituitary glands from female rats in vitro. *Life Sci*, 32, 1983, 10, 1091-1098.
39. Jensen, T. K., A.-M. Andersson, N. H. I. Hjollund, T. Scheike, H. Kolstad, A. Giwercman, T. B. Henriksen, E. Ernst, J. P. Bonde, J. Olsen, A. McNeilly, N. P. Groome, N. E. Skakkebaek. Inhibin B as a serum marker of spermatogenesis: correlation to differences in sperm concentration and follicle-stimulating hormone levels. A study of 349 danish men. *J Clin Endocrinol Metab*, 82, 1997, 12, 4059-4063.
40. Kingmuller, D., G. Haidl. Inhibin B in men with normal and disturbed spermatogenesis. *Hum Reprod*, 12, 1997, 11, 2376-2378.
41. Kinniburgh, D., R. A. Anderson. Differential patterns of inhibin secretion in response to gonadotrophin stimulation in normal men. *International journal of andrology*, 24, 2001, 95-101.
42. Kogawa, K., K. Ogawa, Y. Hayashi, T. Nakamura, K. Titani, H. Sugino. Immunohistochemical localization of follistatin in rat tissues. *Endocrinol Jpn*, 38, 1991, 4, 383-391.
43. De Kretser, D. M., R. I. McLachlan, D. M. Robertson, H. G. Burger. Serum inhibin levels in normal men and men with testicular disorders. *J Endocrinol*, 120, 1989, 517-521.
44. Lee, P. A., M. T. Coughlin, M. F. Bellinger. Inhibin B: comparison with indexes of fertility among formerly cryptorchid and control men. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 2001, 6, 2576-2584.
45. Ling, N., S. Y. Ying, N. Ueno, S. Shimasaki, F. Esch, M. Hotta, R. Guillemin. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature*, 321, 1986, 6072, 779-782.
46. Maddocks, S., R. M. Sharpe. The effects of sexual maturation and altered steroid synthesis on the production and route of secretion of inhibin-alpha from the rat testis. *Endocrinology*, 126, 1990, 3, 1541-1550.
47. Mahmoud, A. M., F. H. Comhaire, A. Vereecken, G. Verhoeven, D. E. Addel-Rahim, K. M. Addel-Hafez. Inhibin and steroid response to testicular stimulation with pure FSH (Metrodin) in infertile men with unilateral cryptorchidism. *Andrologia*, 28, 1996, 103-108.
48. Mahmoud, A. M., S. Goemaere, D. De Bacquer, F. H. Comhaire, J. M. Kaufman. Serum inhibin B levels in community-dwelling elderly men. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 53, 2000, 2, 141-147.
49. Majdic, G., A. S. McNeilly, R. M. Sharpe, L. R. Evans, N. P. Groome, P. T. K. Saunders. Testicular expression of inhibin and activin subunits and follistatin in the rat and human fetus and neonate and during postnatal development in the rat. *Endocrinology*, 138, 1997, 2136-2147.
50. Martin, C. W., S. C. Riley, D. Everington, N. P. Groome, R. A. Riemersma, D. T. Baird, R. A. Anderson. Dose-finding study of oral desogestrel with testosterone pellets for suppression of the pituitary-testicular axis in normal men. *Hum Reprod*, 15, 2000, 7, 1515-1524.
51. Mather, J. P., L. A. Krummen, P. E. Roberts, U. Gibson, E. Mann, D. Stocks. The role of activin, inhibin and follistatin in the regulation of reproduction in the male. In: Inhibin and inhibin-related proteins. H. G. Burger, J. Findlay, D. Robertson, D. de Kretser, F. Petraglia (Eds). Ares-Serono Symposia Publication, 1994, 223-231.
52. McCullagh, D. R. Dual endocrine activity of the testes. *Science*, 76, 932, 19-20.
53. McLachlan, R. I., A. M. Matsumoto, H. G. Burger, D. M. de Kretser, W. J. Bremner. Follicle-stimulating hormone is required for quantitatively normal inhibin secretion in men. *J Clin Endocrinol Metab*, 67, 1988, 6, 1305-1308.
54. Meriggiola, M. C., E. A. Noonan, C. A. Paulsen, W. J. Bremner. Annual patterns of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, testosterone and inhibin in normal men. *Hum Reprod*, 11, 1996, 2, 248-252.
55. Munro, L. M., A. Kennedy, A. M. McNicol. The expression of inhibin/activin subunits in the human adrenal cortex and its tumors. *J Endocrinol*, 161, 1999, 2, 341-347.
56. Muttukrishna, S., A. Farouk, S. Sharma, L. Evans, N. Groome, W. Ledger, M. Sathanandan. Serum activin A and follistatin in disorders of spermatogenesis in men. *Eur J Endocrinol*, 144, 2001, 4, 425-429.
57. Nachtigall, L. B., P. A. Boeppel, S. B. Seminara, R. H. Khoury, P. M. Sluss, A. E. Lecain, W. F. Crowley. Inhibin B secretion in males with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) deficiency before and during long-term GnRH replacement: relationship to spontaneous puberty, testicular volume, and prior treatment - a clinical research center study. *J Clin Endocrinol*

*Metabol*, 81, 1996, 10, 3520-3525.

58. De Paolo, L. V., T. A. Bicsak, G. F. Erickson, S. Shimasaki, N. Ling. Follistatin and activin: a potential intrinsic regulatory system within diverse tissues. *Proc Soc Exp Biol Med*, 198, 1991, 1, 500-512.

59. Petersen, P. M., A. M. Andersson, M. Rorth, G. Daugaard, N. E. Skakkebaek. Undetectable inhibin B serum levels in men after testicular irradiation. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, 1999, 1, 213-215.

60. Petersen, P. M., N. E. Skakkebaek, M. Rorth, A. Giwercman. Semen quality and reproductive hormones before and after orchiectomy with testicular cancer. *J Urol*, 161, 1999, 3, 822-826.

61. Pierik, F. H., S. A. Abdesselam, J. T. M. Vreeburg, G. R. Dohie, F. H. de Jong, R. F. A. Weber. Increased serum inhibin B levels after varicocele treatment. *Clin Endocrinol*, 54, 2001, 6, 775-780.

62. Risbridger, G. P., J. Clements, D. M. Robertson, A. E. Drummond, J. Muir, H. G. Burger, D. M. de Kretser. Immuno- and bioactive inhibin and inhibin alpha-subunit expression in rat Leydig cell cultures. *Mol Cell Endocrinol*, 66, 1989, 1, 119-122.

63. Risbridger, G. P., S. L. Mellor, S. J. McPherson, J. F. Schmitt. The contribution of inhibins and activins to malignant prostate disease. *Mol Cell Endocrinol*, 180, 2001, 1-2, 149-153.

64. Roberts, V., H. Meunier, P. E. Sawchenko, W. Vale. Differential production and regulation of inhibin subunits in rat testicular cell types. *Endocrinology*, 125, 1989, 5, 2350-2359.

65. Robertson, D. M., L. M. Foulds, L. Leversha, F. J. Morgan, M. T. Hearn, H. G. Burger, R. E. Wettenhall, D. M. de Kretser. Isolation of inhibin from bovine follicular fluid. *Biochem Biophys Res Commun*, 126, 1985, 1, 220-226.

66. Salmenkivi, K., J. Arola, R. Voutilainen, V. Ilvesmaki, C. Haglund, A. I. Kahri, P. Heikkila, J. Liu. Inhibin/activin  $\beta_B$ -subunit expression in pheochromocytomas favors benign diagnosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 2001, 5, 2231-2235.

67. Seminara, S. B., P. A. Boepple, L. B. Nachtigall, F. P. Pralong, R. H. Khoury, P. M. Sluss, A. E. Lécain, W. F. Jr. Crowley. Inhibin B in males with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) deficiency: changes in serum concentration after short-term physiologic GnRH replacement - a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab*, 81, 1996, 10, 3692-3696.

68. Spencer, S. J., J. Rabinovici, S. Mesiano, P. C. Goldsmith, R. B. Jaffe. Activin and inhibin in the human adrenal gland. Regulation and differential effects in fetal and adult cells. *J Clin Invest*, 90, 1992, 1, 142-149.

69. Vale, W., J. Rivier, J. Vaughan, R. McClintock, A. Corrigan, W. Woo, D. Karr, J. Spiess. Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature*, 321, 1986, 6072, 776-779.

70. Voutilainen, R. What is the function of adrenal inhibins? *Eur J Endocrinol*, 132, 1995, 3, 290-291.

71. Voutilainen, R., M. Eramaa, O. Ritvos. Hormonally regulated inhibin gene expression in human fetal and adult adrenals. *J Clin Endocrinol Metab*, 73, 1991, 5, 1026-1030.

72. Wallace, E. M., J. A. Crossley, N. P. Groome, D. A. Aitken. Amniotic fluid inhibin-A in chromosomally normal

and Down's syndrome pregnancies. *J Endocrinol*, 152, 1997, 1, 109-112.

73. Wallace, E. M., N. P. Croome, S. C. Riley, A. C. Parker, F. C. W. Wu. Effects of chemotherapy-induced testicular damage on inhibin, gonadotropin, and testosterone secretion: a prospective longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab*, 82, 1997, 9, 3111-3115.

74. Wang, Q. F., P. G. Farnworth, J. K. Findlay, H. G. Burger. Effect of purified 31K bovine inhibin on the specific binding of gonadotropin-releasing hormone to rat anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology*, 123, 1988, 5, 2161-2166.

75. Welt, C. K., K. A. Martin, A. E. Taylor, G. Lambert-Messerlian, W. F. J. Crowley, J. A. Smith, D. A. Schoenfeld, J. E. Hall. Frequency modulation of follicle-stimulating hormone (FSH) during the follicular-luteal transition evidence for FSH control of inhibin B in normal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 82, 1997, 2645-2652.

76. Wildi, S., J. Kleeff, H. Maruyama, C. A. Maurer, M. W. Buchler, M. Korc. Overexpression of activin A in stage IV colorectal cancer. *Gut*, 49, 2001, 3, 409-417.

77. De Winter, J. P., M. A. Timmerman, H. M. Vanderstichele, I. A. Klaij, A. J. Grootenhuys, F. F. Rommerts, F. H. de Long. Testicular Leydig cells in vitro secrete only inhibin alpha-subunits, whereas Leydig cell tumors can secrete bioactive inhibin. *Mol Cell Endocrinol*, 83, 1992, 2-3, 105-115.

78. Ying, S. Y. Inhibins and activins: chemical properties and biological activity. *Proc Soc Exp Biol Med*, 186, 1987, 3, 253-264.

79. Young, J., B. Couzinet, P. Chanson, S. Brailly, E. Loumaye, G. Schaison. Effects of human recombinant luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in patients with acquired hypogonadotropic hypogonadism: study of Sertoli and Leydig cell secretions and interactions. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 2000, 9, 3239-3244.

#### АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Д-р Анелия Томова  
Клиничен център по ендокринология  
и геронтология  
ул. "Дамян Груев" 6, София 1303

#### ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Anelia Tomova, MD, PhD  
Clinical Center of Endocrinology  
and Gerontology  
6, Damian Gruev Str.  
1303 Sofia, Bulgaria

## Ектопични и абнормни хормонални рецептори при надбъбречната форма на синдрома на Кушинг

М. Янева, С. Захариева

Клиничен център по ендокринология и геронтология  
Медицински университет - София

## Ectopic and Abnormal Hormone Receptors in Adrenal Cushing's Syndrome

M. Yaneva, S. Zacharieva

Clinical Center of Endocrinology and Gerontology  
Medical University - Sofia

### Резюме

Механизмите на секреция на кортизол при т. нар. първично надбъбречни форми на синдрома на Кушинг, при които нивото на АСТН е понижено, доскоро бяха неизвестни и се приемаше, че става въпрос за "автономна" секреция. Понастоящем *in vitro* и *in vivo* проучванията на редица колективи показват, че една част от надбъбречните тумори или хиперплазии, които произвеждат кортизол или други стероиди, са под контрола на ектопични и/или аберантни мембранни хормонални рецептори. Тук се включват ектопични рецептори за GIP,  $\beta$ -адренергични агонисти, LH/hCG и др. и еутопични рецептори с нарушена активност като тези за вазопресин, серотонин и вероятно лептин. Тези ектопични/аберантни рецептори се свързват функционално най-често с G-протеини и активират адени-

### Abstract

Cortisol secretion mechanisms in the so-called primary adrenal Cushing's syndrome where ACTH level is lowered are unknown, and so far presumed to be due to an "autonomous" secretion. Nowadays, *in vitro* and *in vivo* studies by a number of investigators are successful in demonstrating that part of cortisol- and other steroid-producing adrenal tumors or hyperplasias are controlled by ectopic and/or aberrant membrane hormone receptors. The latter include ectopic receptors for gastric inhibitory polypeptide (GIP),  $\beta$ -adrenergic agonists, LH/hCG and eutopic receptors with impaired activity, such as the ones for vasopressin, serotonin and probably leptin. Usually these ectopic/aberrant receptors are functionally coupled to G-proteins, thereby activating adenyl cyclase and steroidogenesis. The molecular mechanisms to

латциклазата с последващо включване на стероидогенезата. Молекулярните механизми, отговорни за тези процеси, остават все още неизяснени. Разгадаването им може да доведе до разработването на нови фармакологични подходи за лечение като алтернатива на адrenaлектomia. Досега е постигнат дългосрочен контрол на синдрома на Кушинг с ектопична експресия на  $\beta$ -адренорецептори с пропранолол и на LH/hCG-рецептори с левпролид ацетат. Бъдещи проучвания вероятно ще идентифицират още по-голям брой от абнормни рецептори в надбъбреците и в други ендокринни и неендокринни тъкани. Изясняването на молекулярните механизми, водещи до експресия на абнормни хормонални рецептори, вероятно ще допринесе за разбирането на регулацията на тъканно-специфичната експресия на гени.

**КЛЮЧОВИ ДУМИ:** синдром на Кушинг, рецептори, ектопия.

Първично надбъбречните форми на синдрома на Кушинг (СК) у възрастни представляват 15-20% от всички случаи и се дължат най-често на едностранни надбъбречни тумори. Малко от 10% от АСТН-независимите форми на СК могат да се дължат на двустранни надбъбречни хиперплазии, като тяхната патоморфологична характеристика и патофизиология са много разнообразни. Тук се включват първичната пигментна нодуларна надбъбречнокорова болест (PPNAD) или първичната нодуларна надбъбречна дисплазия, синдромът на McCune-Albright и АСТН-независимата двустранна макронодуларна адренална хиперплазия (AIMAN).

Механизмите на секреция на кортизол при първично надбъбречните форми на СК, при които нивото на АСТН е понижено, доскоро бяха неизвестни и се приемаше, че става въпрос за "автономна" секреция. Понастоящем проучванията на редица колективи показват, че една част от надбъбречните тумори или хиперплазии, които произвеждат кортизол, са под контрола на ектопични мембранни хормонални рецептори (13,16).

which these processes are attributed are still not well enough clarified. Their understanding may eventually lead to new pharmacological therapeutic approaches as an alternative to adrenalectomy. Thus far, a long-term control of ectopic  $\beta$ -adrenoreceptors and LH/hCG-dependent Cushing's syndrome is achieved by propranolol and leuprolide acetate. Further researches along this line will most likely identify a greater diversity of abnormal receptors in adrenals and other endocrine and nonendocrine tissues. Elucidation of the molecular mechanisms underlying abnormal hormone receptors expression will probably contribute to gain better insight into the the regulation of tissue-specific expression of genes.

**KEY WORDS:** Cushing's syndrome, receptors, ectopy.

#### **ПЪРВОНАЧАЛНИ IN VITRO ДОКАЗАТЕЛСТВА ЗА ЕКТОПИЧНИ НАДБЪБРЕЧНОКОРОВИ МЕМБРАННИ ХОРМОНАЛНИ РЕЦЕПТОРИ**

Идеята за ектопична експресия на надбъбречнокорови мембранни хормонални рецептори е изказана за първи път от Robert Ney et al. през 1971 г. (16). Проучвайки ролята на аденилатциклазата (AC) в процеса на опосредстването на ефектите на АСТН в надбъбречната стероидогенеза на пълхове, е било установено, че само АСТН е способен да стимулира AC в проба от нормална надбъбречна кора; но при пълхове с надбъбречнокоров карцином 494, произвеждащ кортикостерон, било доказано, че AC се стимулира и от други хормони, различни от АСТН: епинефрин, норепинефрин и TSH (16). По-нататъшни проучвания са показали, че AC на този тумор може да се стимулира и от FSH, LH, слабо от простагландин E1 (PgE1), но не и от глюкагон, инсулин, вазопресин, PTH или калцитонин. Редица други in vitro проучвания под-

крепят схващането за функционалното куплиране на стероидогенезата с множество мембранны хормонални рецептори, най-често свързани с протеин С, в някои човешки надбъбречнокорови доброкачествени или злокачествени тумори.

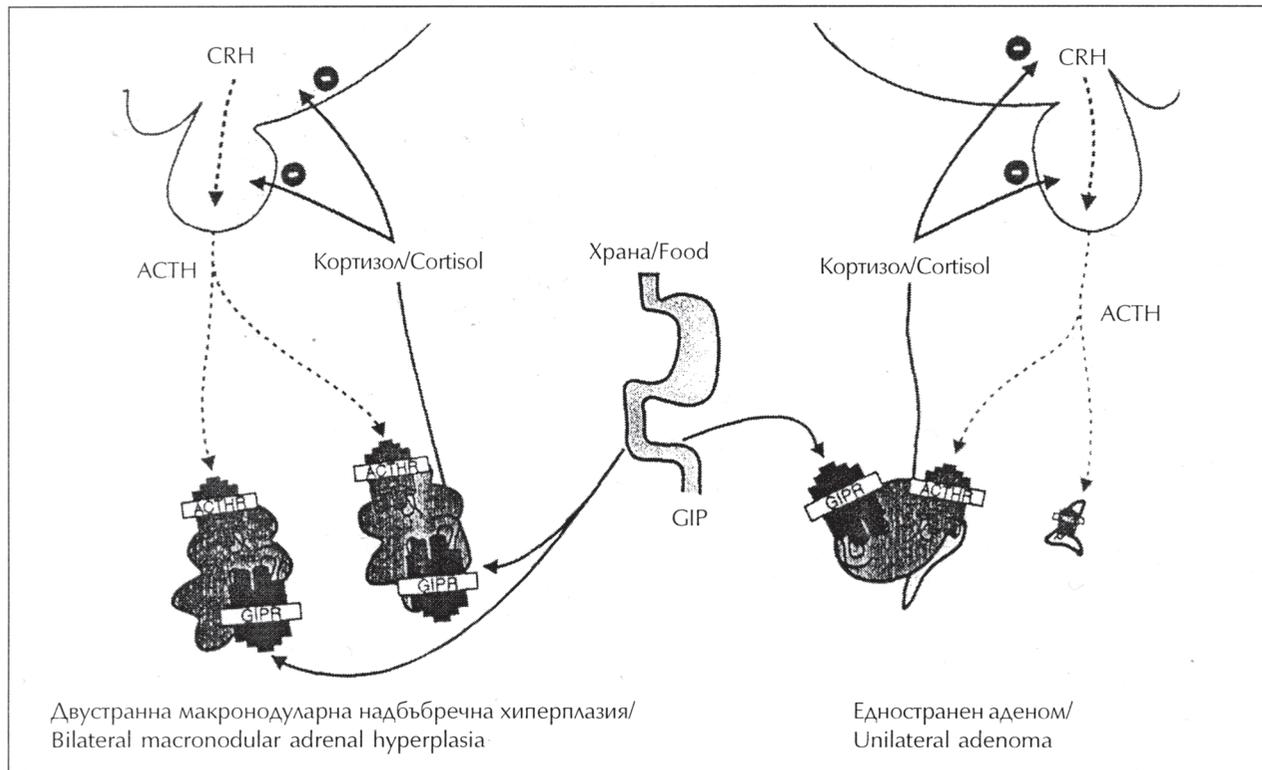
### ДАННИ IN VIVO ЗА ФУНКЦИОНИРАНЕТО НА ЕКТОПИЧНИ ИЛИ АБНОРМНИ МЕМБРАННИ ХОРМОНАЛНИ РЕЦЕПТОРИ

Предложената концепция за ектопични хормонални рецептори намира за първи път клинично потвърждение in vivo с описанието на СК, зависим от храна (6). Тази форма на СК възниква в резултат на ектопична адренална експресия на рецептори на гастроинтестиналния инхибиторен полипептид или GIP (8,14).

#### 1. Синдром на Кушинг, зависим от храна и GIP

Pavel Hamet et al. (6) са първите, които установяват кортизолова продукция, "зависима

от храна", у 41-годишен мъж със СК, дължащ се на едностранен надбъбречен аденом с периодична секреция. Плазменият кортизол бил трайно нисък сутрин или на гладно, но се покачвал до абнормни стойности след хранене; индуцираната от храна продукция на кортизол не се потискала от високи дози дексаметазон. Няколко години по-късно били описани болни с двустранна АИМАН и зависима от храната продукция на кортизол (8,14). Първият описан случай е била 48-годишна жена от Канада с типична за СК клинична картина (8). Първоначалните изследвания са показали ниски плазмени кортизолови нива сутрин на гладно и високи стойности през деня. АСТН е бил трайно потиснат. Стимулирането на плазмения кортизол от перорално приложение на глюкоза или от храни, богати на протеини или мазнини, но не и от интравенозна глюкоза е дало основание да се допусне, че кортизоловата продукция се регулира от гастроинтестинални хормони. В подкрепа на това бил и фактът, че предварителното лечение със соматостатин потиска стимулирането на кортизола от



Фиг. 1. Хипоталамо-хипофизарно-надбъбречната ос при синдром на Кушинг, зависим от GIP (A. Lacroix et al., 2001)  
Fig. 1. HPA axis in GIP-dependent Cushing's syndrome (A. Lacroix et al., 2001)

пероралната глюкоза. Краткият преглед на регулацията на гастроинтестиналните хормони е показал, че само GIP и глюкагон-подобните пептиди (GLP) се стимулират значително от перорална глюкоза и липиди и в по-малка степен от протеини. *In vivo* инфузията на GIP, целяща възпроизвеждане на физиологичните постпрандиални концентрации, довела до повишаване на кортизоловите нива само при болния, но не и при четири здрави контроли. Наличието на рецептори за GIP в адреналната тъкан било потвърдено след провеждане на рецепторна сцинтиграфия с I-131-GIP (8). Инкубацията на диспергирани надбъбречни клетки *in vitro* е потвърдила медираната от GIP кортизолова секреция в клетките на пациента, докато в клетки от здрави хора и фетални адренални клетки такъв отговор не е бил установен (8). Така авторите стигат до извода, че зависимата от храна кортизолова секреция е резултат на абнормен отговор на надбъбречните клетки към физиологична секреция на GIP. Именно тези "нетипични" или ектопични рецептори за GIP в надбъбречнокоровите клетки са станали база за възникване на нова хипотеза за етиологията на СК (8).

Задълбочените проучвания на няколко изследователски екипа са доказали ектопична надбъбречна експресия на рецептори за GIP при общо 13 болни с двустранна макронодуларна надбъбречна хиперплазия (AIMAN) и при 7 болни с едностранен надбъбречен аденом (6, 8, 14, 4, 7). Средната възраст при поставянето на диагнозата е била по-висока при болните с AIMAN в сравнение с тези с едностранен аденом. Значително по-чести са случаите при жени.

След прием на храна GIP се отделя във физиологични концентрации от К-клетките на дуоденума и тънкото черво и се свързва с ектопичните надбъбречни рецептори за GIP (фиг. 1). Това води до постпрандиално супрафизиологично повишение на плазмения кортизол, който упражнява своята отрицателна обратна връзка върху синтезата на CRH и АСТН. В отсъствието на прием на храна (ниски плазмени GIP нива), потиснатите нива на плазмения АСТН водят до намалена експресия на рецепторите за АСТН и до ниски нива на плазмения кортизол на гладно. Клинично това може да се прояви със симптоми на относителен кортизолов недостиг.

Соматична постзиготна мутация, възник-

ваща в една-единствена клетка и водеща до GIP рецепторна експресия, би могла да доведе до възникването на моноклонален аденом, секретиращ кортизол и зависим от GIP с последваща атрофия на прилежащата и контралатералната надбъбречна кора. Соматична мутация, възникваща в хода на ранния ембрионален живот и водеща до ектопична експресия на рецепторите за GIP в прогениторните (поликлонални) клетки на надбъбречната кора, може да стане причина за развитието на нефамилна двустранна макронодуларна надбъбречна хиперплазия, зависима от GIP (фиг. 1). Допуска се, че аберантната адренална чувствителност към GIP е резултат или на ектопична експресия, или на активирана мутация на GIP-рецептора, нормално не-експресиран и нефункциониращ в надбъбречнокоровите тъкани.

## 2. СК, отговарящ на вазопресин

Инжектирането на лизин-вазопресин (LVP) при голяма част от болните с кортикотропни аденоми води до увеличаване на секрецията на АСТН с последващо повишаване на плазмените нива на кортизола. При надбъбречната форма на синдрома на Кушинг с потиснато ниво на АСТН се предполага, че плазменият кортизол не би трябвало да се покачва след инжектиране на LVP (1). Въпреки това при болни с едностранен надбъбречен аденом, карцином или AIMAN е установена абнормна надбъбречна стимулация на кортизоловата секреция с екзогенен AVP или LVP. В ретроспективно проучване на 26 болни с едностранен тумор, секретиращ кортизол, Arnaldi et al. (2) са установили повишение на плазмения кортизол в хода на теста с LVP при 27% от случаите (5 аденома и 2 карцинома).

Повишеният отговор на кортизола към фармакологични дози екзогенен вазопресин не е доказателство, че ендогенният AVP е основен регулатор на стероидогенезата при тези пациенти. При болен с AIMAN плазменият кортизол се е повишил в отговор на изправено положение и приложение на 10 IU AVP (9). Промяната на ендогенните нива на вазопресина при водно обременяване и вливане на хипертоничен солев разтвор не са довели до промени в плазмените нива на кортизола. Освен това приложението *in vivo* на антагонисти на рецептора V1 за вазопресин са потиснали отговора на кортизола към екзогенен AVP, но не и към изправено по-

ложение. При този болен са били открити ектопични  $\beta$ -адренергични рецептори в надбъбречната кора (9). Предполага се, че фармакологичните дози вазопресин стимулират освобождаването на катехоламини, включително и от надбъбречната медула, които от своя страна стимулират продукцията на кортизол. Доказателство за това е била липсата на V1-рецептори в надбъбречната тъкан от болния.

Daidoh et al. описват 49-годишна жена със значителна двустранна АИМАН и тежък СК (5). Интравенозното инжектиране на малки количества AVP (0,3 IU) довело до увеличаване на плазмения кортизол 3,7 пъти, без да се наблюдава доловимо покачване на АСТН. Изправеното положение е повишило плазмените AVP и кортизол. Пероралното приложение на V1-AVP рецепторния антагонист OPC 21268 в продължение на 8 дни е довело до намаляване на нивата на свободния кортизол в урината. По-натък в препарат от диспергирани надбъбречни клетки е било показано, че AVP стимулира кортизоловата секреция в клетките от АИМАН, но не и в нормални клетки, и че този ефект се потиска от OPC 21268.

Този пример показва, че флукуациите в плазмените кортизолови нива следват малките физиологични промени в ендогенните вазопресинови нива. При всички съобщени преди това случаи кортизоловата продукция е била стимулирана от фармакологични нива на лизин- или аргинин-вазопресин. При последната болна плазменият вазопресин е потиснат до недоловими нива и е показал слабо увеличение под действието на физиологичните стимули. Възможна причина за ниските нива на вазопресина е супресивният ефект на хиперкортизолизма върху вазопресиновата генна експресия.

Рецепторите V1 за вазопресин се откриват нормално в надбъбречната кора и модулират слабия ефект на вазопресина върху стероидогенезата. Абнормният стероидогенен отговор към вазопресина при описаните болни се обяснява с абнормна функция на еутопичната рецептор-ефекторна система. Понастоящем не съществуват доказателства за наличието на ектопични рецептори или за значителна свръхекспресия на еутопичния вазопресинов рецептор V1. Молекулярните механизми, отговорни за абнормния отговор на вазопресиновия V1 рецептор и

на неговите ефекторни системи, водещи до увеличен кортизолов отговор към AVP, засега остават неизяснени.

### 3. СК, зависим от катехоламини (КА)

Нормално в надбъбречната кора не се откриват  $\beta$ -адренергични рецептори. Проучванията *in vitro* при няколко случая на надбъбречни тумори, свързани със СК, са доказали абнормното присъствие на тези рецептори и активирането на АС от КА. При 56-годишен мъж от Канада с АИМАН и СК (9) били показани независими от АСТН хиперкортизолизъм и хипералдостеронизъм с успоредно увеличение на ендогенните КА нива. Повишението на плазмения кортизол при ортостатизъм е било намалено при предварително третиране с  $\beta$ -адренергичния антагонист пропранолол. Отговорът на кортизола към ортостатизъм не е бил повлиян при предварително потискане на RAS с каптоприл или лозартан или на вазопресина с V1-рецепторни антагонисти. В препарат от надбъбречна тъкан на болния (за разлика от препаратите при контролите) са били доказани високо афинитетни свързващи места, съвместими с  $\beta$ 1- или  $\beta$ 2-адренергични рецептори, куплирани със стероидогенезата. Необходими са допълнителни проучвания на молекулярно ниво, за да се характеризират субтипозите на  $\beta$ -адренергичните рецептори, експресирани в хиперплазирани надбъбречни тъкани, и да се прецени дали те са мутирвали, или не.

### 4. СК, зависим от LH

Нормално рецепторът за LH/hCG активира аденилатциклазата и така стимулира гонадната стероидогенеза. Този рецептор се експресира основно в гонадите, но и в редица други тъкани като матка, плацента, мозък и др. Наскоро чрез имунохистохимичен анализ и *in situ* хибризация беше доказано присъствие на LH/hCG-рецептор и в *zona reticularis* на надбъбречната кора.

Болна на 63 години от френска Канада е изследвана в насока СК и АИМАН (10). По време на всяка от четирите си бременности тя е покачвала теглото с 18-22 kg, имала е типичното за СК преразпределение на мастната тъкан, но са липсвали АХ, червено-виолетови стрии или хирзутизъм. Теглото ѝ след раждане бързо се връщало към изходното. Около 2-3 месеца след всяко раждане са персистирали загуба на апетит,

гадене, лесна уморяемост. Хроничният хиперкортизолизъм се изявил клинично едва 10 години след настъпването на менопаузата. Стойностите на плазмения кортизол се повишавали при *in vivo* въвеждане на GnRH, hCG и рекомбинантен LH (hLH). Плазменият свободен тестостерон и естрадиол също се повишавали при въвеждането на hLH. При болната се установила също и абнормна стимулация на кортизол, свободен тестостерон и DHEAS от перорален прием на цизаприд и метоклопрамид (5-HT<sub>4</sub> рецепторни агонисти) (10). Приложението на дълго действащия GnRH-аналог левпролид ацетат първоначално е увеличило секрецията на LH и FSH и успоредно с това - кортизоловата секреция. След 10 дни е настъпило потискане на ендогенните нива на LH и FSH и нормализиране на кортизоловата продукция. Стимулирането на кортизола от hCG и рекомбинантен hLH, а не от FSH, предполага наличието на функционален адренокортикален LH/hCG рецептор, свързан със стероидогенезата. Липсата на кортизолова стимулация от hGnRH на фона на потиснат LH от левпролид ацетат е дало основание да се изключи наличието на адренални GnRH рецептори. Проучвания при здрави възрастни контроли не са показали връзка между LH/hCG и надбъбречната синтеза на кортизол и DHEAS.

Бременност настъпва относително рядко при жени със СК. В публикации от последните години са обобщени едва около 100 случая (15, 3). Хиперкортизолизъмът често е причина за висок процент на аборти, преждевременно раждане, мъртви раждания или перинатална смърт. СК, възникнал по време на бременност, се дължи по-често на надбъбречен аденом (44%) или карцином (17%), отколкото на хипофизарен аденом (29%) или на ектопична секреция на АСТН (4%)(15). В някои случаи на бременност и СК, дължащ се на надбъбречен аденом или значителна двустранна макронодуларна адренална хиперплазия, клиничната симптоматика претърпява обратно развитие след аборт или раждане (18). В редки случаи СК е бил диагностициран едва след ексацербация на хиперкортизолизма по време на последваща бременност.

При някои от болните с преходен СК по време на бременност или при тези, при които хиперкортизолизъмът се засилва по време на бременност, се допуска възможността за ектопична

експресия на рецептори за LH в надбъбречния аденом или в надбъбречната кора. Проучването на възможната регулация на стероидогенезата от LH или естрогените при транзиторен СК по време на бременност ще спомогне за изясняването на патофизиологията на процеса. Трябва да се подчертае, че спонтанна ремисия на СК след раждане е наблюдавана също и при болни със СК, зависим от АСТН, причинен от предполагаем хипофизен аденом. Механизмите, обясняващи тази регресия, все още не са изяснени.

Наскоро бе описан и първият случай на 37-годишен болен с ектопичен синдром на АСТН, отговарящ на GnRH. АСТН се е повишил при инжектиране на GnRH и дезмопресин, но е липсвала реакция към CRH и TRH (17).

#### **5. СК, отговарящ на серотонин (5-HT)**

При човека 5-HT се секретира от интраадреналните мастни клетки и може да регулира производство на кортикостероиди посредством паракринни механизми (11). Тези ефекти се медиатират от рецепторен подтип 5-HT<sub>4</sub>, който се експресира основно в надбъбречната zona glomerulosa и в по-малка степен в клетките на zona fasciculata. 5-HT<sub>4</sub> рецепторните агонисти са мощни стимулатори на алдостероновата секреция у човека. Те са слаби стимулатори на кортизоловата секреция *in vitro*, но не и на плазмения кортизол у здрави хора (11).

При болната със СК, зависим от LH (10), цизаприд и метоклопрамид (5-HT<sub>4</sub> рецепторни агонисти) са предизвикали покачване на плазмения кортизол 4,8 и 2,6 пъти на 120-ата минута след пероралното им прилагане. При този тест плазмените нива на АСТН са останали неизменно ниски. Не е бил установен отговор към цизаприд при 5 други болни с двустранна адренална хиперплазия, 11 с едностранен аденом и 1 с карцином и СК (12).

Наскорошни проучвания при болни с двустранна адренална макронодуларна хиперплазия и субклиничен хиперкортизолизъм доказват изразена стимулация на кортизоловата секреция при въвеждане на цизаприд. Повишеният отговор на кортизола към цизаприд в тези случаи може да бъде следствие по-скоро на увеличена експресия или на абнормна функция на "ектопична" 5-HT<sub>4</sub> рецепторна ефекторна система в zona fasciculata, отколкото на наличието на ектопични рецептори.

## ВЪЗМОЖНОСТИ ЗА НОВИ ФАРМАКОЛОГИЧНИ ТЕРАПЕВТИЧНИ СТРАТЕГИИ

Идентифицирането на ектопични и/или абнормни хормонални рецептори в надбъбречнокорковите хиперплазии или тумори, секретиратщи кортизол, дава нови възможности за използването на специфични фармакологични средства като алтернатива на адrenaлектомията.

При няколко болни с GIP-зависим СК е бил направен опит за фармакологично блокиране на постпрандиалното освобождаване на GIP с октреотид като алтернатива на адrenaлектомията (14, 4, 7). През първите месеци на лечение със бързодействащ октреотид, инжектиран преди всяко хранене, се е регистрирало клинично и биохимично подобрение; дългосрочното лечение обаче се е оказало неефективно. Изказано е предположение, че изчерпването на ефекта на октреотид се дължи на down-регулация на соматостатиновите рецептори в GIP-секретиратщите гастроинтестинални клетки. Следователно, докато не се разработят специфични GIP-рецепторни антагонисти, адrenaлектомията остава лечение на избор в дългосрочен план при този синдром. Краткосрочното използване за 8 дни на перорален V1-AVP рецепторен антагонист OPC 21268 е понижило нивото на свободния кортизол в урината при болни с АИМАН и СК, отговарящи на вазопресин (5).

При болен с КА-зависим СК и билатерална АИМАН (9), първоначалното лечение с пропранолол до 320 mg дневно е довело до значително намаляване на кортизоловата секреция. Въпре-

**Таблица 1.** Възможно фармакологично лечение при наличие на абнормни хормонални рецептори в надбъбречнокоркови тумори

**Table 1.** Potential pharmacological therapy for abnormal hormone receptors in adrenocortical tumors

Абнормен рецептор/ Abnormal receptor	Лечение/ Therapy
GIPR	Somatostatin или/or GIPR антагонист/antagonist
β-AR	β-блокери/β-blockers
TSHR	L-T <sub>4</sub>
V1-AVPR	V1-AVPR антагонист/antagonist
Angiotensin-II R	AT-1 R антагонист/antagonist
LH/hCGR	GnRH аналози/analogs
5-HT4R	5-HT4R антагонисти/antagonists

ки това нивата на свободния кортизол в урината са останали повишени и се е взело решение да се премахне оперативно едната от двете силно уголемени надбъбречни жлези. Едва след операцията, при повторното въвеждане на пропранолол е станало възможно пълното нормализиране на кортизоловата продукция. Овластяването на хиперкортизолизма е довело до намаляване на дозата на β-блокера (пропранолол) от 320 на 20 mg дневно, тъй като високите дози са предизвикали надбъбречна недостатъчност. Известно е, че КС стимулират β2-адренорецепторната транскрипция. Нормализирането на кортизолите нива би могло да доведе до намаляването на плътността на β-адренорецепторите, което може да обясни намалените нужди от антагониста (β-блокери). Лечението с пропранолол не е довело до намаляване на размера на другата надбъбречна жлеза дори и след 3-годишно проследяване. Преценено било, че приемането на минимална доза пропранолол е необходимо, за да се поддържа нормална продукция на кортизол, без да се блокират напълно рецепторите. Това е първият пример за дългосрочна фармакологична блокада на ектопични надбъбречни мембранни хормонални рецептори.

При болната със СК и АИМАН, зависими от LH/hCG (10), супресията на ендогенните нива на LH с продължителен прием на дълго действащия левпролид ацетат, дълго действащ GnRH агонист, е довело до овладяване на хиперкортизолизма и не се е наложила двустранна адrenaлектомия. Медикаментът първоначално стимулирал гонадотропното освобождаване с последващо повишение на кортизоловата продукция за 1 седмица, последвано от супресия на ендогенните нива на LH и нормализиране на кортизоловото производство. Въпреки пълното потискане на ендогенния LH болната не е развила кортизолова недостатъчност. Възможно е базалната кортизолова продукция да се е поддържала от стимулация от серотонин, тъй като в същите надбъбреци са били открити и функциониращи 5-HT<sub>4</sub> рецептори. Липсата на регресия на двустранната адrenalна хиперплазия въпреки хроничната супресия на ендогенния LH е дала основание да се допусне, че хиперплазията се поддържа от абнормно функциониращите 5-HT<sub>4</sub> рецептори; или че аберантните рецептори стимулират стероидогенезата, но не и кле-

тъчната пролиферация. При тази пациентка ще бъде интересно да се проучат ефектите на специфичен 5-HT4 рецепторен антагонист, когато такъв стане достъпен.

В бъдеще вероятно ще се идентифицират още по-голям брой абнормни хормонални рецептори, което евентуално ще доведе до разработването на нови фармакологични средства

## КНИГОПИС/REFERENCES

1. Arnaldi, G., Y. de Keyser, G. M. Gasc, E. Clauser, X. Bertagna. Vasopressin receptors modulate the pharmacological phenotypes of Cushing's syndrome. *Endocr Res*, 24, 1998, 807-816.
2. Arnaldi, G., J. M. Gasc, Y. de Keyser, M. L. Raffin-Sanson, V. Perraudin, J. M. Kuhn, M. C. Raux-Demay, J. P. Luton, E. Clauser, X. Bertagna. Variable expression of the V1 vasopressin receptor modulates the phenotypic response of steroid-secreting adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 83, 1997, 2029-2035.
3. Buescher, M. A., H. D. McClamrock, E. Y. Adashi. Cushing syndrome in pregnancy. *Obstet Gynecol*, 79, 1992, 130-137.
4. Croughs, R. J., P. M. Zelissen, Th. J. Van Vroonhoven, L. J. Hofland, N. N'Diaye, A. Lacroix, W. W. De Herder. GIP-dependent adrenal Cushing's syndrome with incomplete suppression of ACTH. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 52, 2000, 235-240.
5. Diadoh, H., H. Morita, J. Hanafusa, T. Mune, H. Murase, M. Sato, T. Shibata, T. Suwa, T. Ishizuka, K. Yasuda. In vivo and in vitro effects of AVP and V1a receptor antagonists on Cushing's syndrome due to ACTH-independent bilateral macronodular adrenocortical hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 49, 1998, 403-409.
6. Hamet, P., P. Larochele, D. J. Franks, P. Cartier, E. Bolte. Cushing syndrome with food-dependent periodic hormonogenesis. *Clin Invest Med*, 10, 1987, 530-550.
7. De Herder, W., L. J. Hofland, T. B. Usdin, F. H. de Jong, P. Uitterlinden, P. van Koetsveld, E. Mezey, T. I. Bonner, H. J. Bonjer, S. W. Lamberts. Food-dependent Cushing's syndrome resulting from abundant expression of gastric inhibitory polypeptide receptors in adrenal adenoma cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 81, 1996, 3168-3172.
8. Lacroix, A., E. Bolte, J. Tremblay, J. Dupre, P. Poitras, H. Fournier, J. Garon, D. Garrel, F. Bayard, R. Taillefer, R. J. Flanagan, P. Hamet. Gastric inhibitory polypeptide-dependent cortisol hypersecretion - a new cause of Cushing's syndrome. *N Engl J Med*, 1992, 327, 974-980.
9. Lacroix, A., J. Tremblay, G. Rousseau, M. Bouvier, P. Hamet. Propranolol therapy for ectopic beta-adrenergic receptors in adrenal Cushing's syndrome. *N Engl J Med*, 337, 1997, 1429-1434.
10. Lacroix, A., P. Hamet, J. M. Boutin. Leuprolide acetate therapy in luteinizing hormone dependent Cushing's syndrome. *New Engl J Med*, 341, 1999, 1577-1581.
11. Lefebvre, H., V. Contesse, C. Delarue, H. Vaudry, J. M. Kuhn. Serotonergic regulation of adrenocortical function. *Horm Metab Res*, 30, 1998, 398-403.
12. Mircescu, H., J. Jilwan, N. N'Diaye, I. Bourdeau, J. Tremblay, P. Hamet, A. Lacroix. Are ectopic or abnormal membrane hormone receptors frequently present in adrenal Cushing's syndrome? *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 2000, 3531-3536.
13. N'Diaye, N., J. Trambly, P. Hamet, A. Lacroix. Hormone receptor abnormalities in adrenal Cushing's syndrome. *Horm Metab Res*, 30, 1998, 440-460.
14. Reznik, Y., V. Allali-Zerah, J. A. Chayvialle, R. Leroyer, P. Leymarie, G. Travert, M. C. Lebrethon, I. Budi, A. M. Balliere, J. Mahoudeau. Food-dependent Cushing's syndrome mediated by aberrant adrenal sensitivity to gastric inhibitory polypeptide. *N Engl J Med*, 327, 1992, 981-986.
15. Sheeler, L. R. Cushing's syndrome and pregnancy. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 23, 1994, 619-627.
16. Schorr, I., R. L. Ney. Abnormal hormone responses of an adrenocortical cancer anenyl cyclase. *J Clin Invest*, 50, 1971, 1295-1300.
17. Ujihara, M., T. Yoshimoto, R. Cho, Y. Totsuka, T. Imaki, K. Nomura, T. Nishikawa, K. Takano. Ectopic adrenocorticotropin syndrome exhibiting paradoxical adrenocorticotropin responsiveness to gonadotropin-releasing hormone. *Endocr J*, 2001, 48 (1), 19-23.
18. Wallace, C., E. L. Toth, R. Z. Lewanczuk, K. Siminoski. Pregnancy-induced Cushing's syndrome in multiple pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab*, 81, 1996, 15-21.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ  
Д-р М. Янева  
Клиничен център по ендокринология  
и геронтология  
ул. "Дамян Груев" 6, София 1303

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE  
M. Yaneva, MD  
Clinical Center of Endocrinology  
and Gerontology  
6, Damian Gruev Str.  
1303 Sofia, Bulgaria

## Надежден и лесно осъществим метод за преценка на биологично активния тестостерон

Здр. Абаджиева, Г. Кирилов, Ф. Куманов  
Клиничен център по ендокринология и геронтология  
Медицински университет - София

## A Reliable Simple Method of Bioavailable Testosterone Assessment

Z. Abadjieva, G. Kirilov, Ph. Kumanov  
Clinical Center of Endocrinology and Gerontology  
Medical University - Sofia

### Резюме

Целта на настоящата обзорна статия е да хвърли светлина върху методите за определяне и преценка на свободния тестостерон. Фракция от общия тестостерон циркулира в плазмата, свързана специфично със "свързващия половиите хормони глобулин" (СПХГ), друга част е неспецифично прикрепена към албумина и само малко количество е биологично активната свободна форма, която осъществява андрогенния ефект в прицелните тъкани. Точното определяне на последната е с най-голямо клинично значение за преценка на андрогенния статус и изясняване на клинично-лабораторните несъответствия, които често се наблюдават при използване на общия тестостерон. Това важи особено за жени с хирзутизъм и при възрастни мъже. Разгледани са съвременните анализи за измерване на свободния тестостерон: чрез равновесна диализа - най-точен, но трудно приложим за клиничната практика, аналогово-лигандният метод и ин-

### Abstract

It is the purpose of this survey paper to gain better insight into free testosterone determination and evaluation methods. A fraction of total testosterone circulates in the plasma, specifically bound to the sex hormone-binding globulin (SHBG), another fraction is non-specifically bound to albumin, and merely a small amount is the biologically active free form accounting for exerting androgenous effect on target tissues. Accurate assessment of the latter has important practical implications on the clinical evaluation of androgenous status, and clarification of the clinical and laboratory incompatibilities, not infrequently noted when total testosterone is used. This is particularly valid for women with hirsutism and elder men. The updated procedures for free testosterone measurement through equilibrium dialysis (the most accurate method but difficult for practical implementation), the analogue-ligand method, and the free testosterone index are analyzed. Special attention is focused on the ma-

дексът на свободния тестостерон. Централно място се отделя на математическия метод за изчисление на биоактивния тестостерон по формулата:  $FT = (T - N.FT) / [k_t \cdot (SHBG - T + N.FT)]$ , използваща нивата на общия тестостерон и СПХГ, определени с имуноаналитични анализи. Изчисленият по предложената формула свободен тестостерон показва висока корелация с гореизброените методи и което е най-съществено - представлява надежден и точен показател за преценка на андрогенния статус.

**КЛЮЧОВИ ДУМИ:** свободен тестостерон, свързващ половите хормони глобулин (СПХГ), хирзутизъм, андрогенен статус.

### **ОБЩ И СВОБОДЕН ТЕСТОСТЕРОН - КЛИНИКО-БИОХИМИЧНИ НЕСЪОТВЕТСТВИЯ**

Биохимичният път на синтеза на мъжки полови хормони води началото си от холестерола, минава през прегненолон и завършва с андростендион и тестостерон. След образуването си в надбъбрека и тестиса мъжките полови стероиди се секретират и метаболизират много бързо. В кръвната плазма андростендионът и свободният дехидроепиандростерон се пренасят от албумина като слабо свързани форми. По-полярният дехидроепиандростерон сулфат (ДХЕА-SO<sub>4</sub>) благодарение на сулфатната си група на 3-ОН място не се нуждае от пренасящ белтък. Тъй като свързването с протеините е неспецифично, то има обратим характер. Връзките обикновено са слаби и се осъществяват с помощта на йонни, водородни, диполни и Ван дер Ваалсови сили или посредством хидрофобно свързване.

Тестостеронът (Т) циркулира в плазмата под три форми - едната е свързана със специфичния транспортен протеин, известен като "свързващ половите хормони глобулин" (СПХГ), другата е прикрепена към албумина, като свързването е неспецифично, а най-малката част е свободната фракция на хормона, осъществяваща биологичното му действие в прицелните тъкани. В някои от тях се осъществява частична дисоциация на специфичния стероидно-проте-

thematical method for calculating bioavailable testosterone by the formula:  $FT = (T - N.FT) / [k_t \cdot (SHBG - T + N.FT)]$ , where total testosterone and SHBG levels, determined by immunoassay, are employed. Free testosterone calculated by the suggested formula shows high correlation with the aforementioned methods, and what is more, it proves a reliable and precise indicator for androgenous status assay.

**KEY WORDS:** free testosterone, sex hormone-binding globulin (SHBG), hirsutism, androgenous status.

инов комплекс, с което тестостеронът като прохормон се превръща в биологично активния дихидротестостерон, взаимодействащ с андрогенните рецептори. Известно е, че свободната и неспецифично свързаната фракции са с по-надеждно клинично значение, отколкото общото ниво на плазмения тестостерон.

При мъже над 50 години плазмената концентрация на СПХГ нараства и съответно биологично активният тестостерон намалява с възрастта, което предопределя, че по нивото на общия тестостерон, който остава нормален, не може да се прави преценка за андрогенния статус. Именно поради тази причина често се натъкваме на клинично-биохимичното противоречие: възрастните мъже могат да показват клинични белези на понижена андрогенизация, докато в същото време общият им тестостерон е нормален. Обратната ситуация важи за момичета и жени с хирзутизъм, например при синдрома на поликистозните яйчници, където биоактивният тестостерон е повишен, независимо че общият е в нормални референтни граници.

Естрогените и тиреоидните хормони повишават биосинтезата на СПХГ в черния дроб, докато глюкокортикоидите и андрогените предизвикват намаление. При акромегалия и хипертиреозидизъм той също е намален. Поради това че много фактори - физиологични и патологични, повлияват нивото на СПХГ, общият тестостерон не винаги отразява реално андрогениза-

цията на организма. Биологично активният тестостерон е най-точният показател в това отношение.

### МАТЕМАТИЧЕСКИ ИЗРАЗ НА СВЪРЗВАНЕТО НА ТЕСТОСТЕРОНА С ПЛАЗМЕНИТЕ БЕЛТЪЦИ

При равновесни условия свързването на тестостерона с плазмените протеини може да се представи с уравнението:

$$T = FT + P_1T + P_2T + P_3T + \dots + P_nT \quad 1$$

За всеки протеин, прилагайки закона за действие на масите\*, получаваме:

$$(FT) + (P) \rightleftharpoons (PT)$$

или:

$$(FT) = (PT) / k(P),$$

а в присъствие на няколко свързващи протеина:

$$(FT) = (P_1T) / k_1(P_1) = (P_2T) / k_2(P_2) = \dots = (P_nT) / k_n(P_n), \quad 2$$

където  $(P_1T), (P_2T) \dots (P_nT)$  са концентрациите на тестостерона, свързан съответно с протеините 1, 2, и т. н., а  $k_1, k_2, \dots k_n$  са асоциационните константи за T на протеините 1, 2, и т. н.

Зависимостта между свободния тестостерон (FT) и свързаната с албумина фракция (AT) е линейна:

$$AT / FT = k_a \cdot Ca,$$

където FT е свободният тестостерон, а AT е свързаният с албумина тестостерон;

$k_a$  е асоциационната константа на албумина за тестостерона; Ca е концентрацията на албумина.

Ако свързващият капацитет на албумина е много голям по отношение концентрацията на тестостерона, то за отношението на свързания с албумина тестостерон към свободния тестостерон важи горното уравнение, от което се извежда зависимостта:

$$AT = FT \cdot k_a \cdot Ca, \quad 3$$

където  $k_a = 3,6 \times 10^4$  l/mol; Ca - концентрация на албумина е  $\pm 43$  g/l или при молекулно тегло 69 000 Da -  $\pm 6,2 \times 10^{-4}$  mol/l и  $k_a \cdot Ca = \pm 22$  (4).

\* Закон за действие на масите: скоростта на всяка химична промяна е пропорционална на произведението от активните маси (моларните концентрации) на взаимодействащите вещества.

Изтъкна се, че единственият протеин, който свързва специфично тестостерона, е СПХГ (sex hormone binding globuline - SHBG).

Свързването на тестостерона към транс-кортина или орозомукоида е незначително (12). При нормални физиологични условия свързването на други стероидни хормони в плазмата може да се пренебрегне при изчислението и следователно:

$$FT = (T - N \cdot FT) / [k_t \cdot (SHBG - T + N \cdot FT)], \quad 4$$

където  $k_t$  е асоциационната константа на SHBG за T, която при 37 °C приема стойността  $1 \times 10^9$  l/mol (4), а  $N = k_a \cdot Ca + 1$ ,  $N = 23$  при  $k_a = 3,6 \times 10^4$  l/mol,  $Ca = 6,2 \times 10^{-4}$  mol/l (4).

По този начин се извежда уравнение 4 от II степен за FT. То може да се реши за FT или за SHBG.

При изследвани 12 болни със синдром на поликистозните яйчници са получени следните стойности:  $T = 2,47 \pm 0,52$  nmol/l, СПХГ =  $17,37 \pm 1,83$  nmol/l, изчислен свободен тестостерон FT = 67,7 pmol/l.

За контролна група от 11 души съответните стойности са:  $T = 1,45 \pm 0,52$  nmol/l, СПХГ =  $20,94 \pm 2,17$  nmol/l, изчислен свободен тестостерон FT = 36,0 pmol/l (8).

И в двете групи общият тестостерон е нормален, но СПХГ е с по-висок капацитет при здравите, ето защо същите имат два пъти по-нисък свободен тестостерон, което само от стойностите на общия T дори не може да се подозира.

Понастоящем разполагаме с надеждни и точни имуноаналитични методи за определяне на серумните нива на СПХГ. Тъй като концентрацията на имунореактивния СПХГ адекватно отразява свързващия капацитет на този глобулин, то стойността на FT може лесно да бъде изчислена (9). И обратното, при точно определяне на свободния тестостерон от същото уравнение може да се изчисли свързващият капацитет на СПХГ.

Става ясно, че този аналогов метод е много подходящ за изчисление на свободния тестостерон на базата на концентрацията на тоталния тестостерон и на свързващите протеини. Приема се, че асоциационната константа на албумина за тестостерона е  $3,6 \times 10^4$  l/mol. Изчисленият тестостерон, свързан от албумина, варира от 7,14 nmol/l за 40 g/l албумин до 7,80 nmol/l при 50 g/l

албумин. Имайки предвид относително незначителните изменения на FT, когато албуминовите концентрации варират повече от 25 %, следва, че при рутинна работа FT може да се изчислява, като за албуминовата концентрация се приеме стойността 43 g/l ( $6,2 \times 10^{-4}$  mol/l) (4).

Необходимо е да се напомни, че тази презумпция не важи за пациенти с изявени отклонения в плазмените протеини, каквито се наблюдават при нефрозен синдром, при чернодробна цироза или бременни. В такива случаи задължително трябва да се отчита действителната концентрация на албумина.

### МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА СВОБОДНИЯ ТЕСТОСТЕРОН

Свободният тестостерон в серума се измерва най-точно чрез *равновесна диализа* (6). Диализните клетки, оригиналите на които са създадени от Nelson и Tomei за измерване на свободния тироксин в серума, се използват и за разделяне на свободните, т. е. диализиращи се, от свързаните фракции на тестостерона. Двеста  $\mu$ l от серума се диализират срещу 2,4 ml диализен буфер, който има приблизително същия състав като свободния от протеини ултрафилтрат от нормален човешки серум (131 mmol Na, 4,3 mmol K, 1,9 mmol Ca, 1,0 mmol Mg, 98 mmol Cl, 1,3 mmol  $PO_4$ , 1,3 mmol  $SO_4$ , 5,4 mmol лактат, 3,3 mmol глутамат и 8,0 mmol урея). При повечето експерименти диализата по правило се извършва за една нощ (16 часа при 37 °C). Четиристотин  $\mu$ l от диализата се анализират за тестостерон.

Установява се, че разрежданията на серума увеличават процента на диализирания тестостерон по нелинейна зависимост. Ето защо при експериментите се използва само неразреден серум. След диализирането серумните концентрации на тестостерона в диализата се определят посредством радиоимунологичен анализ. Чувствителността на анализа се разширява с използване на по-голям обем серум, по-малко количество антитестостероново анти тяло и по-дълго инкубационно време. Пробите се инкубират 2 часа с първото анти тяло, след това се прибавя маркираният със 125-I тестостерон и инкубацията продължава още 16 часа при 4 °C.

Определената чрез равновесна диализа

свободна фракция на тестостерона (AFTC) се приема за биологично активната. Следователно тя е по-добрият показател за серумните нива на андрогените, отколкото е тоталният тестостерон (1, 3, 5, 7, 10).

AFTC е възможно най-показателният физиологично и най-точният метод за определяне на свободния тестостерон, при условие че белязаният тестостеронов маркер, използван за измерване на FT, е високо пречистен. Някои съпътстващи примеси могат сигнификантно да увеличат отчитаната FT-фракция. Алтернатива на използването на белязан T е директното измерване на тестостерона в диализата, което дава възможност да се постигне много голяма чувствителност на радиоимунологичния анализ за T. Ако асоциационната константа  $k_t$  на SHBG за T, а следователно и концентрацията на FT варират с температурата, то това се преодолява чрез стриктен температурен контрол (9). Чувствителността на метода, дефинирана като концентрация на хормона, съответстваща на 90 % свързване, е 0,008 pmol/l (10).

Директното измерване на FT-концентрациите чрез *аналогово-лиганден метод (aFT)* е атрактивна и проста процедура. Изследванията показват, че аналогово-лигандният радиоимунологичен анализ дава стойности за aFT, които показват добра корелация с AFTC, но не са надежден показател за FT. aFT представлява само една променлива фракция (20-60 %) от AFTC. Това се потвърждава от факта, че изчисленият свързващ капацитет на SHBG от aFT (aSHBG) дава стойности, кратни на всички такива, съобщавани по-рано в литературата (8, 13). Данните показват още, че отношението aFT/AFTC зависи от SHBG (14). Производителите на набора реактиви за aFT претендират, че aFT отговаря на  $0,42 \text{ AFTC} \pm 9,8 \text{ pg/ml}$  ( $r = 0,67$ ) при мъжете и  $0,79 \text{ AFTC} \pm 1,07 \text{ pg/ml}$  ( $r = 0,75$ ) при жените, но получаваните стойности в рутинната клинична практика обикновено са по-ниски.

Друг параметър, чиято валидност също е ограничена, е *свободният андрогенен индекс (FAI)* :

$$FAI = 100.T / iSHBG.$$

Този показател за биологично активния тестостерон корелира сигнификантно с AFTC, обаче отношението FAI / AFTC варира от 0,12

до 0,26, което показва, че в индивидуални случаи FAI е доста несигурен показател за свободният тестостерон, като отношението не е постоянно.

Комбинирайки уравненията 2, 3 и 4 (посочени в началото), се получава:

$$FAI / FT = 100 \cdot [(SHBG - SHBG - T) - K + N] / SHBG.$$

От последното уравнение следва, че отношението FAI / AFTC корелира с броя на свободните свързващи места на SHBG. Отношението FAI / AFTC ще бъде голямо, когато броят на заетите свързващи места е малък в сравнение със свързващия капацитет на SHBG (например при жените). Обратно, отношението ще бъде малко, когато съществената част от свързващите места е заета (например при възрастни мъже). Базирайки се на подобно изчисление, Кароор et al. (2) стигат до заключението, че свободният андрогенен индекс (FAI) не е валиден за възрастни мъже.

#### ИЗСЛЕДВАНЕ НА СВОБОДНИЯ ТЕСТОСТЕРОН В КЛИНИЧНАТА ПРАКТИКА

Изчисленият свободен тестостерон от уравнение 4 корелира сигнификантно с AFTC. Както се очаква, използването на фиксирана албуминова концентрация при изчисленията не повлиява наблюдаваната корелация между FT и AFTC. Стойностите на FT винаги са идентични на AFTC-нивата,  $FT = 1,008AFTC - 0,632 \text{ pmol/l}$  с корелационен коефициент  $r = 0,992$  (11). Близка корелация между FT и AFTC се проявява при хора с висок SHBG. Направено е изследване при болни с хипертиреозидизъм ( $SHBG = 41-204 \text{ pmol/l}$ ). Двата метода дават сходни стойности. Подобен корелационен коефициент ( $r = 0,979$ ) е намерен при изследване с двата метода на жени с клиничен хиперандрогенизъм. Изключение има само при изследвана група от бременни жени в трето тримесечие (24-37 седмица). След като за изчисления е използвана съответната актуална албуминова концентрация, средната стойност за AFTC е сигнификантно по-висока, отколкото тази на FT. При бременност естрадиолът заема съществената част от свързващите места на SHBG, така че SHBG, определен чрез имуноанализ, не отразява свързващия

капацитет. Стойностите на FT при бременност са по-ниски от AFTC. Действително, AFTC, определен чрез диализа, зависи от броя на свързващите места за тестостерона. В присъствие на конкуриращи стероиди в концентрации, отговарящи на съществената фракция на концентрацията на тестостерона, свързващият капацитет (cSHBG) ще бъде сигнификантно по-нисък, отколкото iSHBG. Последният дава измерване на всички SHBG молекули, независимо дали те са достъпни за свързване на тестостерона, или не. Като се знаят концентрацията на естрадиола, а също и асоциационните константи на естрадиола с албумина и SHBG, може да се пресметне концентрацията на естрадиола, свързан със SHBG. При бременни, у които концентрацията на естрадиола е около  $20 \text{ ng/ml}$  ( $73,4 \text{ pmol/l}$ ), може да се изчисли, че около  $50 \text{ pmol/l}$  от SHBG е зает от естрадиола и глобулинът не е достъпен за тестостерона. Това обяснява защо изчисленият cSHBG е сигнификантно по-нисък от измерените с имуноанализ стойности iSHBG. Тогава FT е фалшиво по-нисък от AFTC като следствие от включването в изчисленията на свързващите места, заети в този случай от естрадиола.

Силен аргумент, че неспецифично свързаният тестостерон е параметър на биологично активната фракция на тестостерона, е определянето на т. нар. non SHBG-T чрез преципитация с амониев сулфат (3, 5). Non SHBG-T, измерен чрез преципитация с амониев сулфат, е около 20 пъти по-висок от FT, докато изчисленият неспецифично свързан тестостерон (при използване на асоциационна константа на T за албумина  $3,6 \times 10^4 \text{ l/mol}$ ) е около 23 пъти повече FT. Стойността на асоциационната константа се намира, като се използва чист човешки албумин. В серума тя може да бъде незначително по-ниска вследствие присъствието на липиди. В този случай  $N \cdot (k_a \cdot Ca + FT)$  може да се окаже по-близо до 20. При всички случаи изчисленият неспецифично свързан тестостерон сигурно отразява non SHBG-T.

В заключение проучванията показват, че нито aFT, нито FAI са надеждни показатели за свободния тестостерон. Близките стойности на FT и AFTC, както и на iSHBG и cSHBG, получени при различни физиологични и патологични условия и при отсъствие на конкуриращи стерои-

ди във високи концентрации (както е при бременните), показват, че: изчисленият FT е сигурен индекс за свободния тестостерон, изчисленият неспецифично свързан Т отразява надеждно по SHBG-T (биологично активния тестостерон) и на определения чрез имуноанализ SHBG може да се разчита за пресмятане на SHBG-свързващите места.

Следователно формулата :

$$FT = (T - N.FT) / [k_t \cdot (SHBG - T + N.FT)],$$

предложена от Sodergard et al. (9), използва двата основни показателя общ тестостерон (Т) и SHBG, дава възможност да се определи биологично активният хормон, необходим за правилната клинична преценка на някои състояния, при които по друг начин е трудно или невъзможно изясняването на андрогенния статус.

#### КНИГОПИС/REFERENCE

1. Cumming, D. C., S. R. Wall. Non-sex hormone binding globulin bound testosterone as a marker of hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab*, 1985, 61, 873-876.
2. Kapoor, P., B. M. Luttzell, D. Williams. The free androgen index is not valid for adult males. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1993, 45, 325-326.
3. Loric, S., G. Guechot, F. Duron, P. Aubert, J. Giboudeau. Determination of testosterone in serum not bound by sex - hormone binding globulin: diagnostic value in hirsute women. *Clin Chem*, 1988, 34, 1826-1829.
4. Moll, G. W., R. L. Rosenfield, J. H. Hecke. Estradiol-testosterone binding interaction and free plasma estradiol under physiological conditions. *J Clin Endocrinol Metab*, 1981, 52, 868-874.
5. Nankin, H. R., J. H. Calkins. Decreased bioavailable testosterone in aging normal and impotent men. *J Clin Endocrinol Metab*, 1986, 63, 1418-1420.
6. Nelson, J. C., R. Tomei. Direct determination of free thyroxin in indiluted serum by equilibrium dialysis / radioimmunoassay. *Clin Chem*, 1988, 34, 1737-1788.
7. Rosenfield, R. L. Plasma testosterone binding globulin and concentration of unbound plasma androgens in normal and hirsute subject. *J Clin Endocrinol Metab*, 1974, 32, 717-728.
8. Rosner, W. Errors in measurement of plasma free testosterone. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997, 82, 2014-2015.
9. Sodergard, R., T. Backstrom, V. Shanbhag, H. Carstensen. Calculation of free and bound fractions of testosterone and estradiol 17 $\beta$  to human plasma protein at body temperature. *J Steroid Biochem*, 1982, 26, 801-810.
10. Umstot, E. S., J. E. Baxter, R. N. Andersen. A theoretically sound and particable equilibrium dialysis method for

measuring percentage of free testosterone. *J Steroid Biochem*, 1985, 22, 639-648.

11. Vermeulen, A., K. Verdong, J. M. Kaufman. A critical evaluation of simple methods for estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, 84, 3666-3672.

12. Vermeulen, A., T. Stoica, L. Verdonck. The apparent free testosterone concentration, an index of androgenicity. *J Clin Endocrinol*, 1971, 33, 759-767.

13. Wilke, T. J., D. S. Utley. Total testosterone, free androgen index, calculated free testosterone and free testosterone by analog RIA compared in hirsute women and otherwise normal women with altered binding of sex-hormone binding globulin. *Clin Chem*, 1987, 33, 1372-1375.

14. Winters, S. J., D. E. Kelly, B. Goodpaster. The analog free testosterone assay: are the results in men clinically useful? *Clin Chem*, 1998, 44, 2178-2182.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ  
Д-р Здравка Абаджиева  
Клиничен център по ендокринология  
и геронтология  
ул. "Дамян Груев" 6, София 1303

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE  
Zdravka Abadjieva, MD  
Clinical Center of Endocrinology  
and Gerontology  
6, Damian Gruev Str.  
1303 Sofia, Bulgaria

## Микроелементи и захарен диабет - реалности и надежди

С. Владева

Ендокринологична клиника

Висш медицински институт - Пловдив

## Microelements and Diabetes Mellitus - Realities and Expectations

S. Vladeva

Clinic of Endocrinology

Higher Medical Institute - Plovdiv

### Резюме

През последните години редица експериментални и клинични проучвания допринасят за изясняване на влиянието на микроелементите за човешкия организъм. Оказва се, че те имат незаменима роля в редица биохимични процеси. С особен акцент се изучава връзката им с канцерогенезата, оксидативния стрес, захарния диабет, сърдечно-съдовите заболявания.

В настоящия обзор се спираме на онези микроелементи, които показват особено тясна връзка с патогенезата на захарния диабет и развитието на диабетни усложнения - цинк, хром, манган, ванадий и селен. Счита се, че едновременното им участие в антиоксидантната защита на организма е от съществено значение и за терапевтичните перспективи на това заболяване.

**КЛЮЧОВИ ДУМИ:** захарен диабет, микроелементи, антиоксиданти.

### Abstract

Over the past few years, a number of experimental and clinical studies contribute greatly to gain better insight into the effect exerted by microelements on the human organism. As shown by the results, they have an essential practical bearing on a number of biochemical processes. Special emphasis is laid on assaying their relationship with cancerigenesis, oxidative stress, diabetes mellitus and cardiovascular diseases.

In the present review microelements particularly closely related to the pathogenesis of diabetes mellitus and development of diabetic complications are discussed, namely zinc, chromium, manganese, vanadium and selenium. The assumption is warranted that their simultaneous participation in antioxidant protection of the organism has important implications on the therapeutic outlooks of this condition.

**KEY WORDS:** diabetes mellitus, microelements, antioxidants.

С названието микроелементи са наречени метали, които нормално присъстват в много ниски концентрации в тялото (16). Според много автори техният брой надвишава 60, а биологичното им значение е различно. Концентрацията им в биологичните течности се движи в  $\mu\text{mol/l}$  и по-малко. Според клиничното им значение Цачев разделя микроелементите на три групи (3):

1. Есенциални микроелементи, които имат определени функции в организма и без които тези функции търпят дълбоки нарушения. В тази група се нареждат желязото (Fe), цинкът (Zn), хромът (Cr), силицийт (Si), кобалтът (Co), селенът (Se), молибденът (Mo), медта (Cu), ванадият (V).

2. Неесенциални микроелементи, използвани за лечебни цели: литий, злато, алуминий, платина.

3. Неесенциални микроелементи с подчертано токсично действие: олово, кадмий, живак.

Елементите от първата група са жизнено необходими и затова са наречени незаменими. Cotzias (19) предлага следните критерии за незаменимост на един елемент: а) елементът присъства във всички живи тъкани на всички живи организми; б) концентрацията на елемента е доста постоянна в представителите на един вид; в) отнемането на елемента от организма предизвиква едни и същи физиологични и структурни отклонения, независимо от вида на проучването; г) добавката на елемента възстановява или предотвратява тези отклонения; д) отклоненията, предизвикани от дефицит на елемента, винаги се съпровождат от съответни, специфични биохимични промени; е) биохимичните промени могат да бъдат предотвратени или излекувани, когато дефицитът се предотврати или излекува.

През последните 10-15 години има доста съобщения за безспорното участие на есенциалните микроелементи в почти всички обменни процеси (19, 32). Все по-често акцентът на проучванията се измества от експерименталните животни към човека. Изучава се тяхното антиоксидантно действие, ролята им при някои кръвни заболявания, влияние върху тиреоидята, канцерогенезата и профилактиката на рака (31, 24).

Влиянието на есенциалните микроелементи в патогенезата, клиниката и терапията на

захарния диабет (ЗД) не е напълно изяснено. В научната литература се срещат единични, несистемни и нецялостни проучвания относно връзката им с това социално значимо заболяване (23, 11, 27).

Твърде отдавна, през 1942 г., Okamoto използва хистохимични методи, за да демонстрира, че панкреасните бета-клетки съдържат значително количество **цинк**, и допуска, че съединения, способни да променят циркулиращите инсулинови нива, могат също да предизвикат дълбоки функционални промени в островите на Лангерханс (4). Значително по-късно беше доказано, че цинковите йони участват във вторичната инсулинова структура до образуването на хексамери. Днес вече никой не се съмнява, че ролята на този елемент във въглехидратната обмяна е фундаментална - просто без цинк няма инсулин. Независимо че връзката между диабета и нарушенията в метаболизма на Zn е наблюдавана и при хора, и при животни, точното й място в патогенезата на ЗД тип 1 остава неясно. При ЗД тип 2 често се намира хипоцинкемия, за която се счита, че влияе неблагоприятно на диабетния статус, може би самостоятелно или чрез увреда на антиоксидантните системи (31). Счита се, че както и при медта, плазмените нива на Zn са слаб показател за статуса на този елемент в организма. Независимо дали се намира повишена, ниска или нормална серумна концентрация на Zn при диабетици, във всички случаи цинкурията е увеличена (11). Според Sjogren et al. цинкурията вероятно отразява повишения *turn over* в мускулите при ЗД (31). Анализирането на този метал в светлината на късния дегенеративен синдром показва още по-подчертани смущения в неговия метаболизъм. Не е ясно дали отклоненията са следствие на диабета, или обратното - те са решаващи за изневята му. Концентрацията на Zn в питейната вода е тясно свързана с риска от развитие на ЗД. Едно 3-годишно наблюдение в Швеция потвърждава хипотезата, че експозицията на ниско съдържание на Zn в питейната вода повишава риска от последваща изневя на ЗД (18).

През последните години стана възможно определянето на цинковото съдържание в кръвните клетки и с това профилът на този елемент в организма придобива по-голяма детайлност.

И при двата типа ЗД се установява снижено съдържание на Zn в еритроцитите (29, 11).

По време на диабетна кетоацидоза е налице още по-ниско ниво на Zn в серума, но не се променя активността на Cu-Zn-супероксиддисмутаза (Cu-Zn-SOD). Този факт е интересен, тъй като споменатият антиоксидантен ензим мощно се противопоставя на липидната пероксидация, която улеснява микроваскуларните лезии при диабетни пациенти (14). И други съобщения визират липса на взаимовръзка между серумните нива на Zn и Cu-Zn-SOD (30).

Наблюденията при неинсулинозависими диабетици със затлъстяване показват, че хипоцинкемията е обратно пропорционална на индекса на телесна маса (ИТМ) и нивата на инсулин на гладно (10). Sprietsma отива още по-нататък, като изказва мнението, че добавката на Zn може да редуцира инсулиновата продукция и така дори да предотврати изявата на ЗД тип 2 (30). Ефектът на Zn върху редукцията на плазменото инсулиново ниво може да бъде свързан с директен ефект на намаляване на панкреасната инсулинова секреция или с индиректен ефект на Zn за облекчаване на периферните изисквания и утилизация на инсулина (12). Zn има инсулиноподобен ефект върху липогенезата само при ЗД тип 1. При ЗД тип 2 със затлъстяване Zn предизвиква повишена липогенеза само в комбинация с инсулин, което се дължи на усилен инсулинова активност, а не на инсулиноподобен ефект (12).

Освен всичко това, експериментално е показано, че Zn влияе върху централния регулатор на апетита - невропептид Y, с което въздейства на храненето, и в частност на приема на въглехидрати. Това е потвърдено от редица автори, които съобщават за благоприятния ефект на добавката на Zn при хора с инсулинова резистентност (10).

От 1950 г. се знае, че **хромът** е необходим на животните, за да се поддържа кръвната захар, но до 1970 г. не е била доказана есенциалната роля на Cr за човека. Тогава е установено, че в условия на продължително парентерално хранене с пълна липса на Cr в хранителния разтвор пациентите развиват ЗД и се налага инсулиново лечение. Това "диабетоподобно" състояние преминава едва след ежедневна добав-

ка на Cr (23). През 1978 г. West изказва предположението, че добавката на 5-валентен органичен хром може да подобри глюкозния толеранс, и дори характеризира хромния дефицит като възможна причина за малък процент случаи на ЗД тип 2 (22). Сега се знае, че Cr III е кофактор в отключването на периферното инсулиново действие - инсулиностимулираното поемане на глюкоза. Той може да улесни разменната реакция между SH-мембранни групи на рецепторното място и дисулфидните мостове на инсулина чрез участие в тройна комплексна формация (33). Дефицитът на Cr при експериментални животни се съчетава с нарушен глюкозен толеранс, изоставане в растежа, некротична дегенерация на черния дроб (9). Добавката на Cr в питейната вода повишава продължителността на живота, снижава серумното ниво на холестерола, намалява атеросклерозата на аортата (13). Хромният дефицит при ЗД протича с по-тежка невропатия. Навярно заради всичко това органичните съединения на Cr сполучливо са наречени общо "глюкозотолерансен фактор" (23).

Както тоталното съдържание на Cr в човешкото тяло, така и неговите плазмени концентрации намаляват прогресивно с възрастта. Това обаче не е така при диабетниците. Изглежда парадоксално серумната концентрация на един елемент да не се променя при заболяване, което в експериментални условия може да се предизвика или утежни от дефицит на същия този елемент (23).

Anderson et al. не говорят за дефицит буквално (5). Те изучават и подкрепят тезата, че нуждите от Cr се повишават със задълбочаване на глюкозния интолеранс и диабета. Благоприятните ефекти на този микроелемент те постигат с по-голяма дневна добавка на Cr от горната приета граница за нея. В това проучване след период от 2 и 4 месеца се отбелязва сигнификантно снижение на гликемията на гладно, 2 часа след нахранване, както и инсулинемията в същите два момента. Намален е още гликираният хемоглобин, както и общият серумен холестерол. Тези резултати вероятно имат комплексно обяснение и то касае методика и норми при определяне на серумната и уринната концентрация на Cr, определяне на реалния прием на елемента с храната и водата, а вероятно и съдържанието в ор-

ганизма на други елементи, имащи отношение към въглехидратния обмен съвместно или независимо от Cr.

Kovich и Anderson считат, че Cr увеличава броя на инсулиновите рецептори и улеснява свързването между тях и инсулина (9, 25). Strifler et al. предполагат, че Cr благоприятства първата фаза на инсулиновата секреция чрез въздействие върху  $Ca^{2+}$ -йонни канали и  $Ca^{2+}$ -съдържание в клетката. С този извънрецепторен механизъм на действие Cr подпомага преодоляването на съществуващото разминаване между инсулиновия секреторен пик и гликемичния постпрандиален пик - дефект, характерен за ЗД тип 2 със затлъстяване (25).

През 80-те години Gerald Reaven формулира понятието "метаболически синдром", при който комбинацията от висока кръвна захар, високо артериално налягане и отклонения в серумните липиди се базира на повишена инсулинова резистентност (25). Днес знаем, че инсулиновата резистентност е не само първа стъпка към изявта на ЗД тип 2, но тя съществува и при немалък процент от населението - това с наднормено тегло, със или без нарушение във въглехидратния толеранс. Комплексното участие на Cr в тези случаи бихме охарактеризирали пак най-точно с думите на Reaven: "Даже и да не се развие висока кръвна захар, инсулиновата резистентност не се изявява като нещо добро. Фактът, че един инсулинорезистентен човек може да не стане диабетик, не означава, че той няма да понесе последици в тази насока. В действителност с цената на повече инсулин ще бъде постигната компенсация за инсулинорезистентните места, но същевременно това ще изиграе важна роля в развитието и на артериалната хипертония, и на сърдечно-съдовите увреждания."

През 1968 г. Everson и Shrader провеждат два невероятни експеримента, с които започва опознаване на ролята на **мангана** в диабетологията. С помощта на манганов дефицит те предизвикват нарушен въглехидратен толеранс, който претърпява обратно развитие с добавка на Mn. При другия опит мангановият дефицит води до атрофия на островните клетки на панкреаса (31). Днес се приема, че този микроелемент повлиява въглехидратния метаболизъм по различни начини: стабилизира или активира

глюконеогенетичните ензими - фосфоенолпируват-карбоксил-киназа и глюкозо-6-фосфат-зависима от гликоген синтетаза; повишава съдържанието на гранули в бета-клетките на панкреаса, нормализира глюкозната утилизация, увредена от манганов дефицит (33).

Счита се, продължителният дефицит на този метал води до нарушена глюконеогенеза в неонаталния период, нарушен глюкозен толеранс, ниски плазмени инсулинови нива, намалени инсулинови синтез и секреция (31).

Интерес предизвиква едно проучване в Украйна, което третира проблема за еритроцитното съдържание на Mn при ЗД. Установяват се значимо по-ниски нива както при ЗД тип 1, така и при ЗД тип 2. С подобряване контрола на диабета се покачва концентрацията на Mn само в групата със ЗД тип 2 (29).

Редица автори поддържат противоположно становище - те говорят за "повишен статус" на Mn при диабет. Освен повишено серумно ниво те намират увеличено съдържание в някои органи - например черен дроб (7). Тези констатации са в съзвучие с повишената активност на тъканната манганова супероксиддисмутаза (Mn-SOD) при ЗД. Mn е незаменим компонент на този антиоксидантен ензим, който играе важна роля в интегритета на мембраната и клетъчните органели. На терена на ЗД това значи превенция на късния дегенеративен синдром (33).

Mn е абсолютно необходим за реализиране на инсулиновите ефекти на рецепторно и следрецепторно ниво. Установено е, че  $Mn^{2+}$  са най-подходящи за инсулиностимулираното фосфорилиране на инсулиновия рецептор - активиране на неговата бета-субстанция. В това отношение съществува синергизъм между  $Mn^{2+}$  и АТФ (2). Генерирането на вторични инсулинови медиатори е 100 пъти по-голямо в присъствие на Mn. Този микроелемент се включва в ефектите на инсулина върху редица прицелни молекули на следрецепторно ниво. Mn-зависимата цитозолна серилкиназа е субстрат за калмодулин-зависимата протеинкиназа, АТФ-цитратлиазата и ацетил-КоА-карбоксилазата (2). Може би неслучайно затова Mn е наречен "магическият клетъчен протектор".

През 1975 г. Heyliger et al. за първи път съобщават, че пероралното лечение с натриев

ортованадат предизвиква еугликемия и предотвратява развитието на сърдечни промени при плъхове със стрептозотоцинов диабет (34). Това е потвърдено от последващи проучвания, използващи други ванадиеви соли. Опитите показват, че тези съединения са ефективни и при спонтанен диабет при плъхове, както и при инсулино-резистентни плъхове.

През 1979 г. Tolman et al. показват, че *in vitro* ванадиевите съединения повишават глюкозния транспорт и окисление в адипоцити, стимулират гликогенния синтез в черния дроб и диафрагмата на плъхове и инхибират глюконеогенезата в хепатоцити (8). Оттогава е установено, че ванадиевите соли наподобяват доста инсулинови ефекти в различни клетки. В хепатоцити V улеснява гликолизата чрез потискане на фруктозо-2,6-бифосфатните нива или чрез индуциране на L-тип пируват-киназния ген. Освен това V снижава нивото на глюконеогенетичните ензими в чернодробната клетка. Експерименти с перфузиран черен дроб на плъх показват, че чернодробната глюкозна продукция е намалена с 60% в присъствие на ванадат в перфузионната среда (8).

В изолирани адипоцити ванадиевите съединения стимулират глюкозния транспорт с възстановяване на инсулин-чувствителните глюкозни преносители и улесняването на окислението на захарта. Те още активират липогенезата, инхибират липолизата и повишават липопротеинлипазната активност от мастната тъкан на плъхове (8).

В мускулите V предизвиква инсулиноподобни промени в глюкозния метаболизъм, но степента им е различна в зависимост от метаболитния път. Ванадатът улеснява глюкозното поемане, гликогенния синтез и гликолизата по-слабо от инсулина, но причинява по-голяма стимулация на лактата и глюкозното окисление (8).

Понастоящем инсулиноподобните качества на V се приписват на фосфорилирането на инсулиновия рецептор, което се осъществява или чрез активиране на тирозинкиназната активност на бета-субединицата на рецептора, или чрез инхибиране на фосфотирозилфосфатазата, която дефосфорилира рецептора.

Ванадият наподобява т. нар. вторични действия на инсулина - покачване на  $Ca^{2+}$  инф-

лукс, инхибиране на Ca, Mg - АТФаза в цитоплазмените мембрани, стимулиране на K-поемане и покачване на цитозолното pH.

Редица наблюдения разкриват действия на V на места, дистално от рецептора. Ванадиевите йони стимулират митогенактивираната протеинкиназа (МАП-киназа), което играе централна роля в инсулиновото сигнално предаване. Това стимулиране е независимо от фосфорилирането на инсулиновия рецептор. Освен това V активира една цитозолна, нерелепторна, инсулин-нечувствителна тирозинкиназа. Тези факти ясно показват, че ванадиевите йони заобикалят ранните етапи на каскадата фосфорилиране-дефосфорилиране, отключена от инсулина. Това повишава вероятността този елемент да повлиява глюкозния метаболизъм, даже когато инсулиновият предавателен път не е функционално изправен (19).

В литературата има малко съобщения за приложение на ванадиеви соли при хора със ЗД (8, 6). Наблюденията са върху малки групи и много предпазливи, тъй като все още не са напълно изяснени тератогенният ефект, влиянието върху хемопоезата и някои други странични ефекти. При ЗД тип 1 не се отбелязва съществено подобрене на гликемичния контрол, но дневните инсулинови нужди се снижават значително. При ЗД тип 2 се повишава периферната инсулинова чувствителност, гликемията на гладно се снижава с 20%. V осъществява и хипофагичен ефект, но промените в хипоталамичния регулатор на апетита - невропептид Y, са противоречиви (21).

Лечението с ванадат в експеримент потиска образуването на супероксидни радикали (28). На V още се приписват и прооксидантни качества - усилва липидната пероксидация в хепатоцити *in vitro*. Тези противоречия се обясняват с различието в използваните субстанции, дозата и модела на експеримент (20).

През 1979 г. Sato et al. за първи път съобщават за пероксидазно увреждане при двата типа ЗД (31). Те посочват, че в изграждането на антиоксидантната защита на организма активно участват онези микроелементи, които имат отношение към въглехидратния метаболизъм. Натрупани са доста научни аргументи за значението на свободните кислородни радикали в изявата на ЗД, а също и в развитието на специфичните усложнения на заболяването. Свръхпродук-

цията на свободни радикали, която в частност може да се стимулира от хипергликемия, води до интензивна пероксидация на липидите и по такъв начин улеснява процеса на атерогенезата. Свободните радикали ускоряват формирането на крайните продукти на гликирането, които от своя страна генерират нови свободни радикали (1). Всичко това тласка развитието на специфичните диабетни усложнения. Огромното значение на микроелементите в този процес е тяхното участие в т. нар. "очистващи" ензимни системи.

Един от най-мощните антиоксидантни елементи е **селенът**, като само за илюстрация ще подчертаем, че неговата сила надвишава 50-100 пъти тази на витамин Е (23). Преди всичко той е необходим за функцията на глутатион-пероксидазата - ензим, катализиращ деструкцията на хидрогенпероксида и липидните пероксиди. Оказва се, че тази функция на Se е тясно свързана и с влиянието му върху разнообразните патофизиологични процеси при ЗД. Ruiz et al. намират значително редуцирана активност на Se-глутатион-пероксидаза в еритроцитите при ЗД тип 1 с лош метаболитен контрол (26). Намалената антиоксидантна защита в тези случаи води до натрупване на липидни пероксиди и други оксидантни субстанции в еритроцитите, тромбоцитите, островите на Лангерханс, интимата на кръвонос-

ните съдове, очната леща и други тъкани. Може да се направи заключение, че дефицитът на Se, рефлектирайки в нарушен антиоксидантен статус, води до дисбаланс между оксиданти и антиоксиданти и представлява предразполагащ фактор за изява на диабет и развитие на късен дегенеративен синдром.

Добавката на Se в условия на експериментален диабет повлиява благоприятно въгледехидратната обмяна - намалява плазмената глюкоза и глюкозурията; отчасти нормализира експресията на чернодробни гликолитични и глюконеогенетични ензими (17).

Независимо от патогенетичната роля на селеновия дефицит при ЗД все още са противоречиви наблюденията относно статуса на Se при това заболяване (17). При експериментални животни по-често е намерен дефицит (31, 23). В проучване при деца с диабет са констатирани по-високи стойности в сравнение със здравите контроли (15).

Както проличава от изложеното, групата от цинк, манган, хром, ванадий и селен е особено важна за ЗД. Познаването на тези елементи дава възможност да се вникне по-дълбоко в патогенезата, клиничното развитие, а защо не и в лечебните перспективи на това социално значимо заболяване.

## КНИГОПИС/REFERENCES

1. Ангелова-Гатева, П., Н. Овчарова, М. Петкова, Д. Коев. Окислителен стрес при болни с недобре контролиран захарен диабет. *Ендокринология*, 1, 1996, 4.

2. Сираков, Л., В. Митев. Инсулин. Медицинска академия, София, 1991.

3. Цветкова, Т., Е. Накова, К. Цачев. Аналитични принципи при определяне на олигоелементи. В: Аналитични принципи и процедури в клиничната лаборатория. Уреди за измерване. Анализатори (ред. Т. Цветкова, Ст. Данев). Медицинско издателство ЕТ "Васил Петров" - ВАП, 2001, 589-598.

4. Adrian, J. Bone. Animal models of insulin-dependent diabetes mellitus. In: Textbook of diabetes (Eds. J. Pickup and G. Williams). Blackwell Sci. Publications, Oxford, 1991, 151-166.

5. Anderson, R. A., N. Cheng, N. A. Briden. Elevated intakes of supplemental chromium improve glucose and insulin variables in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes*, 1997, 46/11, 1786-1791.

6. Boden, G., X. Chen, J. Ruiz, G. Rossum, S. Turco. Effects of vanadyl sulfate on carbohydrate and lipid metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, 45, 1996, 9, 1130-1135.

7. Bond, J. S., M. L. Faile, D. F. Unger. Elevated manganese concentration and arginase activity in livers of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biol Chem*, 258, 1983, 8004-8009.

8. Brichard, S., J.-C. Henquin. The role of vanadium in the management of diabetes. *TIPS*, 16, Aug. 1995, 265-270.

9. Chagas, E., K. Kovich, A. Renteria, M. Spiehs. Effects of supplemental chromium in type 2 diabetes. *Am. Diab. Ass. Diab. Facts and Fig.* <http://www.diabetes.org/ada/c20f.asp>.

10. Chen, M.-D., P.-Y. Lin, W. H. Sheu. Zinc status in

plasma of obese individuals during glucose administration. *Biol Trace El Res*, 60, 1997, 123-129.

11. Chen, M.-D., P.-Y. Lin, C.-T. Tsou, J.-J. Wang, W.-H. Lin. Selected metal status in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Biol Trace El Res*, 50, 1995, 119-124.

12. Chen, M.-D., S.-J. Liou, P.-Y. Lin, V. C. Yang, P. S. Alexander, W.-H. Lin. Effects of zinc supplementation on the plasma glucose level and insulin activity in genetically obese (ob/ob) mice. *Biol Trace El Res*, 61, 1998, 303-311.

13. Earle, K. E., A. G. Archer, J. E. Ballie. Circulating and excreted levels of chromium, body mass index, hypoglycemic drugs, and presence and absence of diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*, 49, 1989, 685-689.

14. Faure, P., P. Corticelli, M. J. Richard, J. Arnaud, C. Coudray, S. Halimi, A. Favier, A. M. Roussel. Lipid peroxidation and trace element status in diabetic ketonic patients: influence of insulin therapy. *Clin Chem*, 39, 1993, 5, 789-793.

15. Gebre-Medhin, M., V. Ewald, L. O. Platin, T. Tuvemo. Elevated serum selenium diabetic children. *Acta Paediatr Scand*, 73, 1984, 109-114.

16. Guidotti, T. L., R. J. Audette, C. J. Martin. Interpretation of the trace metal analysis profile for patients occupationally exposed to metals. *Occup Med*, 47, 1997, 8, 497-503.

17. Hadrzynski, C. Diabetes and trace elements. *J Trace El Exper Med*, 12, 1999, 4, 367-374.

18. Hadlund, B., K. Ryckenberg, O. Selinus, G. Dahlquist. Evidence of a relationship between childhood-onset type 1 diabetes and low groundwater concentration of zinc. *Diab Care*, 19, 1996, 8, 873-875.

19. Harland, B., B. A. Harden-Williams. Is vanadium of human nutritional importance yet? *J Amer Diet Assoc*, 94, 1994, 8, 891-894.

20. Krejsa, C. M., S. G. Nadler, J. M. Esselstyn, T. G. Kavanagh, J. A. Ledbetter, G. L. Schieven. Role of oxidative stress in the action of vanadium phosphotyrosine phosphatase inhibitors. *J Biol Chem*, 1997, 11541-11549.

21. McNeill, J. H. Oral vanadium and lowering blood glucose. *Letter Diabetes*, 43, Oct. 1994.

22. Mike, E., J. Lean, I. Man. Obesity, body fat distribution and diet in the aetiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus. In: Textbook of diabetes (Eds. J. Pickup, G. Williams). Blackwell Sci. Publications, Oxford, 1999, 181-191.

23. Mooradian, A. D., M. Failla, B. Hoogwerf, M. Maryniuk, J. W.-Rosett. Selected vitamins and minerals in diabetes. *Diab Care*, 17, 1994, 5, 464-479.

24. Ongajooth, L., A. Likidlilid, C. Shayakul, S. Ongajooth, Y. Chantachum, S. Nilwarangkur. Role of lipid peroxidation, trace elements and antioxidant enzymes in chronic renal disease patients. *J Med Assoc Thai*, Dec. 1996, 791-800.

25. Reaven, G. M. Role of insulin resistance in human

disease. *Diabetes*, 37, 1988, 12, 1595.

26. Ruiz, C., A. Alegria, R. Barbera, R. Farre, M. J. Lagarda. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in patients with type 1 diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest*, 59, 1999, 2, 99-105.

27. Rukauger, M., J. Klein, J. D. Kruse-Jarres. Reference values for the trace elements copper, manganese, selenium and zinc in the serum/plasma of children, adolescents and adults. *J Trace El Med Biol*, 11, 1997, 92-98.

28. Sekar, N., J. Li, Y. Shechter. Vanadium salts as insulin substitutes: mechanism of action, a scientific and therapeutic tool in diabetes mellitus research. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, Dec. 1996, 31 (5-6), 339-359.

29. Shvets, N. V., L. D. Kramarenko, S. V. Vydyborets, S. N. Gaidukova. Disordered trace element content of the erythrocytes in diabetes mellitus. *Vrach Delo (Ukraine)*, Jan. 1994, 52-55.

30. Spietsma, J. E., G. E. Schuitemaker. Diabetes can be prevented by reducing insulin production. *Med Hypotheses*, 42, 1994, 1, 15-23.

31. Strain, J. J. Disturbance of micronutrient and antioxidant status in diabetes. *Proc Nutr Soc*, 1991, 50, 591-604.

32. Struck, H., B. Hillesheim. Spurenelemente: Bedeutung und Altersabhängigkeit. *Z Gerontologie*, 23, 1990, 152-154.

33. Tsalev, D. L., Z. K. Zaprianov. Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice, vol. I. Analytical aspects and health significans, 1993.

34. Yao, J., M. L. Battel, J. H. McNeil. Acute and chronic response to vanadium following two methods of streptozotocin-diabetes induction. *Can J Physiol Pharmacol*, 1997, 2, 75-92.

#### АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Д-р С. Владева  
Ендокринологична клиника  
Висш медицински институт  
ул. "Васил Априлов" 15 А  
Пловдив 4002

#### ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

S. Vladeva, MD  
Clinic of Endocrinology  
Higer Medical Institute  
15 A, Vasil Aprilov Str.  
4002 Plovdiv, Bulgaria

## Оценка на ефекта на Reductil (Sibutramine hydrochloride) при лечение на пациенти със затлъстяване

Ж. Бонева, Вл. Христов\*

Отделение по ендокринология, МИ - МВР - София

\*Клиника по ендокринология, МБАЛ "Александровска" - София

## Reductil (Sibutramine Hydrochloride) Effect in Treating Obese Patients

Zh. Boneva, Vl. Christov\*

Department of Endocrinology, Hospital of the Ministry of Internal Affairs - Sofia

\* Clinic of Endocrinology, Alexandrov's Hospital - Sofia

### Резюме

Ефективното лечение на затлъстяването значително намалява риска от развитие на съпътстващи го заболявания и значително понижава смъртността. Reductil (сIBUTРАМИН хидрохлорид) е серотонин (5-HT) и норадреналин (NA), реуптейк инхибитор (SNRI). Той обуславя дозо-зависимо понижаване на телесното тегло чрез двоен механизъм на действие - намалявайки хранителния прием и увеличавайки енергийния разход.

Цел на настоящото проучване беше да се проследи ефектът на Reductil при лечение на затлъстели пациенти, показани за медикаментозно лечение.

Пациенти и методи: Проспективно 12-седмично открито проучване при 35 пациенти

### Abstract

Effective treatment of obesity may reduce substantially the risk of overweight comorbidities, and accordingly result in mortality rate decrease. Sibutramine hydrochloride (Reductil) is a serotonin (5-HT) and noradrenalin (NA) reuptake inhibitor (SNRI). It conditions dose-dependent weight loss among obese patients by a dual mechanism of action: food intake reduction and energy expenditure increase.

The aim of the present study is to assay Reductil effect in treating obese patients indicated for pharmacotherapy.

Patients and methods: 35 patients with overweight and obesity are covered by a prospective 12-week open study. The patients are given

с наднормено тегло и затлъстяване, лекувани с 15 mg Reductil дневно и разделени на три групи:

I група: пациенти с ИТМ  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> без съпътстващи заболявания;

II група: пациенти с ИТМ  $\geq 27$  kg/m<sup>2</sup> с нарушен глюкозен толеранс (НГТ);

III група: пациенти с ИТМ  $\geq 27$  kg/m<sup>2</sup> със захарен диабет тип 2.

Резултати: Средното намаление на телесното тегло в края на първия месец беше  $4,22 \pm 2,2$  kg, а в края на третия -  $9,46 \pm 4,2$  kg ( $P < 0,00001$ ). 88,57% от пациентите намалиха теглото си с повече от 5%, 40% - с повече от 10% в сравнение с изходното ( $P < 0,00001$ ). ИТМ се понижи сигнификантно от  $36,33 \pm 6,82$  до  $33,09 \pm 5,91$  ( $P < 0,0000001$ ). Биоимпедансното изследване показва, че загубата на тегло е предимно за сметка на мастната маса. Отчето се статистически значимо намаление на обиколката на талията, подобрене на ОГТТ, HbA<sub>1c</sub> и параметрите на липидния профил. Не бяха регистрирани значими странични ефекти.

Извод: Сибутрамин (Reductil) е отличен медикамент за лечение на затлъстяването, и особено при пациенти с метаболитен синдром.

---

**КЛЮЧОВИ ДУМИ:** затлъстяване, мастна маса, ИТМ, метаболитен синдром, Reductil.

---

Затлъстяването е един от главните здравни проблеми на съвременното както в развитите, така и в развиващите се общества. Висцералното затлъстяване и заседналият начин на живот са основни фактори за развитието на множество съпътстващи заболявания. Намалението на телесното тегло значимо понижава риска от болестност и смъртност, свързани с развитието на захарен диабет тип 2, дислипидемия, артериална хипертония и исхемична болест на сърцето. Лечението на затлъстяването включва подходящо съчетание на базисни подходи (диетичен режим, физическа активност, поведенческа терапия) и медикаментозно и/или хирургическо лечение (2, 13). Много малко са пациентите със затлъстяване, които могат да постигнат и поддържат ре-

Reductil at 15 mg daily dose, and distributed into 3 groups, as follows:

I group - patients with BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> free of concomitant diseases;

II group - patients with BMI  $\geq 27$  kg/m<sup>2</sup> with glucose tolerance (IGT) impairment;

III group - patients with BMI  $\geq 27$  kg/m<sup>2</sup> with diabetes mellitus type 2.

Results: At the end of the first and third month, the average body weight decrease is  $4,22 \pm 2,2$  kg and  $9,46 \pm 4,2$  kg, respectively ( $P < 0,00001$ ). 88,57% of the patients lose more than 5% of baseline body weight and 40% - more than 10% ( $P < 0,00001$ ). BMI decreases significantly from  $36,33 \pm 6,82$  to  $33,09 \pm 5,91$  ( $P < 0,0000001$ ). As shown by bioimpedance study body weight reduction occurs mainly at the expense of fat mass. The latter decreases significantly from  $44,02 \pm 15,5$  to  $36,66 \pm 14,3$  kg ( $P < 0,00001$ ). Also there is statistically significant decrease in waist circumference, OGTT, HbA<sub>1c</sub> and lipid parameters. No significant side effects are recorded.

Conclusion: Sibutramine (Reductil) is a drug yielding optimal effect in obesity treatment, especially in patients presenting metabolic syndrome.

---

**KEY WORDS:** obesity, fat mass, metabolic syndrome, Sibutramine hydrochloride.

---

дукция в теглото си единствено чрез диета и физически упражнения. Това важи особено за пациентите със захарен диабет поради факта, че повечето антидиабетни лекарства водят до повишение на теглото (12,14). Показанията за медикаментозно лечение на затлъстяването са:

1) Индекс на телесна маса (ИТМ)  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>;

2) ИТМ  $\geq 27$  kg/m<sup>2</sup> с наличие на съпътстващи заболявания (3).

Прогностичен фактор за ефективността на лечението е началната загуба на тегло в края на първия месец. Повечето автори определят като non responders пациентите, намалили теглото си с по-малко от 1,81-2 kg през този период (6).

Медикамент от нов клас за лечението на

затлъстяването е Reductil (Sibutramine) (10, 16). Той е инхибитор на обратното захващане на серотонина и норадреналина с двоен механизъм на действие - ускорява настъпването и увеличава чувството за ситост и повишава термогенезата (5, 10, 16). Редица плацебо-контролирани проучвания с голяма продължителност както и наскоро приключилото многоцентрово европейско проучване STORM (Sibutramin Trial of Obesity Reduction and Maintenance) убедително показва, че Reductil е високо ефективен медикамент както за понижаване, така и за поддържане на телесното тегло и има редица положителни ефекти върху метаболитния профил на пациентите (1, 4, 7).

**Цел** на настоящото проучване е да се проследи ефектът на препарата Reductil при пациенти с наднормено тегло и затлъстяване.

## ПАЦИЕНТИ И МЕТОДИ

В 12-седмично проспективно открито проучване бяха включени 35 пациенти с наднормено тегло и затлъстяване, разделени в три групи:

I група: пациенти с ИТМ  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> без съпътстващи заболявания;

II група: пациенти с ИТМ  $\geq 27$  kg/m<sup>2</sup> с нарушен глюкозен толеранс (НГТ);

III група: пациенти с ИТМ  $\geq 27$  kg/m<sup>2</sup> със захарен диабет тип 2 с давност на диабета до 5 години, на диетолечение или на перорално лечение на диабета.

Средната възраст на пациентите беше 41,31  $\pm$  18 години, жени / мъже - 24 / 11, среден ИТМ - 36,33  $\pm$  6,22 kg/m<sup>2</sup> (таблица 1); доза на Reductil - 15 mg дневно, като при пациенти с ИТМ  $< 30$  kg/m<sup>2</sup> се започна с Reductil 10 mg дневно в продължение на 7 дни.

Наблюдавани показатели:

- Телесно тегло, ИТМ, абсолютна и процентна стойност на мастната маса, метаболитна скорост в покой, определени посредством биоелектрически импеданс (апарат Танита)

- Обиколка на талията, съотношение талия / ханш

- ОГТТ - 0 и 120 минути
- ИРИ на гладно
- HbA<sub>1c</sub> (%)

**Таблица 1.** Основни характеристика на пациентите  
**Table 1.** Baseline characteristics of patients

Показатели/ Characteristics	Брой пациенти (%) / n (%)
Пол / Sex	
- мъже / male	11 (31,43 %)
- жени / female	24 (68,57 %)
Възраст (години): средно $\pm$ SD Age (y): mean $\pm$ SD	41,31 $\pm$ 18
Ниво на физическа активност/ Rate of physical activity	
- ниско / low	35 (100%)
- умерено / intermediate	0
- високо / high	0
Фамилна обремененост за затлъстяване/ Obesity in family history	17 (48,57 %)
Възраст за поява на наднорменото тегло (години)/ Age of appearance of overweight (y)	
< 11	1 (2,86 %)
12-17	12 (34,29 %)
18-29	11 (31,43 %)
> 30	11 (31,43 %)
Пушачи / Smokers	14 (40%)
Предшестващи опити за понижаване на теглото/ History of previous attempts at weight loss	15 (42,86 %)

- Общ холестерол (ОХ), триглицериди (ТГ), HDL, LDL

- Артериално налягане и пулсова честота

Според дизайна на проучването пациенти с телесна загуба, по-малко от 2 kg за първия месец, трябваше да отпаднат като неотговарящи на лечението. На пациентите беше препоръчана хипокалорийна диета, основана на индивидуалните 24-часови енергийни нужди и 600 kcal енергиен дефицит (15). Индивидуалните енергийни нужди бяха определени чрез умножение на метаболитната скорост в покой (Resting metabolic rate - RMR) и индекса на физическа активност, който в случая беше 1,3, тъй като всички пациенти, участващи в проучването, имаха ниско ниво на физическа активност. RMR беше определен чрез биоелектрически импеданс (BI) и по формулата на Mifflin et al. (9, 11):

$$\text{RMR} = 9,99 \times \text{weight (kg)} + 6,25 \times \text{height (cm)} - 4,92 \times \text{age (y)} + 166 \times \text{sex (male} = 1; \text{female} = 0) - 161.$$

Установена беше значима корелация

между стойностите на RMR, получени по двете методики ( $r = 0,82$ ,  $p < 0,0001$ ).

Първоначално в проучването бяха включени 36 пациенти. Впоследствие отпадна един по причини, несвързани с медикамента. Резултатите са обработени по методите на вариационния анализ и са представени като средна стойност  $\pm$  SD. За достоверни се приемат разлики при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

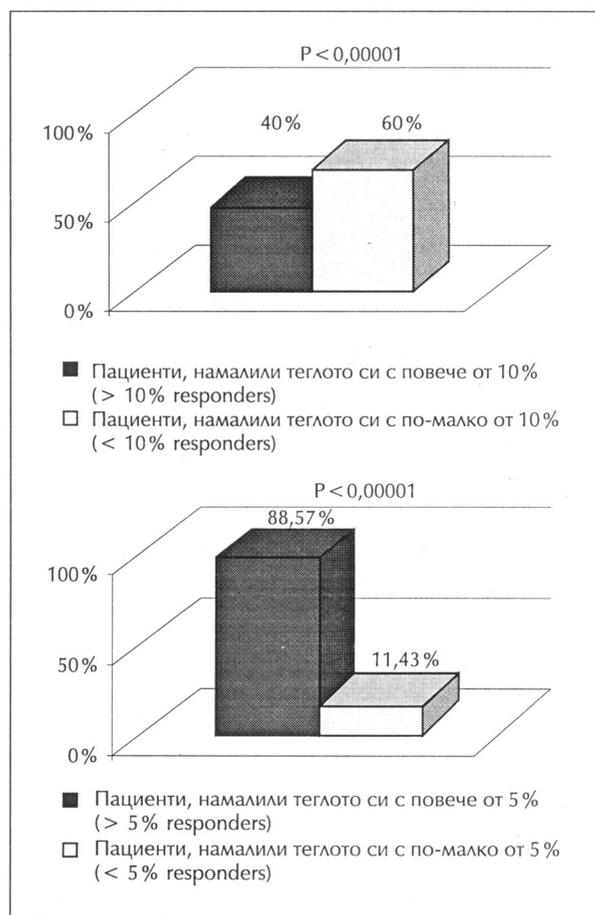
### Промяна в антропометричните показатели (таблица 2)

В края на първия месец всички пациенти показаха повече от 2 kg понижение на телесното тегло.

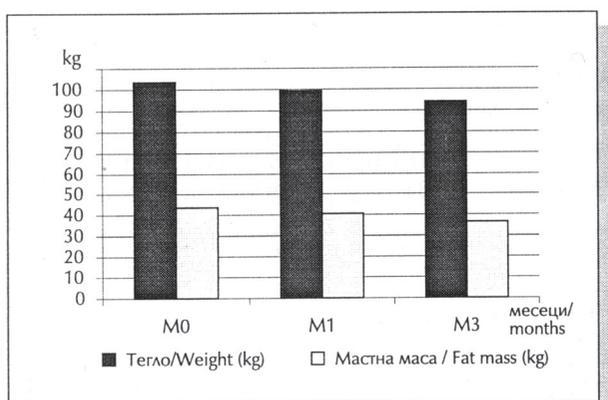
Средното намаление на теглото в края на първия месец беше  $4,22 \pm 2,2$ , а в края на третия -  $9,46 \pm 2,4$  ( $P < 0,00001$ ). Най-голямо понижение на теглото се установи при групата с НГТ -  $11,06 \pm 4,07$  kg, и при групата с диабет -  $9,9 \pm 5,02$  kg, като най-нисък темп на отслабване се регистрира при първата група -  $8,1 \pm 3,48$  kg. Понижението на теглото при жените беше почти два пъти по-голямо в сравнение с мъжете - съответно  $12,28 \pm 6,17$  срещу  $6,33 \pm 3,48$  kg ( $P < 0,001$ ). Средната загуба на телесно тегло в проценти беше  $9,28 \pm 3,78\%$ . 88,57% от пациентите редуцираха теглото си с  $\geq 5\%$  и имаха темп на телесна редукция  $\geq 2$  kg на месец, а 40% от пациентите отслабнаха с  $\geq 10\%$  в сравнение с изходното ( $P < 0,00001$ )(фиг. 1).

Таблица 2. Промяна в антропометричните показатели и RMR при лечение с Reductil  
Table 2. Changes in anthropometric characteristics and RMR

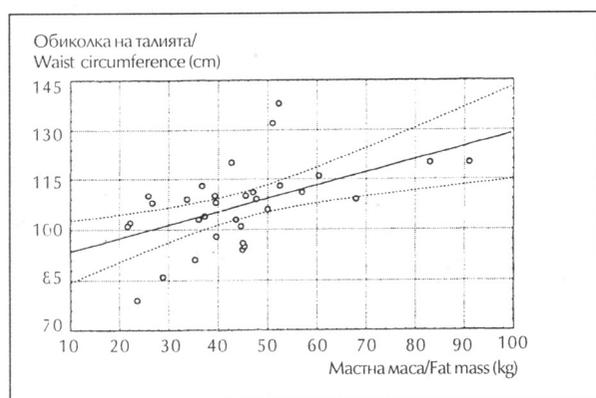
Показатели / Characteristics	Изходно / Baseline	4 седмица / Week 4	12 седмица / Week 12	P
Телесно тегло (kg) (средна стойност $\pm$ SD) / Weight (kg) (mean $\pm$ SD)	103,41 $\pm$ 20,56	99,19 $\pm$ 20,56	93,95 $\pm$ 19,76	0,0001
ИТМ / BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	36,33 $\pm$ 6,22	34,94 $\pm$ 6,23	33,09 $\pm$ 5,91	0,00001
Масна маса / Fat mass (kg)	44,02 $\pm$ 15,54	40,81 $\pm$ 15,33	36,66 $\pm$ 14,31	0,0001
Масна маса / Fat mass (%)	41,73 $\pm$ 8,38	39,84 $\pm$ 8,84	38,06 $\pm$ 9,08	0,00001
Обиколка на талията / Waist circumference (cm)	107,80 $\pm$ 11,79	103,94 $\pm$ 11,31	99,71 $\pm$ 11,09	0,0001
Отношение T/X / WHR	0,87 $\pm$ 0,10	0,87 $\pm$ 0,09	0,85 $\pm$ 0,08	0,01
RMR (kcal/24 h)	1865,51 $\pm$ 304,66	1817,06 $\pm$ 300,76	1760,14 $\pm$ 299,15	0,001
RMR (kcal/kg/24 h)	18,20 $\pm$ 2,4	18,67 $\pm$ 2,1	18,88 $\pm$ 2,6	0,082



Фиг. 1. 5 % и 10 % респондери след тримесечно лечение  
Fig. 1. 5% and 10% responders after 3 months treatment

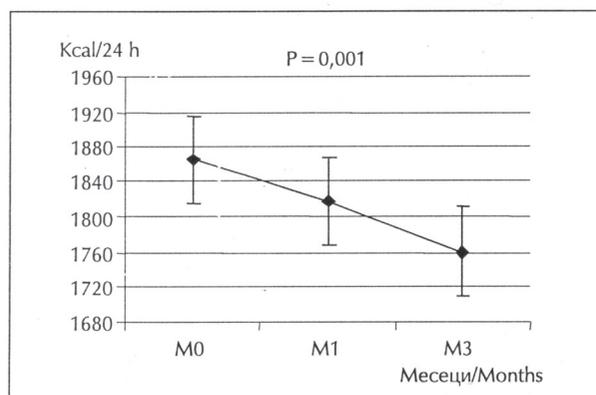


**Фиг. 2.** Промяна на телесното тегло и масната маса (kg)  
**Fig. 2.** Changes in body weight and fat mass (kg)



**Фиг. 3.** Корелация между масна маса (kg) и обиколка на талията (cm) ( $r = 0,51$ )

**Fig. 3.** Correlation between fat mass (kg) and waist circumference (cm) ( $r = 0,51$ )



**Фиг. 4.** Средно намаление на метаболитната скорост в покой (0-3 месец)

**Fig. 4.** Mean reduction in RMR (0-3 months)

71,43% от пациентите, отслабнали с повече от 10% в сравнение с изходното, нямат фамилна анамнеза за затлъстяване; при 85,71% от тях затлъстяването е възникнало след 18-годишна възраст и 64,29% нямат предшестващи опити за понижаване на теглото. При всички пациенти, отслабнали по-малко от 5%, затлъстяването е възникнало преди 18-годишна възраст, а 94% от тях имат фамилна анамнеза за затлъстяване. Известно е, че наднорменото тегло, възникнало в детска и юношеска възраст, т. нар. хиперпластично затлъстяване, по-трудно се поддава на лечение в сравнение с хипертрофичното затлъстяване, което стартира след пубертета (2, 3).

Отчете се достоверно намаление на ИТМ от средно  $36,33 \pm 13,22 \text{ kg/m}^2$  в началото на проучването на  $33,09 \pm 12,1 \text{ kg/m}^2$  в края му ( $p < 0,00001$ ).

Сигнификантно значимо беше намалението на параметрите на масната маса, отчетени с биоимпеданс, както в абсолютна, така и в процентна стойност (таблица 2). Средната загуба на масна маса в края на третия месец беше  $7,36 \pm 12,76 \text{ kg}$  ( $p < 0,0001$ ), което показва, че отслабването при лечение с Reductil е предимно за сметка на масната маса (фиг. 2).

При обиколката на талията се отчете сигнификантно намаление от средно  $107,8 \pm 11,79 \text{ cm}$  на  $99,71 \pm 11,09 \text{ cm}$  ( $p < 0,0000001$ ), докато намалението в съотношението Т/Х не беше сигнификантно значимо. В началото на проучването всички пациенти имаха обиколка на талията, по-голяма от 88 cm за жените и 102 cm за мъжете, което се свързва с повишен риск от развитие на метаболитни усложнения и ССЗ. В края на проучването 20% от пациентите постигнаха намаление на талията под тази граница.

Отчете се интересна корелация между абсолютната и процентната стойност на масната маса и обиколката на талията както в началото, така и в края на проучването с коефициент на корелация съответно 0,51 и 0,48 (фиг. 3). Такава корелация не беше намерена между параметрите на масната маса и съотношението Т/Х.

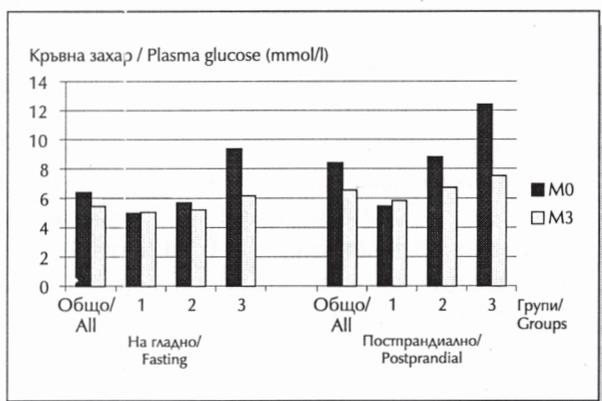
Намалението на телесното тегло нормално води до понижаване на метаболитната скорост в покой (RMR) (9). В края на проучването изчисленото по формулата на Mifflin et al намаление на RMR беше по-голямо в сравнение с

реално отчетеното чрез биоимпеданса. Освен това отнесената на килограм телесно тегло метаболитна скорост в покой се повиши, макар и не сигнификантно, от  $18,20 \pm 2,4$  на  $18,88 \pm 2,6$  kcal/kg/24 h в края на третия месец ( $P=0,082$ ). Тези резултати вероятно се дължат на термогенния ефект на Reductil (фиг. 4).

### Промяна в лабораторните показатели

Заедно с понижението на телесното тегло при лечение с Reductil се постигна подобрение в стойностите на наблюдаваните лабораторни показатели. Намалението на кръвната захар на гладно беше сигнификантно значимо при групата със захарен диабет - от  $9,4 \pm 2,43$  на  $6,19 \pm 0,96$  mmol/l ( $P < 0,001$ ). Постпрандиалната кръвна захар при третата група намаля от  $12,44 \pm 4,22$  на  $7,56 \pm 0,69$  mmol/l ( $P < 0,001$ ), а при втората група от средно  $8,77 \pm 0,78$  на  $6,75 \pm 0,96$  mmol/l ( $P < 0,001$ ). 80% от пациентите с нарушен глюкозен толеранс го нормализираха в края на проучването. Половината от пациентите с декомпенсиран захарен диабет постигнаха отличен, а останалите много добър контрол на диабета без промяна в антидиабетното лечение, а при един пациент се постигна излизане от това лечение с понижението на теглото (фиг. 5).

HbA<sub>1c</sub> достоверно намаля при групата със захарен диабет - от  $8,64 \pm 1,87\%$  на  $7,21 \pm 0,93\%$  ( $P < 0,007$ ). При 80% от диабетичите HbA<sub>1c</sub> намаля с  $\geq 0,5\%$ , а при половината от тях с  $\geq 1\%$



Фиг. 5. Промяна в кръвната захар на гладно и постпрандиално

Fig. 5. Changes in fasting and postprandial plasma glucose

Таблица 3. Промяна в параметрите на липидния профил на гладно при лечение с Reductil 15 mg

Table 3. Changes in lipid parameters following 12 weeks treatment with Sibutramine 15 mg

Показатели/ Indicators	Изходно/ Baseline	12 седмица/ Week 12	Разлика/ Difference	P
ОХ/Тchol (mmol/l)	$5,79 \pm 1,22$	$5,37 \pm 1,03$	$0,4 \pm 0,8$	0,003
ТГ/ТG (mmol/l)	$1,82 \pm 1,0$	$1,61 \pm 0,82$	$0,2 \pm 0,6$	NS
LDL (mmol/l)	$3,62 \pm 1,14$	$3,19 \pm 0,90$	$0,45 \pm 0,9$	0,006
HDL (mmol/l)	$1,39 \pm 0,33$	$1,46 \pm 0,34$	$0,07 \pm 0,3$	NS

без промяна в хипогликемизиращата терапия.

ИРИ на гладно намаля от средно  $33,61 \pm 15,76$  mU/l на  $29,51 \pm 11,53$  mU/l ( $P < 0,09$ ), като намалението беше най-голямо в третата група, но разликите не са достоверно значими.

Отчетено беше подобрение на всички параметри на липидния профил, но сигнификантно значимо беше намалението в стойностите на ОХ и LDL-холестерола (таблица 3). По-голямата редукция в теглото резултира в по-ниски стойности на липидите, а най-изразено беше подобрението на липидния профил в групата със захарен диабет, въпреки че разликите не бяха достоверно значими ( $P = 0,08$ ).

Артериалното налягане незначимо се повиши с 1-2 mm Hg предимно през първите седмици от лечението, като в края на третия месец с понижението на телесното тегло систолното артериално налягане се понижи средно с 1-2 mm Hg от средно  $128,29 \pm 13,6$  mm Hg на  $127,29 \pm 8,43$  mm Hg, докато диастолното остана без промяна. При петима болни с артериална хипертония се постигна излизане от антихипертензивната терапия.

### Странични ефекти

Адренергичното действие на Reductil резултира в повишение на пулсовата честота средно с  $6,6 \pm 4$  удара в минута от средно  $75,14 \pm 4,69$  удара в минута на средно  $81,77 \pm 4,65$  в края на проучването.

При половината от пациентите имаше леко изразено съхнене на устата, при 3% от тях - констипация. Не бяха регистрирани значими

странични ефекти, които да наложат преустановяване на лечението.

## ОБОБЩЕНИЕ

Лечението с Reductil 15 mg и диета за 3-месечен период води до:

- Достоверно понижение на телесното тегло, което е главно за сметка на мастната маса
- Достоверно понижение на обиколката на талията, което предполага намаление на висцералното мастно депо
- По-добър контрол на захарния диабет и подобрение на глюкозния толеранс при пациенти с НГТ, което се постига с понижението на теглото без промяна в хипогликемизиращата терапия при диабетичите

- Подобрене на параметрите на липидния профил, което показва зависимост от степента на отслабването и е най-изразено при пациентите със захарен диабет

Reductil (Sibutramine) е отличен избор за медикаментозно лечение на затлъстяването, и особено при пациенти с метаболитен синдром, тъй като съдейства за подобрение на множество сърдечно-съдови рискови фактори. Медикаментът има много добра поносимост без значими странични ефекти. Особено ценно е, че добрата му ефикасност по отношение потискането на апетита и възможността да бъде прилаган продължително време създават условия за промяна в хранителните навици на пациентите. Този факт е важна перспектива за поддържане на постигнатото намаление в теглото в дългосрочен план.

## КНИГОПИС / REFERENCES

1. Христов, Вл. Затлъстяване и сърдечно-съдов риск. Роля на препарата Редуктил (Сибутрамин) за редукия на телесното тегло. *Българска кардиология*, 4, 2000, 25-28.
2. AACE/ACE Obesity Task Force. AACE/ACE position statement on the prevention, diagnosis and treatment of obesity. *Endocr Pract*, 4, 1998, 5, 297-329.
3. Aronne, L. J. Modern medical management of obesity: The role of pharmaceutical intervention. *Journal of ADA*, Oct. 1998, S23-S26.
4. Astrup, A., et al in the STORM Study Group - Effect of Sibutramine on weight maintenance after weight-loss. *Lancet*, Dec. 2000, vol. 356, 2119-2125.
5. Bray, G. A. et al. Sibutramine produces dose-related weight loss. *Obes Res*, 1999, vol.7, 189-198.
6. Dhuran Jofhar, N. V. et al. Initial weight loss as a predictor of response to obesity drugs. *Int J Obes*, 1999, 23, 1333-1336.
7. Hansen, D. L. et al. Predictors of weight loss and maintenance during 2 years of treatment by Sibutramine in obesity. Results from the European multicentre STORM trial. *Int J Obes*, 2001, vol. 25, 496-501.
8. Kopelman, P. G. The management of obesity and related disorders. UK London, Martin Dunitz Ltd., 2001.
9. Mifflin, M. D. et al. A new predictive equation for resting energy expenditure in healthy individuals. *Int J Clin Nutr*, 1990, vol 51, 241-247.
10. Ryan, D. H, G. A. Bray. Sibutramine: A new agent for obesity treatment. *Obes Res*, 1995, vol. 4, 553-559.
11. Schar Fetter, H. et al. Assessing abdominal fatness with local bioimpedance analysis: basics and experimental findings. *Int J Obes*, 2001, vol. 25, 4, 502.
12. Scheen, A., P. S. Lefebvre. Antiobesity pharmaco-

therapy in the management of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, 2000, vol. 16, 114-124.

13. The Clinical guidelines on the identification, evaluation and treatment of overweight and obesity in Adults - NAASO U.S. N/H Publication, Oct. 2000, №00-4084.

14. Tsui, E. Y. L., X. J. Gao, B. Zieman. Bioelectrical impedance. *Diabet Med*, 1998, vol. 15, 125-128.

15. UK Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*, 1998, vol. 322, 837-853.

16. Wadolen, T. A. Treatment of obesity by moderate and severe caloric restriction: results of clinical research trials. *Arch Intern Med*, 1993, vol. 119, 668-693.

17. Wirth, A, J. Krause. Long-term weight loss with Sibutramine a randomized placebo-controlled trial. *JAMA*, 2001, № 11, vol. 285, 1331-1339.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ  
Д-р Ж. Бонева  
Отделение по ендокринология  
Болница на МВР  
бул. Ген. Скобелев 79, София 1000

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE  
Zh. Boneva, MD  
Department of Endocrinology  
Hospital of The Ministry of Internal Affairs  
79, Gen. Skobelev blvd.  
1000 Sofia, Bulgaria

## УКАЗАНИЯ ЗА АВТОРИТЕ / INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Списание

**ЕНДОКРИНОЛОГИЯ** ISSN 1310-8131

Българско дружество по ендокринология

Journal

**ENDOCRINOLOGIA** ISSN 1310-8131

Bulgarian Society of Endocrinology (BSE)

**Адрес на редакционната колегия:**

Специализирана болница за активно лечение по ендокринология, нефрология и геронтология „Акад. Иван Пенчев“  
Проф. Б. Лозанов или доц. Ф. Куманов  
ул. „Д. Груев“ 6, 1303 София  
тел. (02) 987 7201; факс (02) 874 145

**Editorial Board Address for Correspondence:**

Clinical Center of Endocrinology and Gerontology  
Prof. B. Lozanov or Assoc. Prof. Ph. Kumanov  
6, D. Gruev Str., 1303 Sofia – Bulgaria  
Tel (0359) (02) 987 7201; Fax (0359) (02) 874 145

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

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

Обемът на представените работи не трябва да превишава 10 стандартни страници – за оригиналните статии, 12 страници – за обзорните статии, 3–4 страници – за казуистичните съобщения, 4 страници – за информации относно научни прояви в България и в чужбина, както и за научни дискусии, 2 страници – за рецен-

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

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

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

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

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

Структурата на статиите трябва да отговаря на следните изисквания:

#### **Титулна страница**

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

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

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

#### **Основен текст на статията**

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

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

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

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

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

#### **Title page**

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

#### **Text of the article**

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

#### **Illustrations**

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

### Илюстрации и таблици

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

### Книгопис

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

### Примери:

#### Статия от списание:

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

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

### References

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

### Examples:

#### Reference to a journal article:

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

#### Reference to a book chapter:

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

### Submission of manuscripts

The original and one copy of the complete manuscript are submitted together with a covering letter granting the consent of all authors for the publication of the article as well as a statement that it has not been published previously elsewhere and signed by the first author. The Editors will not be responsible for damages or loss of the papers submitted. Papers returned to the authors for revision and not received back in 60 days it shall be treated

**Глава (раздел) от книга:**

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

**Адрес за кореспонденция с авторите**

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

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

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

as newly submitted manuscripts. Manuscripts of articles accepted for publication will not be returned to the authors.

**Address for sending of manuscripts and other editorial correspondence**

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

# ЕНДОКРИНОЛОГИЯ



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

*Главен редактор:*  
проф. Боян Лозанов  
*Научен секретар:*  
Доц. Филип Куманов  
*Стилов редактор:* Багра Делчева  
*Редактор на английски:*  
Крикор Меликсетян  
*Отговорен редактор:* Румен Нинов  
*Първа корица и графичен дизайн:*  
Румен Нинов  
*Предпечатна подготовка:* "Бетапринт"  
*Печат:* "График - К"

*Editor-in-chief:* Prof. B. Lozanov  
*Scientific secretary:*  
Assoc. prof. Ph. Kumanov  
*Style editor:* Bagra Delcheva  
*English editor:* Krikor Melixetian  
*Art director:* Rumen Ninov  
*Prepress:* Betaprint  
*Printed by:* Graphic - K