



ISSN 1310-8131

Том X / Volume X

Книжка 3 / Number 3, 2005

ЕНДОКРИНОЛОГИЯ **ENDOCRINOLOGIA**

Списание
на Българското гружество
по ендокринология
към СНМД 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, С. Захариева,
Г. Кирилов, Л. Коева, Д. Коев,
К. Коприварова, Ив. Мендизов,
М. Протич, Вл. Христов

Editorial Board:

А.-М. Borissova (Sofia), V. Christov (Sofia),
G. Kirilov (Sofia), L. Koeva (Varna),
D. Koev (Sofia), K. Koprivarova (Sofia),
I. Mendizov (Sofia), M. Protich (Sofia),
S. Zakharieva (Sofia)

Редакционен съвет:

П. Ангелова-Гатева, Б. Василева,
Л. Дянков, Ал. Александров, М. Андреева,
Н. Овчарова, Т. Сечанов, Ив. Цилинков

Advisory Board:

P. Angelova-Gateva (Sofia), Al. Alexandrov (Sofia),
M. Andreeva (Sofia), L. Diankov (Sofia),
N. Ovcharova (Sofia), T. Sechanov (Sofia),
B. Vasileva (Sofia), I. Tzinlikov (Pleven)

Международен научен съвет:

М. Богоев (Скопие), А. Булатов (Москва), Ф.
Деланж (Брюксел), Г. Ердоган (Анкара),
К. Жафиол (Монпелие),
Е. Збранка (Яш), А. Изидори (Рим),
Б. Каранфилски (Скопие),
П. Кендъл-Тейлър (Нюкасъл на Тайн),
М. Кокулеско (Букурещ), Г. Красас (Солун),
Д. А. Кутрас (Атина),
Дж. Лазарус (Кардиф), Е. Нишлаг (Мюнстер),
А. Пинчера (Пиза), С. Рефетоф (Чикаго),
М. Серрано Риос (Мадрид),
Й. Фьовени (Будапеща)

International Scientific Board:

M. Bogoev (Skopie), A. Bulatov (Moscow),
M. Coculescu (Bucharest),
F. Delange (Brussels), G. Erdogan (Ankara),
J. Fovenyi (Budapest), A. Isidori (Rome),
C. Jaffiol (Monpellier), B. Karanfilski (Scopie),
P. Kendall-Taylor (Newcastle upon Tyne),
D. A. Koutras (Athens), G. Krassas (Thessaloniki),
J. H. Lazarus (Cardiff), E. Nieschlag (Münster),
A. Pinchera (Pisa), S. Refetoff (Chicago),
M. Serrano Rios (Madrid), E. Zbranca (Jasi)

Списанието се индексира от:
• ExtraMed (London)
• Elsevier Science (Amsterdam)
• Raymon Mulford Library (Ohio)
• Bulgarian Citation Index

ISSN 1310-8131

Списание

ЕНДОКРИНОЛОГИЯ

том X, книжка 3, 2005

Съдържание

Обзор

- Г. Ингилизова, Г. Дашев, С. Захариева, Р. Иванова, Г. Ганчев, П. Ангелова-Гатева**
Адренортикална туморогенезапрактически аспекти 124
- Иван Домусчиев**
Сърдечно-съдови усложнения при захарния диабет и мястото на статините в тяхната превенция 133
- Илияна Атанасова, Мария Орбецова, Георги Коларов**
Генетика на поликистозния овариален синдром (PCOS)..... 138

Оригинални статии

- Пламен Тодоров, Росица Конакчиева, Йосиф Димитров**
Ефект на рекомбинантен ФСХ (Gonal-F и Puregon) върху синтеза и секрецията на Естрадиол-17 бета от човешки гранулозни клетки ин-витро 149
- П. Каменова**
Показатели на инсулинова чувствителност при пациенти с тип 2 захарен диабет 154
- Георги Тодоров, Цонка Луканова**
Ретроперитонеалната ендоскопска адреналектомия - новият стандарт за хирургично лечение на бенигнените адренални лезии 163

Юбилей Проф. д-р Александър Попов – 90 години 170

Указания за авторите 172

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 (GSM 0888/68 03 43)

Journal

ENDOCRINOLOGIA

volume X, number 3, 2005

Contents

Review

G. Ingilizova, G. Dashev, S. Zaharieva, R. Ivanova, G. Ganchev, P. Angelova-Gateva
Adrenocortical Tumourigenesis 124

Ivan Domuschiev

Cardiovascular complications of diabetes mellitus and the place of statins in their prevention
..... 133

Iliana Atanasova, Maria Orbezova, Georgi Kolarov

Genetics of the polycystic ovary syndrome (PCOS) 138

Original articles

Plamen Todorov, Rossitza Konakchieva, Yosif Dimitrov

Effects of different recombinant FSH(Gonal-F and Puregon) on Estradiol-17 beta production
and release of human granulosa cells in vitro 149

P. Kamenova

Determinants of insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus 154

Georgi Todorov, Tsonka Lukanova

Retroperitoneal endoscopic adrenalectomy - the new standard for treatment of benign adrenal
lesions 163

Jubilee Prof. Aleksander Popov – 90 years 170

Instructions to Authors 172

Editorial Board: Clinical Center of Endocrinology and Gerontology
6, D. Gruev Str., 1303 Sofia, Bulgaria; Tel (0359) (02) 987 7201; Fax (0359) (02) 874 145
Prof. B. Lozanov, Editor-in-chief

Адренокортикална туморогенеза

Г. Ингилизова*, Г. Дашев**, С. Захариева**, Р. Иванова**, Г. Ганчев**, П. Ангелова-Гатева**

* Катедра по цитология, хистология и ембриология, Биологически факултет, СУ „Св. Климент Охридски“ – София

** Клиничен център по ендокринология и геронтология, Медицински университет – София

Adrenocortical Tumourigenesis

G. Ingilizova*, G. Dashev**, S. Zaharieva**, R. Ivanova**, G. Ganchev**, P. Angelova-Gateva**

* Department of Cytology, Histology and Embryology, Faculty of Biology, University of Sofia „Sv. Kliment Ohridski“, Sofia

** Clinical Center of Endocrinology and Gerontology, Medical University, Sofia

Резюме

В настоящия обзор са представени класически и нови данни относно процеса на формирането на доброкачествени и злокачествени образувания на надбъбречната кора. Целта на обзора е да представи съвременни научни факти за туморогенезата, които дават възможност за ранно диагностициране на новообразуванието, навременно изясняване вида на тумора като доброкачествен или злокачествен, което обосновава своевременно вземане на решение за адекватна терапия. Тези научни усилия са част от изясняването на същността на тумора, открит с обективни методи от областта на радиографията, ехографията, ЯМР, изследване на морфологията, биохимията, имунохистохимията и генетиката на туморите по съответни показатели.

Abstract

The review presents classical and new data concerning the tumourigenesis progress of the benign and malignant adrenal tumours. The purpose of the review is to present classical and modern facts in tumorigenesis, which permit the early diagnosis and characterization of the adrenal tumour as benign or malignant. Thus a precise diagnosis will lead to timely therapeutic decision and actions. A variety of radiological, ultrasound, MRI methods is utilized for the detection of these lesions.

The further use of morphological, biochemical, immunohistochemical and genetic investigation completes the diagnostic work-up.

Newly discovered markers like Ki-67, POMC, IGF-I, IGF-II as well as numerous genetical factors are included in the diagnostics and help the differ-

Новооткрити маркери като Ki-67, POMC, IGF-1, IGF-2 и редица генетични фактори се използват в диагностиката като подпомагат диференциалната диагноза, прогнозата на тумора и характеризират резултата от лечението.

Злокачествените образувания на надбъбречната кора се развиват агресивно, бързо и смъртоносно, поради което уточняването на вида им и навременната терапевтична намеса са изключително актуални проблеми.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: надбъбречна жлеза, надбъбречнокорови тумори, надбъбречна туморогенеза

Увод

Многобройни научни екипи от целия свят полагат огромни научни и финансови усилия за изясняване на процеса на неоплазията, туморообразуването в организма, генезата на доброкачествените и злокачествените тумори. Тези увеличаващи се знания разкриват нови възможности за провеждане на целенасочено лечение на туморите, специално на злокачествените.

Целта на настоящия обзор е да представи накратко съвременните научни знания, натрупани през последните десетилетия, свързани с изучаването на супрареналната туморогенеза. Представени са данни от биохимични, морфологични, генетични, имунохистохимични и други изследвания, които служат за цели на ранната диагностика, отдиференциране на супрареналните тумори и създаване на нови терапевтични подходи.

Общи характеристики на туморогенезата

Туморно разрастване, клонирано от една начална клетка в здравата тъкан, при удвояването на 30 популации образува 10^9 клетки или около 1 грам туморна маса. Клетъчният цикъл се повтаря, но при различните тъкани е различно

ential diagnosis, tumour prognosis approach and outcome determination and choosing the proper therapeutical guide.

The adrenal carcinomas are aggressive, usually rapidly developing and lethal, that's why the early specific diagnosis and timely therapy are very actual and important problems.

KEY WORDS: adrenal gland, adrenocortical tumours, suprarenal tumourigenesis

дълъг. Натрупаното образуване може да започне като доброкачествено и да премине или не в злокачествено. Бързоделещите се клетки обикновено са характерни за злокачествените тумори – карциномите. Новополучените клетки са с различни физиологични, морфологични, химични и генетични характеристики. След 30 и повече деления неоплазията може да бъде открита клинично, а образуването става все по-хетерогенно с нарастването (1, 2).

Изучаването на онкогени и механизмите на действие и активиране на туморните супресорни гени в норма и патология са част от съвременните опити за проникване в молекулярната патология на неоплазиите.

Съвременното виждане за неоплазията би могло да се представи схематично, за да избере изследователя мястото, в което счита, че е подходящо да насочи научните си търсения. (фиг. 1)

Адренокортикални тумори

Адренокортикалните тумори са проблем на около 3-7 % от човешката популация. От тези тумори голямата част са нефункциониращи или функциониращи доброкачествени аденоми. Много по-малко са първичните адренални

Фигура 1. Схематично представяне на етапите на туморогенезата
Figure 1. Schematic representation of tumourigenesis



карциноми, които задължително трябва да бъдат отстранявани хирургично. Злокачествените характеристики се свързват с хромозомна дупликация на 11p15, 5 локус с повишена секреция на IGF2 гена и на CDK1C и H19 гените. TP53 се свързва с прогресията на карцинома, обсъжда се АСТН рецепторна делеция. Изучават се интензивно хромозомни локуси 17p, 1p, 2p16, 11q13 и хромозоми 4, 5 и 12 за евентуални онкогенни свойства (5).

Адренортикалните тумори трябва да бъдат диференцирани като надбъбречна корава хиперплазия, медуларни тумори, екстраадренални тумори или метастази. Този вид диагноза се поставя с рутинните хистологични и имунохистологични изследвания. През последните години се включват серумни биохимични и различ-

ни други обективни изследвания, за да се изясни рано същността на тумора, диагнозата и да се вземат бързо адекватни терапевтични мерки.

Адреналните хиперплазии биват вродени и придобити. Те са дифузни микро- и макронодуларни, биват функционално неактивни и активни. Повечето адренални аденоми са солитарни тумори тежащи под 50 грама.

Адренортикалните тумори и карциноми се срещат във всяка възраст и при двата пола. В САЩ са намерени от 0 до 2 случая на милионна популация за година и причиняват 0, 2 % от смъртността от карциноми в страната. Познати са нефункциониращи и продуциращи кортикостероиди и андрогени тумори. През последните десет години са поразени предимно първото и четвъртото десетилетие на човешкия живот.

Диагностицирането при деца е свързано с поява се вирилизация, повишено образуване на андрогени, докато при възрастни се изразява със синдрома на Кушинг (CS), феминизация (FS), вирилизация (VS) и смесени Кушинг-вирилизиращи синдроми (CVS) и повишено образуване на кортикоиди и андрогени с агресивно клинично протичане, завършващо със смърт след месеци или години. Нефункционалните адренални карциноми са редки, често у възрастни и са с бързо протичане. Те не секретират по-високи количества хормони, или образуват хормонални прекурсори, или обичайните хормони в нормални количества. С модерните изследователски методи се диагностицират точно. Хирургичното отстраняване на локализираните вече тумори е най-доброто лечение (6).

Хипертонията се наблюдава често при пациенти с адренокарциноми. Тя се свързва с повишените нива на глюкокортикоиди и/или минералкортикоиди или активиране на ренин-ангиотензиновата система поради компресия на бъбречните кръвоносни съдове. Хипертонията се коригира след хирургичното лечение. Наблюдавана хипогликемия, постпрандлна, или на гладно се обуславя от туморна продукция на IGF-II, който притежава инсулиноподобна активност с активиране на инсулинови рецептори.

При ектопичен адренален карцином може да се наблюдава и акромегалия и секреция на антидиуретичен хормон. Оплакванията на пациентите са обикновено от болки в стомаха, загуба на тегло, слабост, анорексия, гадене, повръщане, мигалгия и др. Повишена температура се наблюдава при некроза на тумора или кръвоизливи в него, инфекции. Необичайни изяви при такива пациенти могат да бъдат хематурия, отоци, остри коремни болки, болки в таза и смущения в уринирането, параплегия. Появата на метастази дава дихателни смущения и др. Тумори с размер под 5 см се обозначават като I степен, а над 5 см – II степен, при наличие на регионални лимфни възли – III степен, при далечни метастази и регионални лимфни възли – IV степен. Преживяемостта е най-ниска при IV степен (9).

Диагностицирането на тумори на надбъбречната жлеза включва биохимични и хормо-

нални изследвания.

При някои от пациентите се наблюдава хипогликемия и хипокалемия. При децата с вирилизация е увеличено нивото на тестостерон, андростендион и дехидроепиандростерон, дехидроепиандростеронсулфат (ДХЕАС) и рядко алдостерон и кортизол. При възрастни е увеличен серумния кортизол, 17-хидроксикортикостерон, ДХЕАС и C19 андроген, C21 андроген. ДХЕАС и тестостерон се увеличават при VS, а кортизол и компонент S са увеличени при смесен тип карциноми – CVS (10).

В диагностиката на тумори на надбъбречната жлеза се използва ултрасонография, компютърна томография, MRI, адренална сцинтиграфия, визуален анализ на IVC, инвазивна визуализация на далечни метастази, микроскопска диагностика, имунохимични изследвания, ДНК анализ, клетъчна пролиферация с Ki-67, IGF-I, IGF-II и други растежни фактори.

Посредством методите на течна цитометрия и визуализиращ анализ са изследвани G0/G1, S и G2/M фазите на клетки от различни тумори. ДНК плоидността в адренални тумори се изучава интензивно през последните години, като се използва нефиксиран и фиксиран в парафин материал. Различни изследователски групи се концентрират върху ДНК тетраплоиди и ДНК анеуплоидни тумори с различна прогноза. Тетраплоидност се установява при ¼ от аденомите и карциномите на надбъбрека, докато нормалните тъкани и хиперплазиите на адреналната жлеза обикновено са ДНК диплоиди. Идентификацията на хиподиплоидни тумори - ДНК индекс $D1 = 0,80 - 0,95$ и анеуплоидни тумори – $D1 = 1,05 - 1,30$ също се използва. Мултиплени анеуплоиди, които са свързани с висока агресивност се наблюдават често при адренални карциноми. Бенигни ендокринни тумори при деца често са анеуплоидни (6, 7, 8, 39).

Оценка на клетъчната пролиферация в адренални карциноми се извършва с изброяване на митозите, оценка на S фазата с поточна цитометрия, AgNOR метод, имунохистохимична оценка на ядрени белтъци, Ki-67. При сравнение на методите се изказва мнение, че Ki-67 и AgNOR измерването дават указание за повишена пролиферативна активност в посока от

нормални към малигнени тумори. Това изказване се нуждае от потвърждение при по-широки изследвания [11]. Данните за диагностициране и класификация на адренортикалните тумори се набират бавно и понастоящем няма ясни и бързи критерии в тази насока. Големината на тумора има прогностично значение, обещаващ в това отношение е туморсупресорният ген р 53. Проучванията върху ДНК плоидността и анализа на клетъчния цикъл не са доказани диагностични критерии при оценка на адреналните неоплазии (8).

Нараства броя на изследванията на хромозоми, като там се търсят причините за появата на туморни образувания в надбъбрека. Най-често адренортикалните аденоми и карциноми са моноклонални, докато АСТН индуцирани дифузни и макронодуларни хиперплазии са поликлонални. Тези проучвания потвърждават схващането, че карцинома най-често е резултат от моноклонална експанзия на единични клетки, които стават тумори в отговор на многобройни генетични аберации, които могат да включват: инактивация на туморния супресорен ген, промени в структурата и свойствата на белтъците, участващи в нормалния процес на стареене, апоптоза при наличие на генна нестабилност. Проучва се наличието на мутации, онкогени, туморни супресорни гени и др. (12, 13, 14).

Преносът на сигнали в клетката се осъществява с AMP, ИТР, G-белтъци, калциево-калмодулинова система, свободни радикали. Така наречените G (гуанозин) съдържащи белтъци пренасят информационни сигнали през мембраните. Те са изградени от α , β и δ субединици и се свързват с различни рецептори. При хиперфункционализиращи адренортикални аденоми се установяват мутации в β субединицата на Gs (gsp мутации). Намерени са точкови мутации в N-ras и H-ras при адренортикалните тумори. Рядко се срещат мутации в G-белтъците при тумори на надбъбрека. Не са установени мутации в АСТН-R гените при тези тумори. Наблюдавана е повишена експресия на нормално структуриран АСТН-R и тип I ангиотензин II рецепторни гени при алдостерон секретирални тумори. Предполага се участието на PI-продукти, фос-

фолипаза C, протеин киназа C, транскрибиращите фактори c-jun и c-fos в адренортикалната туморогенеза (4, 15, 16).

При пациенти с карцином на надбъбречната кора е наблюдавана мутация на туморсупресорния ген р53 от хромозома 17p13,1, което е установено и при рак на гърдата, мозъка, мускулите, при левкемията, при алдостерон секретирални аденоми и кортизол секретирални аденоми. Проучванията от този род показват, че загубата на нормалната инхибиторна функция на р53, който контролира биосинтезата на туморсупресорен белтък в клетъчния цикъл може да причини развитие на адренортикални тумори.

Намерено е, че хетерозиготност на локуси в късото рамо на хромозома 11 (11p) има значение в патогенезата на доброкачествените и злокачествените адренортикални тумори. Загуба на алели върху хромозома 11p, 17q и 17r са намерени при първични адренортикални тумори и метастази и отсъстват при адренортикални карциноми (17). Uniparental disomy в 11p 15,5 locus, който включва H-ras-1, IGF-II и свръхекспресия на IGF-II гена са намерени при пациенти с адренортикален карцином. Повишени нива на IGF-II mRNA са наблюдавани при пациенти със злокачествени адренортикални тумори, но и в нормална надбъбречна тъкан. Това изтъква участие на IGF-II в разрастването на тъканите и формиране на злокачествен фенотип (31).

Терапията на адренортикални тумори включва употребата на инхибитори на растежа и/или вещества разрушаващи туморните клетки, радиотерапия, хирургическо лечение. При хемотерапия се използва Cisplatin, Циклофосфамид, Доксорубин, Suramin Gossypal.

Факторът уротензин II е вазоактивен пептид, чиято имунореактивност е наблюдавана при адренортикални аденоми, адренортикални карциноми, феохромоцитом, но се наблюдава и в нормална адренортикална тъкан. Счита се, че уротензин II действа като автокринен/паракринен растежен фактор, стимулиращ растежа на адреналните тумори (18).

Доброкачествените адренални туморни образувания експресират антиапоптозни гени (bcl-xL) и проапоптозни гени (fas). Адренортикалните карциноми експресират само bcl-xL и

отсъства fas. При адrenoкартикалните карциноми тридесеткратно нараства нивото на TRF1, в сравнение с доброкачествените и корелират обратно с прогнозата на пациентите с адrenoкартикалните карциноми. Отсъствието на fas в адrenoкартикалните карциноми може да подпомогне диагнозата и диференцирането им от доброкачествените адrenoкартикални тумори (19).

Експресия на пролактин освобождаващ белтък (prolactin releasing peptide), както и на неговия рецептор е установена при феохромоцитомии, нормална надбъбречна кора и някои доброкачествени надбъбречни тумори. Най-силна е експресията при феохромоцитомии, което предполага патологична роля при тяхното формиране и има диагностична стойност (20).

Многобройните втреклетъчни сигнални пътища функционират с участието на аденилилциклаза и протеин киназа А както в нормални надбъбречнокорови клетки, участващи в хормонообразуването, така и в туморни клетки. Може би тези сигнали подтискат растежа на адrenoкартикалните карциноми. Активирането на АСТН рецептора подпомага туморообразуването. В туморната тъкан са наблюдавани нарушения в регулацията на IGF-II, мутации в TP53 и RAS (4).

Интерлевкин-6 (IL-6) е краен продукт на каскада от сигнални цитокини и се синтезира при възпалителни процеси, влияе на диференциацията на клетката, участва в стимулиране и активиране на имунни клетки. Интерлевкин-6 стимулира и кортизоловата секреция в нормална надбъбречна тъкан. Твърди се, че загубата на отговор на туморните адренални клетки на IL-6 и специално на кортикотропина е важна стъпка към туморогенезата в надбъбречната кора (21).

Ензимите 11 β -ОН стероид дехидрогенази тип 1 и 2 са изоензими, които превръщат неактивните глюкокортикоиди в активни форми (кортизон \rightarrow кортизол) и обратно и са активни в надбъбречнокоровите нормални клетки. Активирането им води до повишена хормонална секреция в адrenoкартикалните карциноми (22).

Експресията на гена за α -субединицата на инхибина в човешка адrenoкартикална тъкан е установена във всички тъкани. По-изразена е

експресията при деца в сравнение с възрастни [23]. Изучава се и при адrenoкартикални тумори.

Ектопичната експресия на рецептора за стомашния инхибиторен полипептид е честа в адrenoкартикотропни независими тумори, билатерална макронодуларна адренална хиперплазия и рядко се наблюдава експресията му при едностранни тумори (24). В тази насока се работи в редица лаборатории.

Ниско ниво на H19 и високо на IGF-II експресия могат да играят важна роля в развитието на адrenoкартикални карциноми. Третирането на тъкани с CH3 цитозин инхибира IGFII-mRNA натрупването и повишава H19 експресията, което редуцира клетъчната пролиферация. Това е една от насоките за търсене на биохимично мотивирано противодействие на туморите на надбъбречната жлеза. Счита се, че метилирането на ДНК играе роля в абнормната експресия на H19 и IGF2 гените в адrenoкартикалните карциноми (25). Метилирането и деметилирането на ДНК на различни гени е интензивно разработвано направление в биохимията.

Адреналните аденоми и карциноми, както вече отбелязахме са моноклонални, което дава възможност на генетични промени в прогениторните клетки да бъдат свързани с тяхната туморогенеза. Натрупват се данни, че промени във втреклетъчните сигнални пътища са включени в туморогенезата. С адреналната туморогенеза са свързани мутации в гена, контролиращ биосинтезата на Steroid Acute Regulatory Protein (StAR), (26).

Apoptosis suppressing gene – bcl-2 и apoptosis-inducing gene – bax са активни при някои видове тумори. Експресията на bax гена дава възможност да отдиференцираме адrenoкартикалните карциноми от доброкачествените тумори (27).

Известно е, че по принципа на обратната връзка глюкокортикоидите променят индиректно адrenoкартикалната стероидна секреция като инхибират АСТН-секрецията в предната хипофиза. Установено е, че е възможен и механизъм на директно повлияване, като глюкокортикоидите влияят върху транскрипцията на биосинтетичния ензим – 3 β -ОН стероид дехидрогеназа (D5-D4 изомераза). Третирането на ад-

ренокортикални клетки с дексаметазон повишава кортизоловата продукция и 3β -HSDmRNA нивото. Увеличава се количеството на стероидогенния регулаторен белтък (StAR) mRNA, увеличават се глюкокортикоидните рецептори (28).

Установено е, че АСТН зависима надбъбречна жлезна тъкан и алдостерон продуциращи аденоми (АРА), синтезират екстрацелуларния матриксен белтък (TSP 1 и 2) тромбоспондин. Този белтък изпълнява роля в клетъчната адхезия и миграция в надбъбречната кора, които явления са важни при метастазирането на туморите. Най-често метастазират карциноми на бял, черен дроб и костен мозък (29).

При различни туморни клетки, включително тумори на надбъбречната кора в експерименти е наблюдавана експресия на вазоактивни пептиди като ендотелин 1, адреномедулин, уротензин-II и ендотелинови рецептори. От изследванията се достига до извод, че ендотелин 1 реагира като паракринен и аутокринен стимулатор на туморния растеж, като това участие изглежда се опосредства от специфичен ендотелинов рецептор (30).

Сравнително ретроспективно изследване при адренокортикални аденоми и карциноми е проведено с материал от парафинови блокчета с хистоморфологични и молекулярни имунохистохимични методи. Изследвани са p53, mdm-2, p21, bcl-2, циклин D1, p27, Ki-67, IGF-I и IGF-II. Изследванията показват, че морфологичните методи за установяване на туморна некроза са доказателни. Счита се, че при < 5 некрози за 50 полета се касае за синусоидна инвазия. Хистологичен индекс > от 5 се установява при адренокортикални карциноми. Морфологичните методи в по-голяма степен представят вероятност за метастази на адренокортикалните карциноми. Освен тях, Ki-67 и други, регулиращи клетъчния цикъл и свързани с пролиферацията фактори, заедно с хистопатологични критерии могат да подпомогнат от диференцирането на доброкачествените и злокачествените тумори (1). Задълбочени морфологични изследвания (брой митози, размери на туморите) дават възможност за прецизна диагностика на адренокортикалните карциноми (2).

Проучвания върху белтъка p21 (Waf1/Cip1), който е инхибитор на клетъчния растеж и ДНК

репликацията, показват, че той се индуцира от p53 супресорния белтък. Мутации или делеции, инактивиращи тези белтъци, могат да доведат до нарушения в клетъчния растеж и формиране на доброкачествени и злокачествени надбъбречни тумори (31).

Аргинин вазопресинът (AVP) участва в регулацията на кортикостероидогенезата, вазоконстрикцията, глюконеогенезата, както и в екскрецията на вода и урея. Съобщава се за установен факт, че AVP подтиска експресията на циклин D1 гена, при което се блокира клетъчния цикъл и се променя пролиферацията в адренокортикални клетки (32).

Проучвания върху молекулната база на спорадичен кортикален тумор са свързани с ролята на CDKN1C (p57K1P2) гени, контролиращи биосинтезата на циклин-зависим киназен инхибитор CDNC и TP53 тумор супресорен ген. Установена е слаба експресия на CDNC в адренокортикални аденоми и карциноми. Мутации в TP53 гени се наблюдават при 70 % от адренокортикалните карциноми, свързани с дефектна p53 и CDN1 експресия в злокачествените тумори. Тези данни могат да се използват за доказване на злокачественост (33).

Растежните фактори IGF-I и II участват в растежа, диференциацията и апоптозата на нормалните и туморни клетки. IGF системата играе изключително важна роля в адренокортикалната туморогенеза. Многократно е доказвано наличието на грешки в транскрипцията в 11p15 гена, повишена експресия на IGF-II гена и рецепторите за IGF-I и II, високи нива на IGF свързващи белтъци 2, 3, 5, 6 (34).

Активността на IGF-I се регулира от образуване в серума на тернарен комплекс – 150kd, който включва IGF-I, IGFBP-3 и киселинно лабилната субединица ALS в присъствие на GH (растежен хормон). Проучванията върху участието на IGF I и II в туморогенезата на адренокортикалните тумори са изключително интензивни (35).

Интересно е да се отбележи една особеност в обмяната на адренокортикалните тумори. Ензимът теломераза осигурява повтарящи се сегменти в края на хромозомите, предотвратява скъсяването им при деленето на клетките. Ензимът не се намира в зрели диференцирани клетки, но се установява в туморни клетки и се

счита, че може да бъде показател за злокачественост. Активността на ензима е многократно по висока при карциноми в сравнение с аденоми (36).

Установено е, че повишена експресия на циклин Е и G1CDK и загуба на функция на p57K1P2 са включени в процеса на пролиферация на злокачествени спорадични адренокортикални тумори (37).

Представените по-горе данни от класически и нови имунохистологични, морфологични, биохимични и генетични изследвания демонстрират едно огромно поле, в което в зависимост от избора и възможностите, могат да се насочат изследователските проекти.

Заклучение

Изучаването на туморогенезата на адренокортикалните тумори е актуална задача в клетъчната и молекулярната биология, а също в съвременната биохимия, морфология и клинична медицина. Навлизането в механизмите на туморогенезата изобщо и специално на злокачествените тумори дава възможност за навременна ранна диагностика и търсене на нови и разнообразни терапевтични подходи при лечението на адренокортикалните тумори.

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Stojadinovic A, Brennan MF, Hoos A, Omeroglu A, Leung DH, Dudas ME, Nissan A, Cordon-Cardo C, Ghossein RA; Adrenocortical adenoma and carcinoma: histopathological and molecular comparative analysis. *Mod-Pathol*, 2003 Aug, 16(8): 742-751.
2. Stojadinovic A, Ghossein RA, Hoos A, Nissan A, Marshall D, Dudas M, Cordon-Cardo C, Jaques DP, Brennan MF; Adrenocortical carcinoma: clinical, morphologic, and molecular characterization. *J Clin Oncol*, 2002, 20(4): 941 - 950.
3. Saeger W; Adrenocortical tumours, *Pathologie*, 2003 Jul, 24(4): 272 - 279.
4. Kirschner LS; Signaling pathways in adrenocortical cancer. *Ann NY Acad Sci*, 2002 Jun, 968: 222-239.
5. Sidhu S, Gicquel C, Bambach CP, Campbell P, Magarey C, Robinson BG, Delbridge LW; Clinical and molecular aspects of adrenocortical tumorigenesis. *ANZ Journal of surgery*, 2003, 73(9): 727 - 738.
6. Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipuski SL, Mutsaers P, Darnell J, eds.; *Molecular Cell Biology*, 3rd Edition, 1995, *Scientific American Books*, New York.
7. Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, Lizyness M, Misc DE, eds; Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *American J Pathol*, 2003, 162(2): 521 - 531.
8. Brennan MF; Adrenocortical carcinoma, *CA Cancer J Clin*, 37: 1987, 348 - 365.
9. Trainer PJ, Grossman A; The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1991, 34: 317 - 330.
10. Dahia P.L.M. and Grossman A.B.; The molecular pathogenesis of corticotroph tumors. *Endocrine reviews* 1999, 20(2): 136 - 155
11. Terzolo M, Boccussi A, Bovio S, Cappia S, De Giuli P, Ali A, Paccotti P, Porpiglia F, Fontana U, Angeli A; Immunohistochemical assessment of Ki-67 in the differential diagnosis of adrenocortical tumors. *Urology*, 2001,57: 176 - 182.
12. Alberts B, Bray D, Jevic J, Raff M, Roberts K, Watson JD, eds.; *Molecular Biology of the Cell*, 3rd Edition, 1995, Garland Publishing, New York.
13. Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M., and Harris, C.C., Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.*, 1994, 54, 4855 - 4878.
14. Caron de Fromentel C, Soussi T TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chromosomes Cancer* ; 1992, 4:1 - 15.
15. Prchal JT, Prchal JF, Belickova M, Chen S, Guan Y, Gartland GL, Cooper MD; Clonal stability of blood cell lineages indicated by X-chromosomal transcriptional polymorphism. *J. Exp Med* 1996, 183:561 - 567.
16. Kaufmann WK, Paules RS; DNA damage and cell cycle check-points. *FASEB J* 1996, 10: 238 - 247.
17. Finelli P, Pierantoni GM, Giardino D, Losa M, Rodeschini O, Fedele M, Valtorta E, Mortini P, Croce CM, Larizza L, Fusco A; The high mobility group A2 gene is amplified and overexpressed in human prolactinomas. *Cancer Res*, 2002, 62: 2398 - 2405.
18. Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Arihara Z, Noshiro T, Hayashi Y, Shibahara S; Expression of urotensin II and its receptor in adrenal tumors and stimulation of proliferation of cultured tumor cells by urotensin II. *Peptides*, 2003 Feb, 24(2): 301-306.
19. Kanauchi H, Wada N, Ginzinger DG, Yu M, Wong MG, Clark OH, Duh QY; Diagnostic and prognostic value of fas and telomeric-repeat binding factor-1 genes in adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003 Aug, 88(8): 3690-3693.
20. Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Sone M, Noshiro T, Hayashi Y, Sasano H, Shibahara S; Expression of prolactin-releasing peptide and its receptor in the human adrenal glands and tumor tissues of adrenocortical tumors, pheochromocytomas and neuroblastomas. *Peptides*, 2002 Jun, 23(6): 1135-1140.
21. Willenberg HS, Path G, Vogeli TA, Scherbaum WA, Bornstein SR; Role of interleukin-6 in stress response in normal and tumorous adrenal cells and during chronic inflammation.

Ann NY Acad Sci, 2002 Jun, 966: 304-314.

22. Mazzocchi G, Malendowicz LK, Aragona F, Tortorella C, Gottardo L, Nussdorfer GG; 11 - beta Hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 are up- and downregulated in cortisol-secreting adrenal adenomas. *J Investig Med*, 2002 Jul, 50(4): 288-292.

23. Rich N, Gaston V, Le-Bouc Y, Gicquel C; Expression of the gene for the alpha-subunit of inhibin in human adrenocortical tumours. *Horm Res*, 2002, 57(1-2): 43-47.

24. Groussin L, Perlemoine K, Contesse V, Lefebvre H, Tabarin A, Thieblot P, Schlienger JL, Luton JP, Bertagna X, Bertherat J; The ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor is frequent in adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia, but rare in unilateral tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002 May, 87(5): 1980-1985.

25. Gao ZH, Suppola S, Liu J, Heikkila P, Janne J, Voutilainen R; Association of H19 promoter methylation with the expression of H19 and IGF-II genes in adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002 Mar, 87(3): 1170-1176.

26. Stigliano A, Caiola S, Siniscalchi E, Papini E, Crescenzi A, Monti S, Arnaldi G, Mantero F, Sciarra F, Toscano V; Mutational analysis of StAR gene in adrenal tumors. *Int J Cancer*, 2002 Jan 20, 97(3): 357-360.

27. Kanauchi H, Wada N, Clark OH, Duh QY; Apoptosis regulating genes, bcl-2 and bax, and human telomerase reverse transcriptase messenger RNA expression in adrenal tumors: possible diagnostic and prognostic importance. *Surgery*, 2002 Dec, 132(6): 1021-1026; discussion 1026-1027.

28. Feltus FA, Cote S, Simard J, Gingras S, Kovacs WJ, Nicholson WE, Clark BJ, Melner MH; Glucocorticoids enhance activation of the human type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta5-Delta4 isomerase gene. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2002 Sep, 82(1): 55-63.

29. Hatakeyama H, Nishizawa M, Nakagawa A, Nakano S, Kigoshi T, Miyamori I, Uchida K; Thrombospondin expression in aldosterone-producing adenomas. *Hypertens Res*, 2002 Jul, 25(4): 523-527.

30. Takahashi K, Totsune K, Kitamuro T, Sone M, Murakami O, Shibahara S; Three vasoactive peptides, endothelin-1, adrenomedullin and urotensin-II, in human tumour cell lines of different origin: expression and effects on proliferation. *Clin Sci (Lond)*, 2002 Aug, 103 Suppl 48: 35S-38S.

31. Iida S, Fujii H, Moriwaki K; A somatic mutation of the p21(Waf1/Cip1) gene in a human adrenocortical adenoma. *Anticancer Res*, 1997 Jan - Feb, 17(1B): 633-636.

32. Schwindt TT, Forti FL, Juliano MA, Juliano L, Armelin HA; Arginine vasopressin inhibition of cyclin D1 gene expression blocks the cell cycle and cell proliferation in the mouse Y1 adrenocortical tumor cell line. *Biochemistry*, 2003 Feb 25, 42(7): 2116-2121.

33. Barzon L, Chilosi M, Fallo F, Martignoni G, Montagna L, Palu G, Boscaro M; Molecular analysis of CDKN1C and TP53 in sporadic adrenal tumors. *Eur J Endocrinol*, 2001 Aug, 145(2): 207-212.

34. Martinierie C, Gicquel C, Louvel A, Laurent M, Schofield PN, Bouc Y; Altered expression of NovH is associated with human adrenocortical tumorigenesis. *J Clin*

Endocrinol Metab, 2001, 86(8): 3929 - 3940.

35. Laursen T, Flyvbjerg A, Jorgensen JO, Baxter RC, Christiansen JS; Stimulation of the 150-kilodalton insulin-like growth factor-binding protein-3 ternary complex by continuous and pulsatile patterns of growth hormone (GH) administration in GH-deficient patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000 Nov, 85(11): 4310 - 4314.

36. Manneli M, Gelmini S, Arnaldi G, Becherini L, Bemporad D, Crescioli C, Pazzagli M, Mantero F, Serio M, Orlando C; Telomerase activity is significantly enhanced in malignant adrenocortical tumors in comparison to benign adrenocortical adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002 Jan, 85(1): 468 -470.

37. Bourcigaux N, Gaston V, Logie A, Bertagna A, Le Bouc Y, Gicquel C; High expression of cyclin E and G1 CDK and loss of function of p57KIP2 are involved in proliferation of malignant sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jan, 85(1): 322 - 330.

38. Lotfi CF, Lepique AP, Forti FL, Schwindt TT, Eichler CB, Santos MO, Rebutini IT, Hajj GN, Juliano L, Armelin HA; Proliferative signaling initiated in ACTH receptors. *Braz J Med Biol Res*, 2000 Oct; 33(10): 1133-1140.

39. Bourcigaux N, Gaston V, Logie A, Bertagna X, Le-Bouc Y, Gicquel C; High expression of cyclin E and G1 CDK and loss of function of p57KIP2 are involved in proliferation of malignant sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000 Jan, 85(1): 322-330.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Гергана Ингилизова

Катедра по цитология, хистология и ембриология,
Биологически факултет,

СУ „Св. Климент Охридски“, бул. „Драган Цанков“ №8, София - 1164

E-mail: ingilizova@mail.bg / gergana.ing@abv.bg

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Gergana Ingilizova

Department of Cytology, Histology and Embryology,
Faculty of Biology, University of Sofia „Sv.

Kliment Ohridski“, 8, Dragan Tzankov Str., 1164 Sofia

E-mail: ingilizova@mail.bg / gergana.ing@abv.bg

Сърдечно-съдови усложнения при захарния диабет и мястото на статините в тяхната превенция

Иван Домусчиев

Медицински институт – ЦКБ-МВР, София

Клиника по ендокринология

Cardiovascular complications of diabetes mellitus and the place of statins in their prevention

Ivan Domuschiev

Medical Institute- Central clinical base – Ministry of Internal Affairs

Clinic of Endocrinology

Резюме

Макроангиопатичните компликации и особено сърдечно-съдовите промени са главна причина за високия морбитет и морталитет при диабетите. Захарният диабет се явява съдово заболяване. Рисковите фактори за развитието на сърдечно-съдовите усложнения при диабета са хипергликемията, инсулиновата резистентност (хиперинсулинемията), дислипидемията, артериалната хипертония и хиперкоагубилитетът. При диабетите артериосклерозата се развива по-рано в хода на заболяването и показва по-тежки клинични прояви в сравнение с недиабетите. Съотношението интима-медиа на вътрешната сънна артерия е най-високо при диабетите с коронарна болест. Механизмите, които водят до развитието на ендотелна дисфункция при 2 тип захарен диабет са възпалението, дислипидемията, инсулиновата резистентност, повишеният ок-

Abstract

The macroangiopathic complications and especially the cardiovascular changes are the main reason for the high morbidity and mortality among the diabetic patients. Diabetes mellitus is a vascular disease. The risk factors for the development of cardiovascular complications of diabetes are the hyperglycemia, the insuline resistance (hyperinsulinemia), dislipidemia, arterial hypertension and hypercoagulability. The diabetics develop arteriosclerosis earlier in the course of the disease with a more severe clinical manifestations compared to the non-diabetics. The ratio intima – media of the internal carotid artery is highest in the diabetics with coronary arterial disease. The mechanisms which lead to the development of the endothelial disfunction in type 2 diabetes mellitus are inflammation, dislipidemia, insulin resistance, increased oxidative stress, accumulation of glycosilation-

сидативен стрес, натрупването на крайни продукти на гликозилирането, повишената цитокинова експресия. Ендотел-опосредстваната вазодилатация се явява важен адаптационен механизъм при увеличен ток на кръвта. Последната, опосредствана главно чрез простациклина и ендотелния дериватен релаксиращ фактор (EDRF) NO, е намалена при диабетичите. Контролът на диабетната дислипидемия е от особено важно значение. *Scotland Coronary Prevention Study* показва редуциране с 30 % на сърдечно-съдовия риск на диабетичите при лечението с статина Правастатин. Това се постига благодарение на 3 механизма на този медикамент, а именно: понижаването на триглицеридите; антивъзпалителното действие чрез редуциране на цитокините интерлевкин-6 и TNF-alpha (намаляването на инхибирането на липопротеин-липазната активност); подобряването на ендотелната функция. Статините (Правастатинът) намалява абсолютния риск от коронарни усложнения при диабетичите с 8,1 % и релативния риск с 25 %. Той намалява необходимостта от провеждане на реваскуларизация. Лечението с Правастатин редуцира ИТМ.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: захарен диабет, сърдечно-съдови усложнения, статини, превенция, стратегия

Захарният диабет се явява заболяване, характеризиращо се с повишена гликемия в резултат на дефекти в инсулиновата секреция и инсулиновото действие. Захарният диабет често води до сериозни усложнения и ранна смърт.

Макроангиопатичните компликации и особено сърдечно-съдовите промени са главна причина за високия морбитет и морталитет при диабетно болните.

Като рискови фактори за развитието на тип 2 захарен диабет се посочват възрастта, затлъстяването, фамилната обремененост със захарен диабет, нарушеният глюкозен толеранс и намалената физическа активност. Днес в световен мащаб се отбелязва увеличаване на честотата на затлъстяването във връзка със заседналият начин на живот и увеличаване на заболяемост-

end products, increased cytokine expression. The endothelion-mediated vasodilatation appears to be an important adapting mechanism to increased blood flow. The control of the diabetic dislipidemia is of great importance. *Scotland Coronary Prevention Study* shows a 30% reduction of the cardio-vascular risk in diabetics when treated with the statine Pravastatine. This is accomplished due to the 3 mechanisms of this medicine, namely: decrease in the triglycerides; antiinflammatory action by reducing the cytokine Interleukin- 6 and TNF-alpha (the reduction in the inhibition of the lipoprotein-lipase activity), improvement of the endothelial function. The statine (Pravastatine) reduces the absolute risk of vascular complications in the diabetics with 8.1% and the relative risk with 25%. It reduces the necessity of carrying out a revascularization. The treatment with Pravastatine reduces the BMI.

KEY WORDS: diabetes mellitus, cardio-vascular complications, statins, prevention, strategy.

та от тип 2 диабет, достигаща епидемични размери. От този тип диабет страдат около 200 милиона души по целия свят, а към 2025 г. техният брой ще нарасне до 300 милиона.

Захарният диабет се явява съдово заболяване. Ишемичната болест на сърцето (ИБС) се явява сериозна причина за висока заболяемост и смъртност при пациентите със захарен диабет. Рисковите фактори за развитието на сърдечно-съдовите усложнения при захарния диабет са следните:

1. хипергликемията;
2. инсулиновата резистентност (хиперинсулинемията);
3. дислипидемията;
4. артериалната хипертония;
5. тютюнопушенето;

6. хиперкоагубилитетът.

Основната причина за развитие на ИБС при тип 2 захарен диабет е коронаросклерозата (15,16). При пациентите със захарен диабет коронаросклерозата се развива по-рано в хода на заболяването. Тя показва по-тежки клинични прояви в сравнение с недиабетиците. Съотношението интима-медия на вътрешната сънна артерия при диабетици без коронарна болест е съпоставимо с това при недиабетици с налична коронарна болест. А най-високи са стойностите на този показател при диабетиците с коронарна болест (14). В тази връзка някои клиницисти и изследователи разглеждат захарния диабет като съдово заболяване. Болните от захарен диабет (тип 1 и тип 2) имат значително повишен риск от развитието на сърдечно-съдови заболявания (1,12). В сравнение с недиабетиците те имат три до пет пъти по-висок риск от смърт поради коронарно сърдечно заболяване. Когато диабетиците развият вече такова заболяване, то прогнозата е много по-лоша, отколкото при недиабетиците.

Ето защо терапията при тези болни трябва да бъде агресивна и нейната основна цел е редуцирането на техния общ риск – отказване от тютюнопушенето, строг контрол на артериалното налягане, постигането на оптимален гликемичен контрол и активно лечение на дислипидемията.

Точните механизми, по които захарният диабет засилва развитието на артериосклерозата не са добре изяснени. Известни са следните атерогенни рискови фактори: артериална хипертония, дислипидемия, ендотелна дисфункция, инсулинова резистентност (6).

Механизмите, които водят до развитието на ендотелна дисфункция при 2 тип захарен диабет са: възпаление, дислипидемия, инсулинова резистентност, повишен оксидативен стрес, натрупване на крайни продукти на гликозилирането, повишена цитокинова експресия (13).

Хроничното нарушение на функционалния интегритет на съдовия ендотел е предпоставка за възникването на артериосклерозата. Ендотел-опосредстваната вазодилатация се явява един важен физиологичен адаптационен механизъм при увеличен ток на кръвта (стрес, физическо натоварване). Вазодилатацията, която се

опосредства главно чрез простаглицина и ендотелния дериватен релаксиращ фактор (EDRF) NO, е намалена при пациентите със захарен диабет, артериална хипертония и хиперхолестеролемия (2,9). Това функционално разстройство (*ендотелната дисфункция*) е ранна форма на артериосклерозата. Мононуклеарните левкоцити по механичен начин, както и чрез имунологични, възпалителни и хемостазеологични нарушения на пропускливостта навлизат в интимата и инициират образуването на артериосклеротични плаки. Последните водят с течение на времето до появата на хемодинамично значими стенози на коронарните артерии (*Исхемична болест на сърцето*).

Хиперкоагубилитетът е от централно значение за възникването на тромботичните усложнения, които се явяват следствие на артериосклеротично изменените съдови стени и често клинично водят до остри исхемични коронарни инциденти. При диабетиците активираният тромбоцити играят особено важна роля „*диабетна тромбоцитопатия*“ (11).

Контролът на диабетната дислипидемия е от особено важно значение. Съществуват пресни доказателства, че терапията с Правастатин може да играе протективна роля в този случай (7).

Анализът на *Scotland Coronary Prevention Study* показва 30 % редуциране на този риск при диабетно болните след провеждането на лечение с Правастатин сравнено с плацебо. Авторите изказват мнение, че три потенциални механизма (самостоятелно или в комбинация) могат да обяснят този резултат:

1. Понижаващия триглицеридите ефект на Правастатин (средно 12 %) допринася за намаляването на риска от развитие на инсулиновата резистентност;

2. Антивъзпалителното действие на Правастатин (и другите статини) чрез редуцирането на цитокините *interleukin-6* и *TNF-alpha* намалява инхибирането на липопротеин-липазната активност;

3. Правастатин подобрява ендотелиалната функция (това е доказано). Антивъзпалителният ефект на статините е обект на внимание поради важното им значение в терапията и превенцията на острия коронарен синдром (8). Диабетиците са предразположе-

ни към остри коронарни усложнения поради повишената нестабилност на атеросклеротичните им плаки. Ето защо е целесъобразно ранната употреба на статини.

Анализът на *Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial* проучва сърдечно-съдовите усложнения и тяхната редукция с помощта на Правастатин при диабетици и лица с нарушен глюкозен толеранс, оцеляли след развитието на остър миокарден инфаркт (7). В плацебо групата болните от диабет пациенти страдат по-често от повтарящи се коронарни усложнения-смърт, нефатален миокарден инфаркт провеждане на реваскуларизация в сравнение с недиабетиците (37 % срещу 25 %). Правастатинът намалява абсолютния риск от коронарни усложнения при диабетите с 8,1 %, а при недиабетиците с 5,2 % и релативния риск с 25 % ($p=0,05$) и 23 % ($p=0,001$) съответно. Освен това е важен и фактът, че Правастатинът редуцира релативния риск от необходимостта от провеждането на реваскуларизационна процедура с 32 % ($p=0,04$) при диабетите. Лицата с нарушена глюкоза на гладно също така имат намален риск при сравняването на Правастатин с плацебо.

Това проучване ясно и категорично демонстрира, че диабетите и лицата с нарушен глюкозен толеранс имат повишен риск от повтарящи се коронарни усложнения. То още доказва благоприятните ефекти от терапията с Правастатин в този случай.

Намаляването на необходимостта от реваскуларизация има важно значение, тъй като диабетите имат акцелерирана атеросклероза като цяло и често показват акцелерирана рестеноза след перкутанна интервенция (10). Оклюзивната рестеноза засяга 18 % в едно проучване (4), повишавайки 10-годишната смъртност на 59 % в сравнение с 24 % смъртност при 32%, които са избегнали рестенозата и 35 % смъртност при 50 % с неоклузивна рестеноза. Тези стойности за рестенозата при диабетите са съществено по-високи, отколкото тези при недиабетиците, показвайки намалената необходимост от интервенция и от стратегията за по-агресивна медикаментозна редукция на сърдечно-съдовия риск при диабетно болните.

Статините коригират само частично диа-

бетната дислипидемия, но техните допълнителни ефекти могат да повишат тяхната ефективност.

Фибратите, повишавайки HDL-холестерола и намалявайки триглицеридите, могат да окажат адитивни ефекти. Ето защо комбинираната с тях терапия теоретично е атрактивна, въпреки че те трябва да се използват предпазливо при налична бъбречна дисфункция.

В заключение диабетите имат толкова повишен риск от развитието на сърдечно-съдови заболявания, че така наречената *първична превенция* е толкова важна, колкото и *вторичната превенция* при недиабетиците. Прогнозата за всеки болен от тип 2 захарен диабет е аналогична на тази за недиабетиците след първи исхемичен коронарен инцидент и следователно всеки тип 2-диабетик би трябвало да се лекува както при вторична превенция. *Превенцията* е ключовата дума и ранното започване на терапията със статини има добра доказателствена база и може добре да намали необходимостта от скъпите сърдечно-съдови интервенции, които при диабетите имат лимитиран успех.

Статините инхибират възпалителните процеси и прогресията на артериосклерозата и намаляват честотата на сърдечно-съдовите инциденти както в условията на първична, така и на вторична профилактика. Намаляването на индекс на телесната маса (ИТМ) под влиянието на тези медикаменти достига статистическа значимост. Лечението с *Аторвастатин* 80 мг дневно (3,5) и *Правастатин* 40 мг дневно (7) за период от 12 месеца има такъв ефект.

В тази връзка терапията със статини се явява крайъгълен камък в превенцията на сърдечно-съдовите усложнения при захарния диабет.

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Armitage J, L Bowman. Cardiovascular outcomes among participants with diabetes in the recent large statin trials. *Curr Opin Lipidol.* 2004 Aug; 15(4):439-46.
2. Auer J, R Berent, T Weber et al. Statins for patients with type 2 diabetes. *Lancet.* 2004 Aug 21; 364 (9435): 685-96.
3. Colhoun HM, DJ Betteridge, PN Durrington et al. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the CARDS: multicentre randomized placebo-controlled trial. *Lancet.* 2004 Aug 21; 364 (9435): 685-96.
4. Colhoun HM. Statins for patients with type 2 diabetes. *Lancet* 2004; 364: 1933.
5. Croom KF, GL Plosker. Atorvastatin: a review of its use in the primary prevention of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus. *Drugs.* 2005; 65(91): 137-52.
6. Danesh FR, YS Kanwar. Modulatory effects of HMG-CoA -reductase inhibitors in diabetic microangiopathy. *FASEB J.* 2004, May; 18(97): 805-15.
7. Freeman DJ, J Norrie, N Sattar et al. Pravastatin and the development of diabetes mellitus: evidence for a protective treatment effect in the West of Scotland Coronary prevention study. *Circulation,* 103, 2001, 357-362.
8. Khera A, D McGuire. Management of Diabetic Dyslipidemia: need for Reappraisal of the Goals. *Am J Cardiovasc Drugs,* 2005, vol. 5, № 2, 83-91.
9. Koshiyama H. The impact of statin treatment on diabetic patients. *Curr Opin Investig Drugs.* 2003 Apr; 4(4): 395-400.
10. Lee JD, JR Morrissey, DP Mikhailidis et al. CARDS on the table: should everybody with type 2 diabetes take a statin? *Curr med Res Opin.* 2005 Mar; 21(3): 357-62.
11. Lim HS, AJ Chong, B Freestone et al. The effect of multi-factorial intervention on plasma von Willebrand factor, soluble E-selectin and tissue factor in diabetes mellitus: implications for atherosclerotic vascular disease. *Diabet Med.* 2005 Mar; (2293): 249-55.
12. Paulo S, S Fernandes, R Vizinho et al. Statin therapy in the primary and secondary prevention of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes. *Rev Port Cardiol.* 2004 Nov; 23(11): 1461-82.
13. Rosenson RS. Cholesterol lowering in diabetes: new evidence supports aggressive LDL-C targets. *Postgrad. Med* 2005; 117(4): 7-27.
14. Soedamah-Muthu SS, CD Stehouwer. Cardiovascular disease morbidity and mortality in patients with type 1 diabetes mellitus: management strategies. *Treat Endocrinol.* 2005; 4(2): 75-86.
15. Tenenbaum A, EZ Fisman. Impaired glucose metabolism in patients with heart failure: pathophysiology and possible treatment strategies. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2004; 4(5): 269-80.
16. Vijan S, RA Hayward. Pharmacologic lipid-lowering therapy in type 2 diabetes mellitus: background paper for the American College of Physicians. *Ann Intern med.* 2004 Apr 20; 140(8): 650-8.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Д-р Иван Домусчиев, д. м.
гр. София, бул. „Генерал Скобелев“
МИ-ЦКБ-МВР, Клиника по ендокринология
сл. тел. 98 21 351 (98 21 353)
GSM 0887 69 52 35

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Ivan Domuschiev
Medical Institute- Central clinical base – Ministry
of Internal Affairs, Clinic of Endocrinology
Tel. 98 21 351 (98 21 353)
GSM 0887 69 52 35

Генетика на поликистозния овариален синдром (PCOS)

Илияна Атанасова¹, Мария Орбецова², Георги Коларов³

¹ Клиничен център по ендокринология, Медицински университет, София

² Клиника по Ендокринология, Медицински университет, Пловдив

³ СБАЛАГ „Майчин дом“, Медицински университет, София

Genetics of the polycystic ovary syndrome (PCOS)

Iliana Atanasova¹, Maria Orbezova², Georgi Kolarov³

¹ Clinical Center of Endocrinology, Medical University, Sofia

² Clinic of Endocrinology, Medical University, Plovdiv

³ SHATAG „Maichin dom“, Medical University, Sofia

Резюме

Поликистозният овариален синдром (PCOS), описан за първи път от Stein & Leventhal, е хетерогенно заболяване с неясна етиология, засягащо 6-10% от жените в репродуктивна възраст. Повишената честота на случаите с PCOS в едно семейство показва участието на генетични фактори. Установява се голяма вариабилност на фенотипа, както в едно и също семейство, така и между семействата на жени с PCOS, което силно затруднява работата по изясняване на участващите в заболяването генетични фактори. Някои проучвания показват етиологичната роля на мутация в един ген, предаваща се по автозомно-доминантен път с висока експресивност и вариабилна пенетрантност, докато други са в подкрепа на участието на много гени в патогенезата на заболяването и етиологичната роля на фактори на околната среда.

Abstract

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a heterogeneous disorder of uncertain etiology, affecting 6-10 % of women of reproductive age and is well recognized since Stein & Leventhal's first report. The increased frequency among first-degree family members is consistent with a genetic basis of this disorder. The great phenotype variations among members of one family and among different families makes difficult the genetic factors' evaluation. Some studies support a single autosomal dominant gene with high expression and variable penetrance in the etiology of the disorder, others verify oligogenic or polygenic pathogenesis in conjunction with environmental factors leading to heterogeneous clinical and biochemical phenotype but the type of inheritance remains uncertain. Several genes involved in the synthesis of

Понастоящем типът на унаследяване е неясен и се приема като по-вероятно участието на повече от един ген в патогенезата на заболяването под въздействието на фактори на околната среда, водещи до хетерогенен клиничен и биохимичен фенотип. Няколко биохимични вериги са в основата на теориите за етиологията и патогенезата на PCOS: синтеза на стероидни хормони, действието на гонадотропните хормони, инсулин-сигналната система и механизмите, регулиращи телесното тегло. Множество гени, участващи в тези вериги, са обект на проучване като кандидат-гени за PCOS, но INS VNTR и CYP11a са най-обещаващите кандидат-гени.

Дефинирането и наличието на консенсус за клиничните и биохимични критерии за диагноза ще улесни изясняването на участващите генетични фактори.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: поликистозен овариален синдром, генетика

Поликистозният овариален синдром (PCOS), описан за първи път от Stein & Leventhal (53), е хетерогенно заболяване с неясна етиология, засягащо 6-10 % от жените в репродуктивна възраст (3, 24, 43, 49). Голямото разнообразие на фенотипна изява може да се групира в три основни категории: клинични, ендокринни и метаболитни прояви. Клиничната характеристика включва: менструални нарушения, хирзутизъм, акне, алопеция, ановулаторни цикли и намален фертилитет, чести спонтанни аборти.

Хормоналните нарушения се характеризират с повишено ниво на андрогени, лутеинизиращ хормон, естрогени и пролактин. Метаболитните отклонения включват висока честота на инсулинова резистентност, затлъстяване, дислипидемия, 7 пъти по-висок риск от нарушен глюкозен толеранс и захарен диабет тип 2 (52). С оглед на това ендокринното нарушение се приема като синдром с хетерогенни клинични прояви, а не за заболяване. Хиперандрогенизмът и хроничната ановулация характеризират синдрома и често се асоциират с поликистоза на

стероидни хормони, действието на гонадотропни хормони, инсулин-сигналната система и регулирането на теглото са били тествани като кандидат-гени. The most promising are INS VNTR and Cyp11a.

The definition and consensus on clinical and biochemical criteria for diagnosis of PCOS will be of great help for the identification of the possible genetic factors.

KEY WORDS: polycystic ovary syndrome, genetics

яйчниците, хирзутизъм, затлъстяване и инсулинова резистентност. Само около 5-10 % от жените с PCOS имат типичните клинични прояви на синдрома (1, 54, 63). Понастоящем диагнозата се поставя въз основа на критериите приети на конференцията 1990 на NIH-NICHHD (National Institute of Health-National Institute of Child Health and Human Development, USA): овулаторна дисфункция, клинични прояви на хиперандрогенизъм и/или хиперандрогенемия и изключване на свързани заболявания като вродена надбъбречна хиперплазия, хиперпролактинемия или синдром на Кушинг (54). Намирането на овариална поликистоза при ултразвуково изследване с наличие на 8 или повече субкапсуларни фоликуларни кисти с диаметър < 10 mm и увеличена овариална строма не винаги е задължително, ако са изпълнени горепосочените критерии. Данните относно епидемиологията на PCOS варират в досегашните проучвания поради липсата на общоприети и добре дефинирани диагностични критерии. Cussons и сътр. (13) стигат до извода, че липсва

консенсус между ендокринолози и гинеколози по отношение на дефиницията, диагнозата и лечението на PCOS, в резултат на което пациентките получават различно лечение. Авторите са интервюирали 138 ендокринолози и 172 гинеколози и са установили, че ендокринолозите използват като основни диагностични критерии андрогенизацията и менструалните нарушения, а гинеколозите – поликистозата на яйчниците, андрогенизацията и повишеното отношение ЛХ/ФСХ. Използваните от ендокринолозите диагностични методи са измерване на андрогените, липидите и глюкозния толеранс, а от гинеколозите – ултразвукова диагностика. Изборът на терапия от ендокринолозите включва медикаменти за повишаване на инсулиновата чувствителност, а от гинеколозите – намеса в репродуктивните хормони. Липсата доскоро на общоприети диагностични критерии е една от най-важните причини за неяснотата относно участието на генетичните фактори в етиологията или патогенезата на PCOS.

Повишената честота на случаите с PCOS в едно семейство показва участието на генетични фактори (11, 22, 23, 26, 62). Понастоящем не е установен типът на унаследяване, нито определен ген или гени, отговорни за заболяването. При проучване семействата на жени с PCOS, Legro и сътр. (37, 38) намират, че около 50 % от сестрите на изследваните жени в репродуктивна възраст, са с хиперандрогенемия и хронична ановулация. Серумният дехидроепиандростерон-сулфат (DHEAS) е повишен при засегнатите сестри, което насочва към дефект във фактор, общ за регулацията на андрогенната биосинтеза в яйчника и надбъбречната кора. Установява се, че жените с PCOS имат инсулинова резистентност и повишени нива на LDL-холестерола. Тези резултати предполагат, че в наблюдаваните семейства метаболитните нарушения и хиперандрогенемията се предават заедно (4). Семейните проучвания показват, че братята на жени с PCOS са с инсулинова резистентност и повишени нива на DHEAS, т.е. репродуктивният и метаболитен фенотип на мъжете наподобява този на техните болели сестри (15). Установява се голяма вариабилност на фенотипа, както в едно и също семейство, така и меж-

ду семействата на жени с PCOS, което силно затруднява работата по изясняване на участващите в заболяването генетични фактори. Някои проучвания показват етиологичната роля на мутация в един ген предаваща се по автозомно-доминантен път с висока експресивност и вариабилна пенетрантност (8, 11, 12, 33, 35), докато други са в подкрепа на участието на много гени в патогенезата на заболяването и етиологичната роля на фактори на околната среда (22, 20). Понастоящем типът на унаследяване е неясен и се приема като по-вероятно участието на повече от един ген в патогенезата на заболяването.

Няколко биохимични вериги са в основата на теориите за етиологията и патогенезата на PCOS:

1. Синтеза на стероидни хормони (8, 23, 46)
2. Действието на гонадотропните хормони (20, 47)
3. Инсулин-сигналната система (7, 10, 15, 60)
4. Механизмите, регулиращи телесното тегло (44)

Множество гени, участващи в тези вериги, са обект на проучване като кандидат-гени за PCOS, но до момента няма еднопосочност на резултатите и единомислие между изследователите (32).

Кандидат гени за PCOS

- Гени, кодиращи стероидогенните ензими: steroidogenic acute regulatory protein (StAR), CYP11 α -cytochrome P450 side chain cleavage enzyme, CYP17-cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17, 20 lyase, CYP 19-cytochrome P450 aromatase, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type I, II, III, 3 β hydroxysteroid dehydrogenase type I, II
- Гени, участващи в секрецията и действието на инсулина: инсулинов рецептор, инсулинов ген VNTR, инсулин рецепторен субстрат 1, инсулин-подобен растежен фактор-I, инсулин-подобен растежен фактор I рецептор, инсулин-подобен растежен фактор свързващ протеин 1 + , PPAR γ .
- Други гени: андрогенен рецептор, фолитин, активин рецептор, инхибин A, β -A, β -B, C,

лутеинизиращ хормон β субеденица/лутеинизиращ хормон рецептор, фоликулостимулиращ хормон рецептор, лептин, лептин рецептор.

Например, мутация в гена за инсулиновия рецептор (INSR) е етиологичен фактор за няколко редки синдрома като лепрехаунизъм, Rason-Mendenhall синдром и синдром тип А, които подобно на PCOS, се характеризират с хиперандрогенизъм и инсулинова резистентност.

Липсата на убедителни данни, доказващи участието на определен кандидат-ген, са обичайни при полигенните, мултифакторни заболявания, където идентифицирането на участващите в синдрома генетични фактори се усложнява от генетичната хетерогенност и разнообразното участие на различни фактори на околната среда т.е. различни етиологични фактори. Освен това е налице: (1) хетерогенност на диагностичните критерии за дефиниция на PCOS; (2) липса на познат фенотип у мъжете родственици; (3) относително малки популационни извадки; (4) индиректна преценка на жените родственици на пробандите; (5) нерандомизирано проследяване на засегнатите фамилии.

I. Гени, кодиращи стероидогенните ензими

Генът на 17-хидроксилаза/17,20-лиазната активност /CYP17/

Проучвания на Rosenfield RL и сътр. (50) показват, че PCOS може да бъде резултат от повишена функция на ензими, катализиращи андрогенната продукция- cytochrome P450c17a. Този ензим включва едновременно 17 α хидроксилазна и 17, 20-лиазна активност. В тека-клетките той превръща прогестерона в 17 α хидроксипрогестерон посредством 17 α хидроксилазната си активност и след това превръща 17 α хидроксипрогестерона в андростендион посредством 17, 20-лиазната си активност.

Клинични проучвания показват нарушение в регулацията на P450c17a за сметка на повишена 17 α хидроксилазна активност и в по-малка степен 17,20-лиазна активност. При тези жени се установява усилен отговор на 17 α -хидроксипрогестерона при стимулация с агонисти на гонадотропин-рилизинг хормона (51). Из-

местването на отношението между двете ензимни активности в посока на 17 α хидроксилазната, е ключово в контрола на андрогенната биосинтеза и причина за нарушения в овариалната и надбъбречна андрогенна продукция. Генът, кодиращ цитохром P450c17 α , е CYP17 и се локализира в дългото рамо на 10 хромозома (10q24.3). Установен е генен полиморфизъм в регулаторния район на този ген, асоцииран с ир-регулация на експресията на CYP17, която предизвиква повишена синтеза на андрогени. Първоначалните проучвания са проведени върху твърде малка група болни (9) и разширяването им върху 96 лица не потвърждава данните за асоциация на описания полиморфизъм с PCOS (27). Серин фосфорилирането също участва в пост-транслационната регулация на 17,20-лиазната активност и андрогенна секреция. Предстои изясняване на сериновите остатъци, подлежащи на фосфорелиране и киназата, осъществяваща този процес. Доказването на тази теория би обединило инсулиновата резистентност с PCOS.

Генът, който продукт отцепва странична верига от холестерола /CYP11 α /

Проучвания върху култури от овариални тека-клетки показват, че тека-клетките от поликистозни яйчници произвеждат ексцесивни количества прогестерон, 17-ОН прогестерон и андростендион в сравнение с нормалните тека-клетки (22, 28). С оглед на това са търсени аномалии в стероидогенезата на или над нивото на прогестероновата биосинтеза. Така, Franks и сътр., изследвайки 20 семейства от европейски произход, откриват генен полиморфизъм в регулаторния регион на CYP11a (кодиращ отцепването на страничната верига на холестерола), който е свързан, както с изявата на PCOS, така и с повишени нива на тестостерона и го разглеждат като основен локус за предразположение към заболяването (23).

Ензимът, катализиращ превръщането на холестерола в прегненолон посредством отцепване на странична верига е цитохром P450ssc и се кодира от CYP11a гена в дългото рамо на 15 хромозома /15q24/. В промоторния район е ус-

тановен полиморизъм /VNTR/, който би могъл да играе важна роля в регулацията на генната експресия, вероятно посредством увеличаване скоростта на транскрипция. Gharani N. и сътр. (27) установиха асоциация между определен CYP11a алел и PCOS, което беше потвърдено от Diamanti-Kandarakis и сътр. (16) сред гръцки пациентки. Последващите проучвания, обаче, не потвърдиха тези данни с обяснението, че се дължат на популационни различия.

Един от обсъжданите кандидат-локуси за PCOS е генът на 21-хидроксилазата (CYP21). Около 33% от момичета с преждевременно пубархе или хиперандрогенизъм в проучване на Arslanian и сътр. са хетерозиготни носители на мутации в CYP21 в сравнение с 6% от контролната популация (2). Подобна честота на хетерозиготно носителство на мутации в CYP21 се съобщава при жени и деца с хиперандрогенизъм в Англия, Франция, Испания и Гърция (5, 15). Подобно на това са идентифицирани хетерозиготни варианти на гена на 3-бета-хидроксистероид дехидрогеназата (HSD3B2) при момичета с преждевременно пубархе и подрастващи момичета с хиперандрогенизъм (44).

Тъй като повечето от облигатните носители на мутации в CYP21 остават асимптоматични, независимо от леко повишените андрогенни нива, други фактори, например, допълнителни генетични варианти, които модифицират инсулиновата чувствителност и енергийния баланс, явно потенцират появата на хиперандрогенни характеристики. Witchel и сътр. намират, че наличието на полиморфизъм или мутации в мултиплените кандидат локуси, специално гените на ензимите на стероидогенезата, се срещат често при деца с преждевременно пубархе и подрастващи момичета с хиперандрогенизъм в сравнение с жени в зряла възраст (55).

Ароматазен ген (CYP19)

Ароматазите са ензимен комплекс (цитохром P450arom), който катализира превръщането на C19 стероидите (андрогени) в C18 (естрогени). При пациенти с ароматазен дефицит е установен хиперандрогенизъм (30, 31, 32, 44, 52, 57). Ароматазният ген CYP19 е локализиран в дългото рамо на 15 хромозома (15q21,1) и до

сега не е установена асоциация между алелите на този ген и PCOS.

II. Андроген рецепторен ген (AR)

Биологичният ефект на андрогените се осъществява посредством андрогенния рецептор. Той принадлежи към групата на ядрените транскрипционни фактори и се кодира от ген в дългото рамо на X хромозома (Xq11-12) (56). Подобно на другите стероидни рецептори, андрогенният рецептор има три функционални домена: лиганд (хормон) свързващ участък, ДНК-свързващ участък и трансактивиращ участък. В последния участък генът има различен по дължина полиморфен район от CAG последователности, кодиращ полиглутаминова верига в N-терминалния транс-активиращ домен на андрогенния рецептор (45, 46, 57, 58, 61). Проучванията *in vitro* показват обратна връзка между дължината на CAG последователностите и рецепторната активност, ето защо се очаква тази дължина да повлияе степента на чувствителност към андрогените. Legro и сътр. (41) не намират различия между броя на CAG последователностите, сравнявайки нормоандрогенни и хиперандрогенни латиноамериканки, но отбелязват обратна зависимост между дължината на повторението и степента на хирзутизма при нормоандрогенни жени с идиопатичен хирзутизъм. Това е в съответствие с данните за повишена чувствителност към андрогени при по-малка дължина на района. За разлика от това в Китай и Индия Mifsud и сътр. (45) намират сигнификантно по-къси CAG райони при жени с ниски андрогенни нива в сравнение с тези с високи андрогенни нива. Тъй като генът на AR е X-свързан и едното копие на X-хромозома е инактивирано при жените, начинът на X-инактивацията може да повлияе активността на AR и PCOS. Hickey и сътр. (33) сравняват X-инактивацията и дължината на CAG повторението при 83 фертилни и 122 стерилни жени с PCOS от бялата раса в Австралия. Те наблюдават по-голяма честота на дълго CAG повторение (> 22 CAG повторения) при стерилните жени с PCOS в сравнение с контролите или с общата популация и установяват преференциална експресия на по-дългите повторения в левкоцитите при жените с

PCOS. Функционалната значимост за други тъкани е неизвестна. Други клинични проучвания подкрепят функционалната значимост на този район. Патологичното му удължаване (над 40 повторения) предизвиква синдром на Kennedy, X-свързано заболяване със спинална и булбарна мускулна атрофия асоциирана с различна степен на резистентност към андрогени. От друга страна наличието на малки САГ последователности е свързано с повишен риск от рак на простатата и нисък риск от мъжки инфертилитет. Наскоро тази хипотеза получи нова подкрепа, поради установяване на връзка между късия САГ район и ниското серумно ниво на андрогените при ановулаторни пациентки. Тъй като посочените резултати, макар и много интересни, не са окончателни и в някои отношения са противоречиви, необходими са повече изследвания за потвърждаването им и за определяне на физиологичното им значение.

III. Гени, свързани с гонадотропните хормони

Ген за β -субединицата на лутеинизиращия хормон (LH)

Около 40 % от жените с PCOS имат повишена секреция на LH, което е свързано с ановулация, вероятно поради ефект върху ооцитната матурация (2, 50).

Установени са два молекулни варианта на LH. Единият е резултат на 2 точкови мутации във втори екзон на гена за β -субединицата, причиняващи структурни промени в LH молекулата. Този генетичен полиморфизъм е с честота около 18,5 %, като най-висока честота се установява в Северна Европа и най-ниска - в Азия. В сравнение с дивия тип LH, този генетичен вариант има по-висока биологична активност *in vitro*, но по-къс полуживот *in vivo*. Някои автори установяват асоциация между този генетичен вариант и повишените серумни нива на тестостерона. Други проучвания не потвърждават подобна връзка. Другият LH вариант е резултат на една *missense* мутация в трети екзон на β -субединицата и се установява в около 4 % от инфертилните жени. Не е установено физиологичното и патофизиологично значение на този генетичен вариант, чиято роля в менструалните

нарушения и женска инфертилитет е твърде вероятна.

Намерено е, че полиморфизмът на **FSH-рецепторния ген** при PCOS няма патофизиологична значимост по отношение на яйчниковата функция (12). При жени с PCOS не се срещат мутации на **GnRH-рецепторния ген** (10).

Ген за фолистатин

Urbanek и сътр. (57) проучват 37 кандидат гени за PCOS, участващи в репродукцията, секрецията и действието на инсулина и енергийната обмяна и установяват статистически достоверно участие на меркер близо до гена за фолистатин със синдрома. Фолистатинът е свързваният протеин на активина, неутрализиращ биологичната му активност *in vivo* и *in vitro*. Активин и фолистатин се експресират в яйчниците, надбъбречната кора, хипофизата и панкреаса. Активинът стимулира овариалната фоликулогенеза, подтилка андрогенната продукция, повишава FSH и инсулиновата секреция (6, 9, 27, 29, 47, 57). Повишената активност на фолистатина предизвиква противоположни ефекти и фенотип, сходен с PCOS. Секвенирането на фолистатиновия ген, обаче, не е показало асоциация на алелните специфичности с PCOS (25)

IV. Гени, свързани със секрецията и действието на инсулина

За първи път връзката между нарушения глюкозен толеранс и хиперандрогенизма е описана от Archard&Thiers (1) като „диабет на брадатите жени“. Много доказателствен материал беше натрупан в последното десетилетие относно връзката между PCOS и инсулиновата секреция и действие (4, 8, 54). Повечето пациентки с PCOS имат инсулинова резистентност и компенсаторна хиперинсулинемия, независимо от телесното тегло. Установена е положителна корелационна връзка между нивата на инсулина на гладно и андрогените като тежестта на хиперинсулинемията корелира с тежестта на клиничната симптоматика на синдрома. Кое от двете нарушения е първо и кое-последващо, е неизвестно. Понастоящем, обаче, се приема с голяма вероятност, че ендогенните андрогени не играят централна патофизиологична роля за

инсулиновата резистентност, а по-скоро обратното – нарушенията в действието на инсулина водят до повишаване на андрогените.

Няколко патофизиологични механизма водят до инсулинова резистентност: периферна тъканна резистентност, намален чернодробен клирънс и повишена бета-клетъчна чувствителност. Намалената инсулинова чувствителност е съчетана с бета-клетъчна дисфункция – повишена инсулинова секреция на гладно и намалена постпрандиално, което напомня захарен диабет тип 2 и е особено изразено при пациентки с първостепенни родственици със захарен диабет тип 2. Нормализирането на телесното тегло повлиява благоприятно инсулиновата резистентност, но дефектът в бета-клетъчната секреция на инсулина остава, което предполага, че нарушението е характерно за PCOS. Тези данни мотивираха проучването на гени, участващи в секрецията и действието на инсулина.

Инсулин рецепторен ген

Първоначално инсулиновата резистентност беше свързвана с инсулиновия рецептор – хетеротетрамерен гликопротеин, изграден от две α - и две β -субединици. Кодира се от един ген в 19 хромозома. Молекулярно-генетичните проучвания на инсулин-рецепторния ген показват изразен полиморфизъм в някои райони на гена. На настоящия етап се приема, че при жени с PCOS функцията на инсулиновия рецептор е нормална (14).

Нарушения се установяват в пост-рецепторното сигнализиране. Тирозин-автофосфорилирането повишава тирозин-киназната активност на рецептора, докато серин-фосфорилирането я подтиска. Тирозин-фосфорилираният инсулинов рецептор фосфорилира вътреклетъчните субстрати IRS-1 и IRS-2 като по този начин се извършва пренасяне на сигнала и се осъществяват плейотропните ефекти на инсулина. Някои автори (18) намират, че 50 % от жените с PCOS имат повишена инсулин-зависима серин-фосфорилация на β -субединицата на инсулиновия рецептор в клетъчни култури от кожни фибробласти и скелетен мускул. Серин-фосфорилираният инсулинов рецептор има нарушена сигнална трансдукция и следователно – дефект

в действието на инсулина. Този твърде вероятен механизъм на инсулинова резистентност при жените с PCOS е с неясна генетична основа. Допуска се участието на фактор, чийто ген е в близост с инсулиновия рецептор, отговорен за повишеното серин-фосфорилиране. Обсъжда се генен вариант на серин-киназа или активиране на киназата от автокринен фактор. Приема се, че дефектът в действието на инсулина засяга само глюкозния метаболизъм, докато другите му биологични ефекти, вкл. върху стероидогенезата не са нарушени (55). Заслужава да се отбележи, че серин-фосфорилирането на IRS-1 е част от TNF- α медираната инсулинова резистентност при затлъстяване (49). Серин-фосфорилирането увеличава активността на един ключов за андрогенната биосинтеза регулаторен ензим – P415c17 в яйчниците и надбъбрека. Следователно, възможно е един дефект в серин-фосфорилирането да води и до инсулинова резистентност, и до хиперандрогенизъм при жени с PCOS.

Два вторични посредника, участващи в предаването на инсулиновия сигнал, са тествани като кандидат гени за PCOS – инсулин-рецепторен субстрат-1 (IRS-1) и инсулин-рецепторен субстрат-2 (ISR-2). El Mkaadem и сътр. (21) изследват ролята на два алелни варианта: IRS-1, Gly972Arg и IRS-2, Gly1057Asp при жени с PCOS с повишени и нормални нива на инсулина на гладно и при контролна група здрави жени. И двата варианта са свързани само с повишените нива на инсулина, но не и с PCOS *per se*. Инсулиновата резистентност е по-тежка при жените с PCOS, носителки едновременно и на двата варианта.

За изясняване на пострецепторния дефект в действието на инсулина при PCOS, Book&Dunaif (7), проучват метаболитните и митогенни ефекти на инсулина и IGF-1 в култури от фибробласти от жени със заболяването. Авторите стигат до извода, че:

a/ е налице селективен дефект в метаболитния, но не и митогенния ефект

b/ подобен е дефекта в действието на IGF-1, което означава, че инсулинът и IGF-1 стимулират синтезата на гликогена по общ пострецепторен път и

в/ IRS-1-свързаната фосфатидил/инозитол 3-киназна активност от инсулина и IGF-1 е нормална, следователно дефектът е или под това звено или по друг път.

Въпреки доказателствата, че инсулинът усилюва андрогенната продукция при PCOS, точният клетъчен механизъм остава неясен. Първоначално се приемаше наличието на кръстосана реакция със структурно сходния рецептор на IGF-1 (6) върху овариалните тека клетки. Афинитетът на свързване на инсулина с рецептора за IGF-1 е 50-500 пъти по-нисък, което би означавало, че стимулирането на този рецептор от инсулина би изисквало много високо серумно ниво. Допусна се наличието на хибриден рецептор, който би свързвал с еднакъв афинитет инсулина и IGF-1(51). Проучванията на Wilies&Franks (59, 60), с използване на антитела към инсулиновия и IGF-1 рецептор, показаха, че ефектът на инсулина върху стероидогенезата на човешки гранулоза-клетки *in vitro* е единствено посредством собствения му рецептор.

Инсулинов ген

Установеното нарушение в първата фаза на инсулинова секреция при пациентки с PCOS, доведе до проучване на инсулиновия ген (10, 28, 36, 39, 40, 44). Той се локализира в късото рамо на 11 хромозома (11p15,5) между гените за инсулин-растежен фактор-II /IGF-II/ и гена за тирозин-хидроксилаза. До 5' края на инсулиновия ген е локализиран минисателит (INS VNTR-insulin gene variable number of tandem repeats), който директно участва в регулацията на инсулиновото действие. Това е силно полиморфен район, изграден от тандемно повтарящи се 14-15 базови двойки. Броят на повторенията варира от 26 до 200. По този критерий-размер на INS VNTR са оформени три класа алели: клас I са най-къси с 26-63 повтарящи се единици, клас II алелите, редки при Европидната раса са със средна дължина 80 повтарящи се единици, и клас III са най-дългите-141-209 повторения. Полиморфизмът на INS VNTR е функционален, тъй като регулира транскрипцията на инсулиновия ген и вероятно – експресията на IGF-I. Установено е, че инсулинов промотер с дълъг INS VNTR алел има по-висока тран-

скрипционна активност от късия алел.. Нещо повече, INS VNTR може да се свързва с няколко транскрипционни фактора, като Pur-1, който увеличава базалната транскрипция от инсулиновия промотер дори и в клетки, които нормално не експресират този ген. Клас III алелите на INS VNTR се асоциират с инсулинова резистентност и хипертриглицеридемия, висцерален обезитет и повишено тегло на новороденото. Мета анализ на хомозиготи клас III INS VNTR потвърждава връзката със захарен диабет тип 2, а хомозиготност по клас I алели – със захарен диабет тип I. Waterworth et al (58) доказаха асоциация между PCOS (най-вече ановулаторния) с хомозиготността по клас III INS VNTR. Жените с един или два алела от клас III, имат значимо по-високи стойности на инсулин на гладно и по-висок ИТМ в сравнение с жените с генотип I/I. Тези данни обясняват високата честота на инсулинова резистентност и хиперинсулинемия при жени с поликистоза на яйчниците и ановулаторни цикли в сравнение с пациентки с хиперандрогенемия и редовен менструален цикъл. В 60 % от членовете на 17 семейства на жени с PCOS и мъжки тип оплешивяване от три различни етнически популации се открива връзка на нарушенията с клас III алелите на INS VNTR (хомозиготен III/III генотип). Клас III алели са най-силно свързани с ановулаторен PCOS. Установява се сигнификантно по-често предаване на клас III алелите от бащата, отколкото от майката. Тази положителна връзка между унаследените по бащина линия клас III алели се потвърждава от Michelmore и сътр. (42).

Сравнително проучване в Испания от Calvo и сътр. не намира връзка между инсулиновия ген VNTR и наличието на хиперандрогенизъм (10). Такива са и заключенията на Urbanek и сътр. при голяма извадка от 150 фамилии (57, 58). Възможна причина за противоречивите резултати могат да бъдат различните методи на генотипизиране на VNTR (директно определяне размера на INS VNTR спрямо използване на тясно свързан единствен нуклеотиден полиморфизъм като маркер за VNTR), както и разлики във фенотипните характеристики на пациентите в отделните проучвания.

Известно е, че калпаин-10 (цистеинова

протеаза) играе роля в секрецията и действието на инсулина, поради което последният също е изследван като възможен кандидат ген за PCOS. Ehrmann и сътр.(21) тестват жени с PCOS (124 от европейски произход и 57 афроамериканки) за връзка между асоциирания със захарен диабет тип 2 ДНК полиморфизъм и серия фенотипни характеристики на PCOS. Такава връзка при жените с PCOS от европейски произход не е намерена, но при популацията афроамериканки генотипът 112/121 е сигнификантно асоцииран с повишени инсулинови нива в хода на орален глюкозотолерантен тест (oГТТ). В друго проучване при 331 жени, обаче, Haddad и сътр. не потвърждават наличието на такава зависимост (32).

Логичен е въпросът, ако инсулиновата резистентност и хиперинсулинемията имат важна патогенетична роля при PCOS, то защо всички пациентки с хиперинсулинемия не са и с хиперандрогенемия? Защо яйчникът се явява инсулин-чувствителен при инсулин-резистентно състояние? Дали инсулинът активира отделна от глюкозния транспорт сигнална система, стимулираща стероидогенезата? Редица проучвания показват, че инсулиновата резистентност и репродуктивните нарушения са проява на различни генетични дефекти, че инсулиновата резистентност демаскира синдрома при генетично предразположени жени и по тази причина, жени с хиперандрогенизъм и хронична ановулация са инсулин-резистентни (20, 28, 44).

V. Други регулаторни гени

Някои автори намират, че жени с PCOS и аменорея по-често в сравнение със здрави контроли са хетерозиготни или хомозиготни за 4G полиморфизъм на PAI-1 (инхибитор на плазминогененовия активатор) и имат повишена активност на PAI-1 (34). Плазминът и плазмин активирани колагенази са необходими за развитието и руптурата на фоликулите. Плазминогеновият активатор и PAI-1 се произвеждат от овариалните гранулоза-клетки на редица видове, продукцията им е зависима от LH и FSH и нараства бързо в преовулаторните фоликули. Инхибиторите на плазминогеновия активатор потискат овулацията по доза-зависим начин. Нарушенията в интраовариалната система

плазминоген-плазмин, вторично на повишената продукция на PAI-1 могат да играят роля и като първично нарушение в ановулаторния процес при PCOS.

Лептинът, продукт на гена на затлъстяването (ob gene), корелира положително с ИТМ и варира в зависимост от менструалния цикъл, нивото на прогестерона и е най-висок в лутеалната фаза. Тези данни показват регулаторната роля на лептина за овариалната функция. Липсват, обаче, данни за мутации в гена за лептин или лептин-рецептор при жени с PCOS (48).

Заключение

Участието на генетичните фактори в етиологията или патогенезата на PCOS остава неизяснено. Понастоящем се приема, че заболяването е олигоценно т.е. резултат от взаимодействието на няколко гена, под въздействието на фактори на околната среда, водещи до хетерогенен клиничен и биохимичен фенотип. Дефинирането и наличието на консесус за клиничните и биохимични критерии за диагноза ще улесни изясняването на участващите генетични фактори.

Липсват неоспорими доказателства за участието на всеки от изучаваните до момента кандидат-гени. INS VNTR и CYP11a са най-обещаващите кандидат-гени, но са необходими още доказателства. Необходимо е изучаването на повече кандидат-гени, особено тези, участващи в метаболитните и транспортни процеси на хормоните. Изясняването на генетичните фактори участващи в патогенезата на PCOS ще даде възможност за семеен скрининг, ранна диагноза и оценка на риска от заболяване.

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Archard C., J. Thiers. Le verilisme et son association a l'insuffisance glycolitique (diabetes des femmes a barb) *Bull Acad natl Med*, 1921, 86, 51-64
2. Arslanian SA, SF Witchel. Polycystic ovary syndrome in adolescents: is there an epidemic? *Growth and development* 2002; 9(1): 32-42.
3. Balen A. Pathogenesis of polycystic ovary syndrome - the enigma unravels? *Lancet* 1999; 354 : 967-968.

4. Bennett ST, JA Todd, DM Waterworth, et al. Association of insulin gene VNTR polymorphism with polycystic ovary syndrome. *Lancet* 1997; 349: 1771-1772.
5. Bentley-Lewis R, RS Legro, SC Wang, et al. Clustering of insulin resistance and lipoprotein changes in polycystic ovary syndrome (PCOS) families - co-segregation with hyperandrogenemia rather than anovulation. *Proc Annu Meet Endocr Soc*, 82nd, Toronto, Canada, 2000, Abstract 1808.
6. Bergh C., B. Carisson, J. Olsson, U Selleskog, T. Hillenjo. Regulation of androgen production in cultured human thecal cells by insulin-like growth factor I and insulin. *Fertil Steril*, 1993, 59, 323-331
7. Blanche H, P Vexiau, S Clauin, et al. Exhaustive screening of the 21-hydroxylase gene in a population of hyperandrogenic women. *Hum Genet* 1997; 101: 56-60.
8. Book C., A. Dinaif. Selective insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocr Metab*, 1999, 84, 3110-3116
9. Calvo RM, G Villuendas, J Sancho, et al. Role of the follistatin gene in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2001; 75:1020-1023.
10. Calvo RM, D Telleria, J Sancho, et al. Insulin gene variable number of tandem repeats regulatory polymorphism is not associated with hyperandrogenism in Spanish women. *Fertil Steril* 2002; 77: 666-668.
11. Carey AH, KI Chan, F Short, et al. Evidence for a single gene effect causing polycystic ovaries and male pattern baldness. *Clin Endocrinol* 1993; 38: 653-658.
12. Carey AH., D. Waterworth, K. Patel, D. White, J. Little, p. Novelli. Polycystic ovaries and premature male pattern baldness are associated with one allele of the steroid metabolism gene CYP17. *Hum Mol Gen.* 1994, 3, 1873-1876
13. Cohen DP, EM Stein, Z Li, et al. Molecular analysis of the gonadotropin-releasing hormone receptor in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1999; 72(2): 360-363.
14. Conway G, C Avey, G Rumsby. The tyrosine kinase domain of the insulin receptor gene is normal in women with hyperinsulinaemia and polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 1994, 9:1681-1683.
15. Conway GS, E Conway, C Walker, et al. Mutation screening and isoform prevalence of the follicle stimulating hormone receptor gene in women with premature ovarian failure, resistant ovary syndrome and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999; 51(1): 97-99.
16. Cooper HE, WN Spellacy, KA Prem, et al. Hereditary factors in Stein-Leventhal syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1968;100: 371-387.
17. Cussons A., B. Stuckey, J. Walsh, V. Burke, R. Norman. Polycystic ovarian syndrome: marked difference between endocrinologists and gynecologists. *Clin Endocrinol.*, 62, 2005, 3, 289-295
18. Dacou-Voutetakis C, M Dracopoulou. High incidence of molecular defects of the CYP21 gene in patients with premature adrenarache. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:1570-1574.
19. Diamanto-Kandarakis E., C. Kouli, A. Bergiele, F. Filandra, C. Tsanateli, G. Spina. A survey of the polycystic ovary syndrome in the Greek island Lesbos: hormonal and metabolic profile. *J. Clin endocrinol Metab.* 1999, 84, 4006-4011
20. Dunaif A, A Thomas. Current concepts in the polycystic ovary syndrome. *Annu Rev Med* 2001; 52: 401-419.
21. Ehrmann DA, PE Schwarz, M Hara, et al. Relation of calpain-10 genotype to phenotypic features of polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87:1669-1673.
22. Eldar-Geva T, IM Spitz, NP Groome, et al.: Follistatin and activin A serum concentrations in obese and non-obese patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2001, 16:2552-2556.
23. El Mkaem SA, C Lautier, F Macari, et al. Role of allelic variants Gly972Arg of IRS-1 and Gly1057Asp of IRS-2 in moderate-to-severe insulin resistance of women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 2001, 50:2164-2168.
24. Franks S. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1995; 333: 853-861.
25. Franks, S, D Willis, H Mason, et al. Comparative androgen production from theca cells of normal women and women with polycystic ovaries. In Polycystic ovary syndrome, Chang RJ (ed), Springer, New York, 1996; pp 154-164.
26. Franks S, N Gharani, D Waterworth, et al. Genetics of polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 145 (1-2): 123-128.
27. Franks S, N Gharani, M McCarthy. Genetic abnormalities in polycystic ovary syndrome. *Ann Endocrinol (Paris)* 1999; 60: 131-133.
28. Franks S, N Gharani, M McCarthy. Candidate genes in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 405-410.
29. Fujiwara T, Y Sidis, C Welt, et al. Dynamics of inhibin subunit and follistatin mRNA during development of normal and polycystic ovary syndrome follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4206-4215.
30. Gharani N, DM Waterworth, R Williamson, et al. 5' polymorphism of the CYP17 gene is not associated with serum testosterone levels in women with polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 4174.
31. Gilling-Smith C, DS Willis, RW Beard, et al. Hypersecretion of androstendione by isolated theca cells from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79, 1158-1165.
32. Haddad L, JC Evans, N Gharani, et al. Variation within the Type 2 Diabetes Susceptibility Gene Calpain-10 and Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87:2606-2610.
33. Hickey T, A Chandy, RJ Norman. The androgen receptor CAG repeat polymorphism and X-chromosome inactivation in Australian Caucasian women with infertility related to polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:161-165.
34. Hoffstedt J, IL Andersson, L Persson, et al.: The common -675 4G/5G polymorphism in the plasminogen activator inhibitor -1 gene is strongly associated with obesity. *Diabetologia* 2002; 45: 584-587.
35. Jahanfar S, JA Eden, P Warren, et al. A twin study of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1995; 63: 478-486.
36. Kao L-C, M Urbanek, D Driscoll, et al. The genetic basis of polycystic ovary syndrome. In The Polycystic Ovary. Ed. Kovas G. Cambridge: Cambridge University Press; 2000: 35-48.
37. Kashar-Miller M, R Azziz. Heritability and the risk of developing androgen excess. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999; 69(1-6): 261-268.
38. Kashar-Miller MD, C Nixon, LR Boots, et al. Prevalence of polycystic ovary syndrome (PCOS) in first degree rela-

tives of patients with PCOS. *Fertil Steril* 2001; 75:53-58.

39. Le Stunff C, D Fallin, NJ Schork, et al. The insulin gene VNTR is associated with fasting insulin levels and development of juvenile obesity. *Nat Genet* 2000, 26:444-446.

40. Le Stunff C, D Fallin, B Pougneres. Paternal transmission of the very common class I INS VNTR alleles predisposes to childhood obesity. *Nat Genet* 2001, 29:96-99.

41. Legro R, B Shahbahrami, R Lobo, et al. Size polymorphisms of the androgen receptor among female Hispanics and correlation with androgenic characteristics. *Obstet Gynecol* 1994; 83: 701-706.

42. Legro RS, D Driscoll, JF Strauss, et al. Evidence for a genetic basis for hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:14956-14960.

43. Legro RS. Polycystic ovary syndrome: the new millennium. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 186: 219-225.

44. Michelmore K, K Ong, S Mason, et al. Clinical features in women with polycystic ovaries: relationships to insulin sensitivity, insulin gene VNTR and birth weight. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001; 55: 439-446.

45. Mifsud A, S Ramirez, EL Yong. Androgen receptor gene CAG trinucleotide repeats in anovulatory infertility and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3484-3488.

46. Nayak S, PA Lee, SF Witche. Variants of the type II 3[beta]-hydroxysteroid dehydrogenase gene in children with premature pubic hair and hyperandrogenic adolescents. *Molec Genet Metab* 1998; 64:184-192.

47. Norman RJ, CR Milner, NP Groome, et al. Circulating follistatin concentrations are higher and activin concentrations are lower in polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 2001, 16:668-672.

48. Oksanen L, A. Titinen, J. Kaprio, H. Koistinen, S. Karonen, K. Kontula. No evidence for mutations of the leptin or leptin receptor genes in women with polycystic ovary syndrome. *Mol Hum Repr*, 2000, 6, 873-876

49. Rosen E., B. Spiegelman. Tumor necrosis factor- α as a mediator of insulin resistance of obesity. *Curr Op Endocr Diab*, 1999, 6, 170-176

50. Rosenfield, R., R. Barnes, D. Ehrmann. Dysregulation of cytochrome P450c 17 α as the cause of polycystic ovarian syndrome. *Fertility and sterility*, 1990, 53, 785-791

51. Rosenfield, R., R. Barnes, D. Ehrmann. Studies of the nature of 17-hydroxyprogesterone hyperresponsiveness to gonadotropin-releasing hormone agonist challenge in functional ovarian hyperandrogenism. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 1994, 79, 1686-1692

52. Siddle K., M. Soos, C. Field, B. Nave. Hybrid and atypical insulin/insulin-like growth factor I receptors. *Horm res*, 1994, 41, 56-64

53. Stein, I., M. Leventhal. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obst Gynecol* 1935, 29, 181-191

54. Tapanainen JS, R Koivunen, BC Fauser, et al. A new contributing factor to polycystic ovary syndrome: the genetic variant of luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1711-1715.

55. Tsilchorozidou, T., C. Overton, G. Conway. The Pathophysiology of Polycystic Ovary Syndrome. *Clin. Endocrinol.*, 60, 2004, 1, 1-17

56. Tucci S, W Futterweit, FS Concepcion, et al. Evidence for association of polycystic ovary syndrome in caucasian women with a marker at the insulin receptor gene locus. *J Clin Endocrinol Metabol* 2001; 86: 446-449.

57. Urbanek M, R Legro, D Driscoll, R. Azziz, D. Ehrmann, R. Norman, J. Strauss, R. Spielman, A. Dunaif. Thirty-seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: Strongest evidence for linkage is with follistatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96, 8573-8578.

58. Urbanek M, RS Legro, D Driscoll, et al. Searching for the polycystic ovary syndrome genes. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000; 13:1311-1313.

59. Waterworth DM, ST Bennett, N Gharani, et al. Linkage and association of insulin gene VNTR regulatory polymorphism with polycystic ovary syndrome. *Lancet* 1997; 349: 986-989.

60. Willis D., S. Franks. Insulin action in human granulose cells from normal and polycystic ovaries is mediated by the insulin receptor and not the type-I insulin-like growth factor receptor. *J Clin Endocr Metab*. 1995, 80, 3788-3790

61. Witchel SF, R Smith, M Tomboc, et al. Candidate gene analysis in premature pubarche and adolescent hyperandrogenism. *Fertil Steril* 2001; 75: 724-730.

62. Xita, N., I. Georgiou, A. Tsatsoulis. The genetic basis of polycystic ovary syndrome. *European J. Endocrinol.*, 2002, 147, 717-725

63. Zawadzki JK., A. Dunaif: Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. In: Polycystic Ovary Syndrome (Eds. A. Dunaif, JR. Givens, F. Haseltine, G.R. Merriam, M.A. Boston) *Blackwell*, 1992, 377-384

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Д-р Илияна Атанасова, д.м.н.
Клиничен център по ендокринология
Медицински университет,
Ул. Дамян Груев № 6-8, София-1303
e-mail: atanasova_meddia@abv.bg

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Dr Iliana Atanasova, MD, PhD
Clinical Center of Endocrinology, Medical University, Damian Gruev str. 6-8, Sofia 1303
e-mail: : atanasova_meddia@abv.bg

Ефект на рекомбинантен ФСХ (Gonal-F и Puregon) върху синтеза и секрецията на Естрадиол-17 бета от човешки гранулозни клетки ин-витро

Пламен Тодоров, Росица Конакчиева, Йосиф Димитров*

Институт по Биология и Иммунология на Размножаването – Българска Академия на Науките;
АГ Център Й. Димитров, София*

Effects of different recombinant FSH (Gonal-F and Puregon) on Estradiol-17 beta production and release by human granulosa cells in vitro

Plamen Todorov, Rossitza Konakchieva, Yosif Dimitrov*

Institute of Biology and Immunology of Reproduction – Bulgarian Academy of Sciences

*Center for Human Reproduction, Sofia

Резюме

За предизвикване на хиперстимулация в асистираната репродукция се използват уринарни и рекомбинантни гонадотропни хормони, като относителният дял на вторите постоянно нараства поради редица преимущества. В настоящото изследване сравнихме непосредственото въздействие на два използвани в практиката препарата рекомбинантен човешки ФСХ - Gonal-F (Serono) и Puregon (Organon) върху функционалната активност на човешки гранулозни клетки „ин-витро“. Чисти култури бяха изолирани от аспири, получавани от жени, участващи в програмите за „ин витро“ оплождане. Произволно избрани култури бяха инкубирани с човешки рекомбинантен ФСХ /съответно Gonal-F или Puregon/ в присъствие или отсъствие на тестостерон. Съдържанието на естрадиол-17 бета в средата беше изследвано чрез

Abstract

Recent clinical protocols for assisted reproduction include ovarian hyperstimulation by means of urinary or recombinant gonadotropic hormones, by the predominant use of the latter for several important reasons. In the present study we compared the direct in-vitro effect on the functional activity of human granulosa cells of two recombinant preparations of human FSH - Gonal-F and Puregon. Pure cultures were isolated from follicular aspirates received from women involved in IVF programmes. Randomly selected cultures were incubated with recombinant FSH (Gonal-F or Puregon) in the absence or presence of testosterone. Estradiol-17 beta concentration was measured in the supernatants by direct radioimmunoassay. The separate incubation of the cultures with Gonal-F or Puregon caused increase in the estrogen synthesis which was statistically significant

директен радиоимунологичен анализ. Самостоятелното добавяне на Gonal-F и Puregon към клетъчните култури предизвика повишение в естрогеновата синтеза, като достоверно по-високо ($p < 0,05$) базално ниво в сравнение с клетките култивирани само в хранителна среда ($3,5 \pm 1,2$ пг/мл) се установи в супернатантите от културите инкубирани с Gonal-F ($9,8 \pm 1,9$ пг/мл). В присъствие на тестостерон и при двата гонадотропни препарата се постигна достоверна стимулация на естрадиоловата секреция от гранулозните клетки спрямо контролните култури ($8,5 \pm 3,1$ пг/мл; $p < 0,05$ за Puregon и $18,9 \pm 7,2$ пг/мл; $p < 0,01$ за Gonal-F), като процентно спрямо базалните стойности измерени в контролите ефектът от стимулацията беше приблизително еднакъв за двата гонадотропина (221 % за Puregon и 192 % за Gonal-F). Нашите изследвания показват повишена базална секреция на естрогени от гранулозни клетки в присъствие на Gonal-F и сходен секреторен отговор на двата изследвани гонадотропни препарата. Данните свидетелстват за близката им биологична активност, която е в основата на техния благоприятен клиничен ефект.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: човешки гранулозни клетки, естрадиол-17 бета, Gonal-F, Puregon

УВОД

Успехът на асистираните репродуктивни технологии в голяма степен се определя от адекватната хормонална стимулация на яйчниците. За предизвикване на хиперстимулация в практиката се използват уринарни и рекомбинантни гонадотропни хормони, като относителният дял на вторите постоянно нараства. Данните относно преимуществата на рекомбинантните гонадотропини се базират основно на клинични резултати (1), като сравнително по-слабо е проучен ефектът им върху овариалните клетки при „ин-витро“ условия. Известно е, че човешките преовулаторни фоликули съдържат 50×10^6 гранулозни клетки, които секретират стероидни хормони (2). Механизмите на гонадотропна регулация на стероидогенезата са

($p < 0,05$) compared to cells grown only in medium ($3,5 \pm 1,2$ pg/ml) only with Gonal-F ($9,8 \pm 1,9$ pg/ml). Following combined treatment of Gonal-F or Puregon with testosterone there was a significant enhancement of estradiol-17 beta release for both gonadotropins compared to controls ($8,5 \pm 3,1$ pg/ml; $p < 0,05$ for Puregon and $18,9 \pm 7,2$ pg/ml; $p < 0,01$ for Gonal-F). Percent stimulation over the basal secretion was 221 % in the case of Puregon and 192 % in the case of Gonal-F respectively. In conclusion, our data demonstrated enhanced basal estrogen release of granulosa cells when incubated with Gonal-F and similar secretory response to both gonadotropins in the presence of androgen precursor. The results are in accordance with other findings of close biological activity of the recombinant preparations used, which underlies their beneficial clinical effect.

KEY WORDS: human granulosa cells, estradiol-17 beta, Gonal-F, Puregon

сравнително добре проучени: лутеинизиращият хормон (ЛХ) стимулира клетките на тека интерна да произвеждат андрогени (3), които могат да бъдат конвертирани в естрогени под действието на ензима ароматаза в гранулозните клетки при синергичното въздействие върху яйчниковата тъкан на фоликулостимулиращия хормон (ФСХ) съвместно с ЛХ. За степента на зрялост и функционална активност на гранулозните клетки би могло да се съди по способността им да секретират естрадиол при култивиране „ин витро“ както в среда, не съдържаща андрогенни прекурсори, така и след тяхното добавяне в присъствие или отсъствие на гонадотропна стимулация (базална и стимулирана секреция). От основно значение за диференцирането на стероидогенната функция на гранулозните клетки е прецизната стимулация с ФСХ тъй ка-

то е добре известно, че ароматазата се активира в негово присъствие (4). С цел да проследим *per se* ефекта на ново поколение рекомбинантни човешки гонадотропни хормони върху стероидната секреция на култивирани „*in vitro*“ човешки гранулозни клетки в настоящото изследване сравнихме ефекта на два използвани в практиката препарата рекомбинантен човешки ФСХ – Gonal-F (Serono) и Puregon (Organon).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Получаване и култивиране на човешки гранулозни клетки

Човешки гранулозни клетки бяха изолирани от аспириати, получавани при пункции на фоликули на жени, участващи в програмите за „*in vitro*“ оплождане. След отделяне на кумулусоцитните комплекси аспириатите бяха центрофугирани. Получената утайка беше инкубирана в среда, съдържаща ензими /трипсин, Trypsin-1,0 % (Versen-0,075) и 0,2 % хиалуронидаза, 80 IU/ml, Medicult/, неколкократно тритурирана през игла 20G и повторно центрофугирана. След отделяне на супернатантата утаените клетки (смесена суспензия от гранулозни клетки, еритроцити, примордиални фоликули и др.) бяха култивирани в 24-ямкови плаки при плътност 1×10^6 клетки. Неколкократно през 24-часови интервали културалната среда беше подменяна с цел отделяне на неприкрепените към дъното клетки. За култивиране беше използвана среда DMEM - Ham's F-12, обогатена с 10 % FBS, L-глутамин, фибронектин (8 мкг/мл) и инсулин:трансферин:селен (5 мкг/мл:5 мкг/мл:5 нг/мл). За подтискане растежа на фибробластите и дедиференциацията на епителните клетки през първите три дни към средата добавяхме серотонин в концентрация 10 мкг/мл (5). След получаване на конфлуентен монослой отделените гранулозни клетки бяха трипсинизирани и препосявани в нови плаки в концентрация 5×10^4 клетки/ямка. Изследване на базална и стимулирана секреция на естрадиол-17 бета:

При достигане на 50-60 % конфлуентност на монослоя към средата за култивиране на произволно избрани ямки с клетки бе добавян според експерименталния протокол човешки рекомбинантен ФСХ (съответно Gonal-F или Puregon) в концентрация 0,75 IU/мл. С цел изследване на способността на гранулозните клетки

да използват андрогени като прекурсор на естрадиол-17 бета към средата за култивиране добавяхме свръхпречистен тестостерон (Fluka) в концентрация 10 нмол/л в отсъствие или присъствие на гонадотропини. След 24 часа клетките бяха промивани и култивирани в продължение на още 24 часа в среда, несъдържаща серум (0,4 мл/ямка). След аспириране на средата чрез радиоимунологичен анализ беше определяно количеството на съдържащата се в нея естрадиол-17 бета.

Радиоимунологичен анализ

Съдържанието на естрадиол-17 бета в средата беше изследвано чрез директен радиоимунологичен анализ (6). Основните параметри на анализа бяха както следва: чувствителност - $3,2 \pm 0,7$ пг/мл, коефициенти на вътрешна грешка на анализа и на грешка между анализите съответно $5,2 \pm 1,4\%$ и $9,4 \pm 2,1\%$ ($n=10$, x с SEM). За всяко експериментално третиране бяха използвани от четири до шест ямки, като за контроли на анализа са използвани хранителната среда за инкубация и разтворите на съответните гонадотропни препарати в отсъствие на клетки. Резултатите са представени като средна стойност + SEM от „*in vitro*“ експериментите с три независими култури от различни пациенти. Статистическа обработка на данните от експериментите беше извършвана посредством *t*-тест на Student като за статистически достоверна беше приемана разлика при $p < 0,05$.

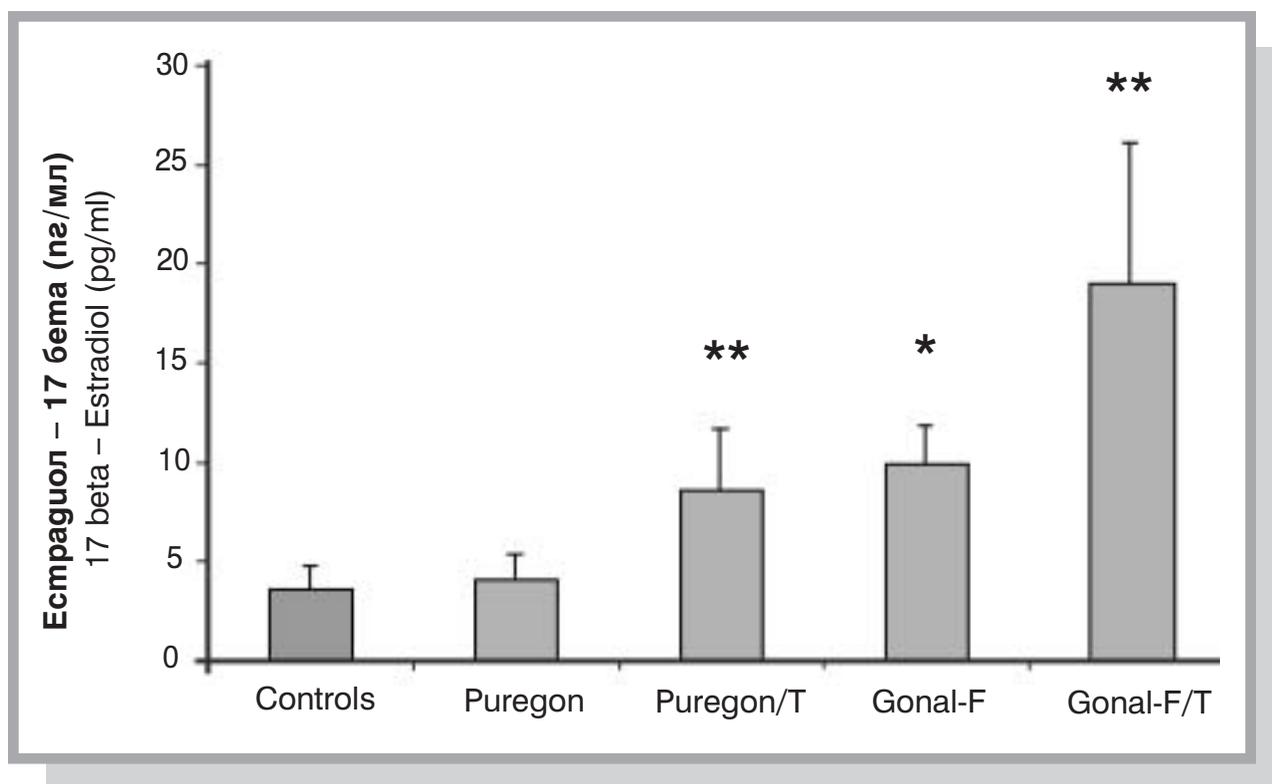
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Предшественик за синтезата на стероидни хормони в яйчника е холестеролът, който може да се образува в клетките на жлезата или да се транспортира от други тъкани. Той се явява субстрат за синтезата на прегненолалана, който се превръща последователно в прогестерон, андрогени и естрогени. Най-същественният момент от синтезата на естрогени е ароматизирането на молекулата на тестостерона. При култивиране „*in vitro*“ на гранулозните клетки с течение на времето трансферираният в тях тестостерон се изчерпва, което изисква добавянето на екзогенен тестостерон към средата за култивиране.

На фиг. 1 са представени данните от 3 независими „*in vitro*“ експеримента с изолирани човешки гранулозни клетки. Самостоятелното добавяне на Gonal-F и Puregon към клетъчните култури предизвиква повишение в естро

Фигура 1. Ефект на Puregon и Gonal-F (0,75 IU/ml) върху секрецията на естрадиол-17 бета в изолирани култури от човешки гранулозни клетки. Резултатите са представени като средни стойности от 4 до 6 повторения от 3 независими експеримента „ин витро“ \pm SEM. * – достоверна разлика от третиране с гонадотропин спрямо култури, инкубирани само в хранителна среда; ** – достоверна разлика от третиране с гонадотропин в комбинация с тестостерон 1×10^{-8} M спрямо култури инкубирани само в присъствие на рекомбинантен гонадотропин. Ниво на достоверност $p < 0,05$.

Figure 1. Effect of Puregon and Gonal-F (0,75 IU/ml) on estradiol-17 beta production from isolated human granulosa cell cultures. Results are presented as means from 4 to 6 repetitions from 3 independent in-vitro experiments \pm SEM. * – significant effect from gonadotropin treatment vs. cultures incubated with medium; ** – significant effect from gonadotropin treatment in presence of 1×10^{-8} M testosterone vs. cultures treated only with gonadotropin. Level of significance $p < 0,05$.



геновата синтеза в сравнение с клетки инкубирани само в хранителна среда. При сравняване ефекта на двата гонадотропина след субтракция на съответната контрола се наблюдава достоверно по-високо ($p < 0,05$) базално ниво на естрадиол в супернатантите от културите инкубирани за 24 часа с Gonal-F ($9,8 \pm 1,9$ пг/мл) в сравнение с клетките култивирани само в хранителна среда ($3,5 \pm 1,2$ пг/мл). Средната стойност на естрадиол в произволно избраните култури инкубирани при същите условия с Puregon е $4,0 \pm 1,2$ пг/мл и достоверно не се различава от измерената в контролните ямки.

В присъствие на тестостерон и двата гонадотропни препарата предизвикват достоверна стимулация на естрадиоловата секреция от грану-

лозните клетки спрямо контролните култури ($8,5 \pm 3,1$ пг/мл; $p < 0,05$ за Puregon и $18,9 \pm 7,2$ пг/мл; $p < 0,01$ за Gonal-F). Въпреки по-високото ниво на секреция на естрадиол-17 бета в присъствие на Gonal-F в културите стимулацията при комбинирано приложение на гонадотропините с андрогенен прекурсор не показва значително различие по отношение на процентното повишение спрямо базалните стойности измерени в контролите (221 % за Puregon и 192 % за Gonal-F).

Резултатите от нашите изследвания показват че двата използвани рекомбинантни гонадотропни препарата Gonal-F и Puregon не са различават съществено по своя специфичен биологичен ефект в чиста култура от овариални гранулозни клетки, с изключение на намерена-

та разлика по отношение на базалната секреция на естрадиол-17 бета в полза на Gonal-F.

Наблюдаваният почти еднакъв секреторен отговор при стимулация на клетките с комбинация на съответния гонадотропин и тестостерон потвърждава изследванията и на други автори за близката имунологична, биологична и физикохимична активност на двата препарата (8, 9), което предполага тяхното сходство както по отношение на биологичното им действие, така и по отношение на клиничния им ефект.

Нашите изследвания върху изолирани култури от гранулозни клетки показват, че рекомбинантните гонадотропини не отстъпват по биологично действие и функционална активност на широко използваните в миналото уринарни препарати (Metrodin, Serono) или такива със смесена ЛХ/ФСХ активност/ Humegon, Organon/ (6, 7). Използваната от нас моделна система се доказва като значително по-подходяща от „ин виво“ биологичните анализи с оглед изпитване на функционалната активност на препаратите, тъй като се отчита само прекия ефект от действието на съответния хормон, който не зависи от времето на полуживот в периферното кръвообращение (10, 11).

Експресията и производството на гама от търговски човешки препарати на ФСХ получени чрез рекомбинантни ДНК технологии представлява огромен напредък в молекулярната медицина с определен принос за развитието на асистираната репродукция, тъй като ФСХ е един от най-сложните белтъчни комплекси получавани досега по този начин. Предимствата на тези продукти се дължат на контролираната степен на силиране на изоформите, която определя биологичните им свойства ин-виво.

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Daya S., J. Gunby - Recombinant versus urinary FSH for ovarian stimulation in assisted reproduction cycles. *The Cochrane Library* 1, 2002, 7-15.
2. Guet P., D. Royere, A. Paris, J. Lansac, M. Driancourt, - Aromatase activity of human granulose cells in vitro. *Human Reprod.* 14, 1999, 1182-1189.
3. Karnitis, V.J., D.H. Towson, C. I. Friedman, D. R. Danforth, - Recombinant human follicle-stimulating hormone stimu-

lates multiple follicular growth, but minimal estrogen production in gonadotropin-releasing hormone antagonist-treated monkeys: examining the role of luteinizing hormone in follicular development and steroidogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79, 1994, 91-97.

4. Hillier, S.G., P. F. Whitelaw, C. D. Smyth, - Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotropin' model revisited. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1994, 100, 51-54.

5. Guerin P., J. Guillaud, Y. Menezo, - *Human Reprod.* 10, 1995, 866-872.

6. Todorov P., G. Stamenov, I. Todorov, V. Novachkov, Y. Dimitrov, R. Konakchieva, - Evaluation of the secretory capacity of ovarian tissue after treatment with different cryoprotectants by in vitro culture system. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences* 55, 2002, 3, 103-108.

7. Todorov P., R. Konakchieva, G. Stamenov, I. Todorov, V. Novachkov, Y. Dimitrov - In-vitro stimulation of the secretion of 17beta-estradiol and progesterone in a primary ovarian cell culture. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences* 55, 2002, 6, 111-115.

8. Horsman G., J. Talbot, J. McLoughlin, A. Lambert, W. Robertson, - A biological, immunological and physico-chemical comparison of the current clinical batches of the recombinant FSH preparations Gonal-F and Puregon. *Human Reproduction* 15, 2000, 1898-1902.

9. Zelinski-Wooten M., Hutchison J., Hess D., Wolf D., Stouffer R. A bolus of recombinant FSH at midcycle induces periovulatory events following multiple follicular development in macaques. *Human Reproduction* 13, 1998, 3, 554-560.

10. Harris S., A. Lambert, W. Robertson, - In-vitro biopotency of two glycoprotein mixtures of differing acidity derived from recombinant FSH measured using a human granulosa-lutein cell bioassay. *Human Reproduction* 13, 1998, 0-202.

11. Vit U., H. Kloosterhoer, U. Rose, et al. - Isoforms of recombinant FSH: Comparison of effects on murine follicular development in-vitro. *Biology of Reproduction* 59, 1998, 854-861.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Д-р Пламен Тодоров, доктор
Институт по Биология и Имунология на
Размножаването, БАН
Цариградско шосе 73, 1113 София

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Dr Plamen Todorov, MD
Institute of Biology and Immunology of Reproduction – Bulgarian Academy of Sciences
73 Tzarigradsko shose Ave, 1113 Sofia

Показатели на инсулинова чувствителност при пациенти с тип 2 захарен диабет

П. Каменова

Клиничен център по ендокринология, Медицински университет – София

Determinants of insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus

P. Kamenova

Clinical Center of Endocrinology, Medical University – Sofia

Резюме

Значимостта на инсулиновата резистентност като рисков фактор за тип 2 захарен диабет и сърдечно-съдова болест изтъква необходимостта от количествено определяне на инсулиновата чувствителност. Хиперинсулинемичната еугликемична кламп техника представлява златният стандарт за измерване на инсулиновата чувствителност, но нейното приложение е ограничено от комплексността на методологията и високата степен на технически умения, които се изискват за получаване на възпроизводими резултати. Цел на настоящето проучване беше да се установят показатели на инсулинова чувствителност при пациенти с тип 2 захарен диабет, които са лесно приложими в клиничната практика. 63 пациента-29 мъже на средна възраст – $51,3 \pm 8,5$ год., HbA_{1c} - $6,27 \pm 0,55$ %, BMI – $28,86 \pm 4,94$ kg/m^2 , обиколка на талия (OT) – $101,5 \pm 13,6$ cm, систолично артериално налягане (САН)- 141 ± 28 mmHg, диастолично артериално

Abstract

The importance of insulin resistance as a risk factor for type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease has pointed out the necessity of quantification of insulin sensitivity. The hyperinsulinaemic euglycaemic clamp technique represents the gold standard for measurement of the insulin sensitivity however its application is limited by the complexity of the methodology and the high degree of technical expertise required to provide reproducible results. The aim of the present study was to establish easily applicable in clinical practice determinants of insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. 63 patients – 29 men of mean age – $51,3 \pm 8,5$ yrs, HbA_{1c} – $6,27 \pm 0,55$ %, BMI – $28,86 \pm 4,94$ kg/m^2 , waist circumference (WS) – $101,5 \pm 13,6$ cm, systolic blood pressure (SBP) – 141 ± 28 mmHg, diastolic blood pressure (DBP) – 92 ± 16 mmHg and 34 women of mean age – $52,6 \pm 9,0$ yrs, HbA_{1c} – $6,43 \pm 0,60$ %, BMI – $33,81 \pm 6,53$ kg/m^2 , WS- $102,1 \pm 15,8$ cm, SBP –

налягане (ДАН) – 92 ± 16 mmHg и 34 жени на средна възраст – $52,6 \pm 9,0$ год., HbA_{1c} – $6,43 \pm 0,60\%$, BMI – $33,81 \pm 6,53$ kg/m², ОТ – $102,1 \pm 15,8$ cm, САН – 153 ± 25 mmHg, ДАН 99 ± 15 mmHg бяха включени в проучването. Stepwise множествен линеарен регресионен анализ беше извършен за изтъкване на детерминанти на инсулинова чувствителност (ИЧ) сред показатели, които сигнификантно корелираха с ИЧ измерена с хиперинсулинемична еугликемична кламп техника, изразена като количество метаболизирана глюкоза (M). Бяха определени и хомеостазният модел на инсулинова резистентност (НОМА IR) и инсулин резистентният индекс на гладно (FIRI).

ИЧ на мъжете диабетици – $M-4,761 \pm 3,428$ mg/kg/min беше сигнификантно по-висока, сравнена с тази на жените диабетици – $M-3,228 \pm 1,749$ mg/kg/min ($p < 0,05$). При мъжкия пол ИЧ, измерена с кламп техника сигнификантно негативно корелираше с ОТ, BMI, отношение талия/ханш (Т/Х), инсулин на гладно, кръвна захар на гладно, САН, ДАН, НОМА и FIRI. При женския пол ИЧ сигнификантно негативно корелираше с ОТ, BMI, Т/Х, САН, ДАН, триглицериди, отношение триглицериди/HDL холестерол, пикочна киселина, инсулин на гладно, НОМА и FIRI. При мъжете диабетици независими показатели на ИЧ бяха обиколката на талията и диастоличното артериално налягане, определящи 60,4 % от вариацията ѝ. Чрез тези рутинни и достъпни показатели беше определено средно M ниво – $4,761$ mg/kg/min със стандартно отклонение – $2,758$ чрез алгоритъм:

$28,349 - [0,168 \times \text{обиколка талия (cm)}] - [0,07136 \times \text{диастолично артериално налягане (mm Hg)}]$. При жените диабетици, обиколката на талията беше независим предиктор на ИЧ, определяща 50,5 % от вариацията ѝ. Чрез обиколката на талията беше определено средно M ниво – $3,281$ mg/kg/min със стандартно отклонение – $1,301$ чрез алгоритъм:

$11,695 - [0,08242 \times \text{обиколка талия (cm)}]$. Най-високият процент от вариацията на инсулиновата чувствителност беше определена от триглицеридите, индексът на телесна маса и инсулин резистентният индекс на гладно. Тези фактори определиха средно M ниво – $3,263$

153 ± 25 mmHg, DBP – 99 ± 15 mmHg were included in the study. Stepwise multiple linear regression analysis was done to elucidate determinants of insulin sensitivity (IS) among variables significantly correlated with IS measured with a manual hyperinsulinaemic euglycaemic clamp technique, expressed as an amount of glucose metabolized (M). Homeostasis model assessment of insulin resistance (НОМА IR) and fasting insulin resistance index (FIRI) were defined as well.

IS of the diabetic men – $M-4,761 \pm 3,428$ mg/kg/min was significantly higher compared to that of the diabetic women – $M-3,228 \pm 1,749$ mg/kg/min ($p < 0,05$). In male sex IS measured with the clamp technique was significantly negatively correlated with WS, BMI, waist-hip ratio (WHR), fasting insulin, fasting blood glucose, SBP, DBP, НОМА and FIRI. In female sex IS was significantly negatively correlated with WS, BMI, WHR, SBP, DBP, triglycerides, triglycerides/HDL cholesterol ratio, uric acid, fasting insulin, НОМА and FIRI. In diabetic men independent determinants of IS were waist circumference and diastolic blood pressure explaining 60,4 % of it's variance. By these routine and accessible variables mean M value – $4,761$ mg/kg/min with standard deviation – $2,758$ was determined via the algorithm:
 $28,349 - [0,168 \times \text{waist circumference (cm)}] - [0,07136 \times \text{diastolic blood pressure (mm Hg)}]$.

In diabetic women waist circumference was an independent predictor of IS explaining 50,5 % of it's variance. By waist circumference mean M value – $3,281$ mg/kg/min with standard deviation – $1,301$ was determined via the algorithm:
 $11,695 - [0,08242 \times \text{waist circumference (cm)}]$. The highest percent of variance of IS was defined by triglycerides, body mass index and fasting insulin resistance index. These factors determined mean M value – $3,263$ mg/kg/min with standard deviation – $1,447$ via algorithm:
 $9,583 - [0,529 \times \text{triglycerides (mmol/l)}] - [0,132 \times \text{BMI (kg/m}^2\text{)}] - 0,146 \times \text{FIRI}$

In conclusion, our results indicated determinants of insulin sensitivity which are easily applicable and could be useful in routine clinical practice allowing physicians to identify and treat patients with insulin resistance earlier for prevention of cardiovascular risk.

mg/kg/min със стандартно отклонение – 1,447
чрез алгоритъм:

9,583 – [0,529 x триглицериди (mmol/l)] - [0,132
x BMI (kg/m²)] – 0,146 x FIRI

В заключение, нашите резултати определяха показатели на инсулинова чувствителност, които са лесно приложими и биха били от полза в рутинната клинична практика, давайки възможност на лекарите да идентифицират и своевременно лекуват пациентите с инсулинова резистентност за превенция на сърдечно-съдовия риск.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: тип 2 захарен диабет, сърдечно-съдов риск, показатели на инсулинова чувствителност, HOMA-IR, FIRI

Намалената инсулинова чувствителност (инсулинова резистентност) е един от най-ранните маркери не само за развитието на тип 2 захарен диабет, но и за повишен сърдечно-съдов риск (10,13,17). Тя съществува в предиабетното състояние, в стадия на нарушен глюкозен толеранс и в 80-90% от лицата със захарен диабет тип 2. Инсулиновата резистентност предшества клиничната изява на захарния диабет с 10-20 години и не е учудващ фактът, че при поставяне на диагнозата около 50% от пациентите са с различни прояви на сърдечно-съдова болест (10,18,21). Хиперинсулинемичната еугликемична кламп техника е най-прецизният директен метод за количествено определяне на инсулиновата чувствителност, но е трудно приложима. Хомеостазният модел на инсулинова резистентност (HOMA-IR) и емпиричният-инсулин резистентен индекс на гладно (FIRI) би следвало да се прилагат в епидемиологични проучвания и в предиабетното състояние, тъй като отразяват метаболитни процеси, а не директно инсулиновата резистентност (14,24). Според наши данни тези заместители на кламп техниката не отразяват реално инсулиновата чувствителност при хиперинсулинемия, затлъстяване и централно разпределение на мастната тъкан (1). За клиничната практика, където директното определяне на инсулиновата чувствителност е трудно приложимо, е особено важно установяване

KEY WORDS: type 2 diabetes mellitus, cardiovascular risk, determinants of insulin sensitivity, HOMA-IR, FIRI

на нейни независими показатели, определящи най-голям процент от вариацията ѝ. Данните в областта на захарния диабет са незаключителни. Установените предиктори отразяват около половината от вариацията на инсулиновото действие, което показва, че генетичните фактори играят роля. Това се потвърждава и от факта, че при отделните националности се определят различни показатели. Сред тях изпъкват висцералното затлъстяване, гликемичният контрол, триглицеридите и артериалното налягане (2,3,5).

Цел на настоящето проучване бе да се установят показатели на инсулинова чувствителност при пациенти с тип 2 захарен диабет, които са лесно приложими в клиничната практика.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

63 пациента с тип 2 захарен диабет, равномерно разпределени по пол (34 жени, 29 мъже), на средна възраст – 52,0 ± 8,7 год., с добър гликемичен контрол – HbA_{1c} – 6,38 ± 0,58% бяха включени в проучването. Мъжете диабетичи бяха със следните показатели-индекс на телесна маса (BMI) – 28,86 ± 4,94 kg/m², обиколка на талия (OT) – 101,5 ± 13,6 cm, отношение талия/ханш (Т/Х) – 0,94 ± 0,07, систолично артериално налягане (САН) – 141 ± 28 mmHg, диастолично артериално налягане (ДАН) – 92 ± 16 mmHg, кръвна захар на гладно – 6,86 ± 1,30 mmol/l, серумен инсулин на гладно (IRI) – 13,62 ± 9,13 mIU/l.

Жените диабетици бяха съответно с BMI – $33,81 \pm 6,53 \text{ kg/m}^2$, ОТ – $102,1 \pm 15,8 \text{ cm}$, ТХ – $0,87 \pm 0,07$, САН – $153 \pm 25 \text{ mmHg}$, ДАН – $99 \pm 15 \text{ mmHg}$, кръвна захар на гладно – $6,88 \pm 0,98 \text{ mmol/l}$, IRI – $16,04 \pm 10,37 \text{ mIU/l}$.

Обиколката на талията бе измерена по средата между илиачната кост и долната ребрена дъга при вдишване и издишване като бе приета средната стойност, а обиколката на ханша-на нивото на големия трохантер. HbA_{1c} бе определен чрез имунотурбидиметричен метод (Roche Diagnostics, Germany), кръвната захар чрез глюкозооксидазен метод (Beckman глюкозен анализатор) (Клинична лаборатория-СБАЛЕНГ), а IRI-ензимно-имунен метод (MEIA, Abbott, IMX, Germany) (Радиоимунологична лаборатория-СБАЛЕНГ). Периферната инсулинова чувствителност бе определена с мануална хиперинсулинемична еугликемична кламп техника и изразена като количество метаболизирана глюкоза (M) и с най-често прилаганите индекси НОМА-IR и FIRI (1,6,19). В хода на кламп тестовете бе поддържана постоянна хиперинсулинемия и еугликемия в продължение на 2 часа, при които се приема, че количеството инфузирана глюкоза отразява количеството метаболизирана глюкоза от периферните тъкани, главно мускули и е мярка за периферната чувствителност към инсулин (1).

За изтъкване независими детерминанти на инсулинова чувствителност бе осъществен корелационен анализ (Pearson), включващ антропометрични, клинични и метаболитни показатели (сърдечно-съдови рискови маркери) и тези, показващи значима корелационна зависимост с инсулиновата чувствителност, определена с кламп техника ($p < 0,05$, t критерий на Student) бяха включени в stepwise множествен линейарен регресионен анализ, приложен при всички болни и двата пола поотделно по два метода-forward (F критерий на включване – $\leq 0,05$) и backward (F критерий на елиминиране – $\geq 0,1$).

РЕЗУЛТАТИ

Инсулиновата чувствителност на мъжете диабетици, изразена като количество метаболизирана глюкоза (M) – $4,761 \pm 3,248 \text{ mg/kg/min}$ бе сигнификантно по-висока от тази на жените ди-

абетици – $M-3,228 \pm 1,749 \text{ mg/kg/min}$ ($p < 0,05$). Липсваше значима разлика в индексите на инсулинова чувствителност – НОМА – $4,71 \pm 3,85$, FIRI – $4,23 \pm 3,45$ (мъже) и съответно – $5,58 \pm 3,28$ и $5,04 \pm 2,97$ (жени). На таблица 1 са представени сигнификантните корелационни зависимости между инсулиновата чувствителност (M) и потенциалните показатели на инсулинова чувствителност при двата пола.

При мъжете диабетици предиктивната сила на обиколката на талията и диастоличното артериално налягане бе най-голяма – 60,4% от вариацията на инсулиновата чувствителност при forward stepwise множествен линейарен регресионен анализ, който излъчи специфичния алгоритъм за определянето ѝ (Табл.2). Тези лесно измерими и напълно достъпни в клиничната практика показатели определиха средно ниво на инсулинова чувствителност (M) – $4,761 \text{ mg/kg/min}$ със стандартно отклонение – 2,758.

Обиколката на талията е независим показател на инсулинова чувствителност при женския пол, определяща самостоятелно 50,5% от вариацията ѝ (Табл.3). Чрез обиколката на талията се определи средно ниво на инсулинова чувствителност (M) – $3,281 \text{ mg/kg/min}$ със стандартно отклонение – 1,301. Най-голям процент от вариацията на инсулиновото действие – 60,9% определиха показателите индекс на телесна маса, триглицериди и FIRI (Табл. 4). Чрез тях установихме средно ниво на M – $3,263 \text{ mg/kg/min}$ със стандартно отклонение – 1,447.

ОБСЪЖДАНЕ

Множественият линейарен регресионен анализ излъчи следните алгоритми за определяне на инсулиновата чувствителност на базата на установените показатели -обиколката на талията и диастоличното артериално налягане при мъжкия пол, обиколката на талията самостоятелно и факторите-триглицериди, индекс на телесна маса и FIRI при женския:

$28,349 - [0,168 \times \text{обиколка на талия (cm)}] - [0,07136 \times \text{диастолично артериално налягане (mmHg)}] 11,695 - [0,08242 \times \text{обиколка на талия (cm)}] 9,583 - [0,529 \times \text{триглицериди (mmol/l)}] - [0,132 \times \text{индекс на телесна маса (kg/m}^2\text{)}] - [0,146 \times \text{инсулин резистентен индекс на гладно (FIRI)}]$

Таблица 1. Сигнификантна корелационна зависимост (Pearson's корелационен коефициент r) между инсулиновата чувствителност (M) и потенциални показатели на инсулинова чувствителност при двата пола

Table 1. Significant correlation relationship (Pearson's correlation coefficient r) between insulin sensitivity (M) and potential determinants of insulin sensitivity in both sexes

Показатели/Determinants	Мъже/Men		Жени/Women	
	r	p	r	p
НОМА	-0,560	0,002	-0,400	0,019
FIR	-0,561	0,002	-0,399	0,019
Обиколка на талия/ Waist circumference	-0,700	0,000	-0,702	0,000
Индекс на телесна маса/ Body mass index	-0,681	0,000	-0,658	0,000
Отношение талия/ханш/ Waist-hip ratio	-0,472	0,010	-0,399	0,019
Систолично артериално налягане/ Systolic blood pressure	-0,381	0,041	-0,517	0,001
Диастолично артериално налягане/ Diastolic blood pressure	-0,410	0,027	-0,513	0,002
Инсулин на гладно/Fasting insulin	-0,598	0,001	-0,340	0,049
Кръвна захар на гладно/ Fasting blood glucose	-0,381	0,041		ns
Триглицериди/ Triglycerides		ns	-0,517	0,002
Триглицериди/HDLхолестерол/ Triglycerides/HDL cholesterol		ns	-0,386	0,027
Пикочна киселина/ Uric acid		ns	-0,376	0,045

ns – несигнификантна корелация ns-nonsignificant correlation

Таблица 2. Stepwise forward множествен линеарен регресионен анализ на зависимостта на инсулиновата чувствителност (M) от обиколката на талията и диастоличното артериално налягане при мъжете диабетици

Table 2. Stepwise forward multiple linear regression analysis of dependence of insulin sensitivity (M) on waist circumference and diastolic blood pressure in diabetic men

Модел/Model	Коефициенти /Coefficients		Beta	t	Sig
	Unstandardized coefficients	Standardized coefficients			
(Constant)	28,349	3,793		7,474	0,000
Обиколка талия/ Waist circumference	-0,168	-0,031	-0,664	-5,356	0,000
Диастолично артериално налягане/ Diastolic blood pressure	-7,136E-02	0,026	-0,341	-2,750	0,011
R ² for total model (%) 60,4					

Таблица 3. Stepwise backward множествен линейен регресионен анализ на зависимостта на инсулиновата чувствителност M от триглицериди, индекса на телесна маса и FIRI при жените диабетици

Table 3. Stepwise forward multiple linear regression analysis of dependence of insulin sensitivity (M) on waist circumference in diabetic women

Модел/Model	Коефициенти/ Coefficients		Beta	t	Sig
	Unstandardized coefficients	Standardized coefficients			
(Constant)	9,583	1,170		8,194	0,000
Триглицериди/ Triglycerides	-0,529	0,230	-0,314	-2,299	0,031
Индекс на телесна маса/ BMI	-0,132	0,038	-0,495	-3,466	0,002
FIRI	-0,146	0,080	-0,245	-1,821	0,081
R ² for total model (%) 60,9					

Таблица 4. Stepwise forward множествен линейен регресионен анализ на зависимостта на инсулиновата чувствителност (M) от обиколката на талията при жените диабетици

Table 4. Stepwise backward multiple linear regression analysis of dependence of insulin sensitivity M on triglycerides, body mass index and FIRI in diabetic women

Модел/Model	Коефициенти/ Coefficients		Beta	t	Sig
	Unstandardized coefficients	Standardized coefficients			
(Constant)	11,695	1,648		7,096	0,000
Обиколка талия/ Waist circumference	-8,242E-02	0,016	-0,710	-5,146	0,000
R ² for total model (%) 50,5					

Инсулиновата чувствителност (M), определена с кламп техника на лица с нормален глюкозен толеранс, напълно съпоставими по възраст и всички антропометрични, клинични и метаболитни показатели с изследваните от нас пациенти със захарен диабет-тип 2 бе $6,296 \pm 3,176$ mg/kg/min (средна cSD)(1). Това средно ниво на инсулинова чувствителност би могло да се има пред вид при определяне наличието на инсулинова резистентност при пациентите с тип 2 захарен диабет.

Данните за независима асоциация на инсулиновата чувствителност със сърдечно-съдови рискови маркери при пациенти с тип 2 захарен

диабет са противоречиви. Изтъкнатите показатели определят около половината от вариацията на инсулиновото действие, изразено като количество метаболизирана глюкоза определено с кламп техника – 53 % при 45 пациента (3), 44 % при 46 пациента (2). Това означава, че ролята на генетичните фактори е равностойна с тази на факторите на околната среда и различните показатели, които се установяват зависят и от начина на живот. Reaven, 1999 изтъква, че около 50 % от вариацията на инсулиновото действие може да се дължи на разлики в телесното тегло и факторите на живота, а останалите 50 % на генетични разлики (23). Най-широко

машабното мултицентрово проучване, изследващо инсулиновата резистентност-European Group for the study of Insulin Resistance, което включва най-големият брой кламп тестове-1500 от 21 центъра в Европа дава убедителни клинични доказателства, че около 50 % от вариацията на инсулиновата чувствителност се дължи на компонентите на синдрома (9). Ето защо показателите на инсулинова чувствителност, които се установяват са различни, зависещи от етническата принадлежност, географския район и условията на живот и са актуални за конкретната националност. Факторите, които ние установихме като независими показатели на инсулинова чувствителност определят около 60 % от вариацията ѝ, което показва, че около 40 % е дялът на генетичното унаследяване. Интересно обстоятелство е, че широко използваният индекс на инсулинова резистентност НОМА в предишно наше проучване определя по-малък процент от вариацията на инсулиновата чувствителност от посочените фактори- 46,2 % при мъжкия пол и 31,2 % при женския (1). Вопога, 2002 изтъква като определящи фактори на инсулинова чувствителност – НbA_{1c}, триглицеридите и систоличното артериално налягане (3). Триглицеридите и систоличното артериално налягане са значими показатели на инсулинова чувствителност (8,22). Забележителен факт е, че факторите, които ние установихме са и независими показатели за сърдечно-съдов риск. Триглицеридите, кръвната захар и артериалното налягане са сигнификантни предиктори за миокарден инфаркт и смърт (12).

Проучване в Холандия определя три независими детерминанти- % мастна тъкан, отношение талия/ханш (без да се изследва обиколката на талията) и енергийният разход в покой (2). Японска студия, изследваща пациенти с тип 2 захарен диабет с подобен в нашето проучване брой (62) и индекс на телесна маса (30 kg/m²) доказва чрез кламп техника и ядрено магнитен резонанс, че висцералното затлъстяване и при двата пола асоциира с периферната и черnodробна инсулинова резистентност като при мъжкия пол се установява и асоциация на подкожната мастна тъкан с инсулиновата чувствителност (20). Обиколката на талията е независим

детерминант при женския пол като определя 79 % от вариацията ѝ (5).

Напоследък се утвърждава становището, че централното интраабдоминално, а не подкожно и цялостно затлъстяване е предиктор на инсулинова резистентност. При 174 индивида (73 мъже и 101 жени) с широка възрастова граница (30-75 год.) не се установява линейна зависимост между инсулиновата чувствителност и индекса на телесна маса, но интраабдоминалната мастна тъкан, определена компютъртомографски определя 47 % от тоталната вариация на инсулиновата чувствителност. Значимостта на интраабдоминалната мастна тъкан за определяне на инсулиновата чувствителност се подчертава и от факта, че тя е най-важният детерминант при множествен линейрен регресионен анализ, който включва подкожната мастна тъкан, отношението талия/ханш и индекса на телесна маса (16).

Нашите резултати и без използването на трудно достъпен в рутинната практика метод като КАТ, утвърждават ролята на висцералното затлъстяване като строг детерминант на инсулинова резистентност и изтъкват ролята на обиколката на талията, а не на отношението талия/ханш като независим показател на инсулинова чувствителност, особено при женския пол. Обиколката на талията е независим предиктор и за тип 2 захарен диабет (11,25). В 7 годишно проспективно проучване при 721 мексикански американци обиколката на талията е единственият независим предиктор за развитие на тип 2 захарен диабет. Интересен факт е, че зависимостта между обиколката на талията и захарният диабет е по-значима при индивиди с индекс на телесна маса $\leq 27 \text{ kg/m}^2$, отколкото при тези с ИТМ $\geq 27 \text{ kg/m}^2$. Индексът на телесна маса и отношението талия/ханш са независими предиктори за развитие на тип 2 захарен диабет в мултивариантен анализ, но след нагласяване към обиколката на талията, тяхната предиктивна сила изчезва (25).

Тези данни и нашите резултати показват, че не цялостното затлъстяване, а разпределението на мастната тъкан има значение както за развитието на тип 2 захарен диабет, така и като детерминант на инсулинова резистентност и из-

тъкват взаимната зависимост между висцералното затлъстяване, инсулиновата резистентност и риска от развитие на тип 2 захарен диабет.

Значимостта на инсулиновата резистентност не само като фундаментален патогенетичен дефект за развитието на тип 2 захарен диабет, предшестващ дълги години поставянето на диагнозата, но и като съществен рисков фактор за сърдечно-съдова болест налага необходимостта от разработването на достъпни и лесно приложими в рутинната клинична практика методи за определянето ѝ. Тези методи ще дадат възможност за ранно откриване и лечение както на инсулин резистентните индивиди с тип 2 захарен диабет, така и на тези с нормален глюкозен толеранс за намаление риска от сърдечно-съдова болест. (4,7). Неслучайно една от целите на многоцентровото проспективно проучване-RISC (Relationship between Insulin Sensitivity and Cardiovascular disease risk) е създаване на нов метод за идентифициране на инсулин резистентните индивиди в клиничната практика (15).

Данните от нашето проучване определиха различни показатели на инсулинова чувствителност при двата пола. Обиколката на талията и диастоличното артериално налягане са независими показатели при мъжкия пол. Обиколката на талията е самостоятелен предиктор и при женския пол. Най-голям процент от вариацията на инсулиновото действие при жените диабетички се определи от факторите триглицериди, индекс на телесна маса, кръвна захар и инсулин на гладно чрез тяхната общност инсулин резистентен индекс на гладно. Определянето на тези показатели е напълно достъпно. Имайки предвид трудната приложимост на златния стандарт-хиперинсулинемичната еугликемична кламп техника и недостатъчно информативната стойност на НОМА индекса, посочените алгоритми за определяне на инсулиновата чувствителност биха могли да бъдат от полза в рутинната клинична практика, давайки възможност на лекарите да идентифицират и своевременно лекуват инсулин резистентните пациенти за превенция на сърдечно-съдовия риск.

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Каменова П., Д. Коев, Г. Кирилов, Л. Даковска. Клинична приложимост на индексите на инсулинова чувствителност като заместители на хиперинсулинемичната еугликемична кламп техника. *Ендокринология*, 9, 2004, 2, 81-88.
2. Blonk M.C., M. A. J. M. Jacobs, C. E. Friedberg et al. Determinants of insulin sensitivity and consequences for lipoproteins and blood pressure in subjects with non-insulin-dependent diabetes. *Metabolism*, 43, 1994, 4, 501-508.
3. Bonora E., G. Targher, M. Alberiche et al. Predictors of insulin sensitivity in type 2 diabetes. *Diabet Med*, 19, 2002, 7, S 35-S 42.
4. Byrne, C. D. Should we routinely measure a proxy for insulin resistance as well as improving modeling techniques to better predict the likelihood of coronary heart disease in people with type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 6, 2004, 308-309.
5. Carey, D. G., A. B. Jenkins, L. V. Campbell et al. Abdominal fat and insulin resistance in normal and overweight women. *Diabetes*, 45, 1996, 633-638.
6. Duncan, M. H., B. M. Singh, P. H. Wise et al. A simple measure of insulin resistance. *Lancet*, 346, 1995, 120-121.
7. Evans, M., P. McEwan, J. R. Peters and C. J. Currie. Should we routinely measure a proxy for insulin resistance as well as improve our modeling techniques to better predict the likelihood of coronary heart disease in people with type 2 diabetes? For debate. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 6, 2004, 299-307.
8. Ferrannini, E., A. Natali, P. Bell et al. Insulin resistance and hypersecretion in obesity. European Group for the study of Insulin Resistance (EGIR). *J Clin Invest*, 100, 1997, 1166-1173.
9. Ferrannini, E., S. Vichi, H. Beck-Nielsen et al. European Group for the study of Insulin Resistance (EGIR): Insulin action and age. *Diabetes*, 45, 1996, 947-953.
10. Groop L. Pathogenesis of type 2 diabetes: the reactive contribution of insulin resistance and impaired insulin secretion. *Int J Clin Practice*, 113, 2000, 3-13.
11. Haffner, S. M. Obesity and the metabolic syndrome: The San Antonio Heart Study. *Br J Nutr* 83, 2000, 1, S 67- S 70.
12. Hanefeld M., S. Fischer, U. Julius et al. Risk factors for myocardial infarction and death in newly detected NIDDM: the Diabetes Intervention Study, 11-year follow-up. *Diabetologia*, 39, 1996, 1577-1583.
13. Hanley, A. J. G., M. P. Stern, K. Williams and S. M. Haffner. Homeostasis model assessment of insulin resistance in relation to the incidence of cardiovascular disease. The San Antonio Heart Study. *Diabetes care*, 25, 2002, 1177-1184. *J Clin Invest*, 106, 2000, 4, 473-481.

-
14. Hanson, R. L., R. E. Pratley, C. Bogardus et al. Evaluation of simple indices of insulin sensitivity and insulin secretion for use in epidemiological studies. *Am J Epidemiol*, 151, 2000, 190-198.
15. Hills, S. A., B. Balkau, S. W. Coppack et al. The EGIR-RISC study (The European Group for the Study of Insulin Resistance: relationship between insulin sensitivity and cardiovascular disease risk): Methodology and Objectives. *Diabetologia*, 47, 2004, 3, 566-570.
16. Kahn, B. B. and J. S. Flier. Obesity and insulin resistance. *Diabetologia*, 47, 2004, 3, 566-570.
17. Kendall, D. M. and R. M. Bergenstal. Comprehensive management of patients with type 2 diabetes: establishing priority of care. *Am J Manag Care*, 2001, 7, 10, S 327- S 343, quiz S 344- S 348.
18. Laakso M. Insulin resistance and its impact on the approach to therapy of type 2 diabetes. *Int J Clin Practice*, 2001, 121, 8-12.
19. Matthews, D. R., J. P. Hosker, A. S. Rudenski et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28, 1985, 412-419.
20. Miyazaki, Y., L. Glass, C. Triplitt et al. Abdominal fat distribution and peripheral and hepatic insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol- Endocrinol & Metab*, 283, 2002, 6, E 1135-E 1143.
21. Petersen K. F and G. I. Shulman. Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol*, 90, 2002, 5A, 11G- 18G.
22. Pollare, T., H. Lithell and C. Berne. Insulin resistance is a characteristic feature of primary hypertension independent of obesity. *Metab*, 39, 1990, 167-174.
23. Reaven, G. Syndrome X 10 years after. *Drugs*, 58, 1999, 1, 19-20.
24. Wallace, T. M., D. R. Matthews. The assessment of insulin resistance in man. *Diabet Med*, 19, 2002, 7, 527-534.
25. Wei, M., S. P. Gaskill, S. M. Haffner and M. P. Stern. Waist circumference as the best predictor of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) compared to body mass index, waist/hip ratio and other anthropometric measurements in Mexican Americans. A 7-year predictive study. *Obesity research*, 1999, 5, 16-23.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Д-р Петя Каменова, ДМ
Клиничен Център по ендокринология
ул. Дамян Груев 6, София 1303
E-mail: kamenovap@abv.bg

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Dr Petya Kamenova, MD, PhD
Clinical Center of Endocrinology
6, D. Gruev Blvd., 1303, Sofia, Bulgaria
E-mail: kamenovap@abv.bg

Ретроперитонеалната ендоскопска адреналектомия - новият стандарт за хирургично лечение на бенигнените адrenalни лезии

Георги Тодоров, Цонка Луканова

Клиника по хирургически болести – II-ра Хирургия, УМБАЛ „Александровска“, София

Retroperitoneal endoscopic adrenalectomy - the new standard for treatment of benign adrenal lesions

Georgi Todorov, Tsonka Lukanova

Second Surgical Department, „Aleksandrovska“ University Hospital, Sofia

Резюме

Миниинвазивната адреналектомия се счита за стандартен метод за хирургично лечение на патологията на надбъбречната жлеза. С въвеждането на лапароскопската адреналектомия през 1992 и ретроперитонеалната ендоскопска – през 1994, тя постепенно се превърна в метод на избор при бенигнените тумори на надбъбречната жлеза.

Представени са клиничните характеристики и обработени резултати при 63 ретроперитонеални ендоскопски адреналектомии (PEA), проведени в периода 1996-2004 г.

При 61 пациенти бяха осъществени 63 ретроперитонеални ендоскопски адреналектомии. Показанията включваха: Cushing синдром (n = 18), Cushing-аденом (n = 21), Conn-аденом (n = 10), феохромоцитом (n = 5), инциденталом (n = 5) и адренокортикален карцином (n = 2). Размерът на туморната формация варираше от 2 до 8 cm. Средната възраст на пациентите – 48,6 години. Средното оперативно време беше 135 min (45-240), а средната интра-

Abstract

Miniinvasive adrenalectomy is considered to be the standard of care for the surgical treatment of the adrenal gland's pathology. Since the initial report of laparoscopic adrenalectomy in 1992 and of retroperitoneal endoscopic adrenalectomy in 1994, it has evolved into a feasible and safe minimally invasive procedure for benign adrenal tumors.

Clinical characteristics and outcomes of 63 retroperitoneal endoscopic adrenalectomies (REAs) from 1996 to 2004 were evaluated.

61 patients underwent 63 REAs. Indications were Cushing syndrome (n = 18), Cushing disease (n = 21), Conn's adenoma (n = 10), pheochromocytoma (n = 5), incidentaloma (n = 5) and adrenocortical carcinoma (n = 2). Tumor size varied from 2 to 8 cm. Median age was 48,6 years. Mean operative time was 135 min (45-240), mean intraoperative blood loss – 85 ml (30-550). The complication rate was 17,77 %. Median postoperative hospital stay was 5 days (2-10).

Introduced in 1994 and displaying all advan-

оперативна кръвозагуба – 85 ml (30-550). Процентът на усложненията възлиза на 17,77 %. Средният постоперативен болничен престой бе 5 дена (2-10).

Введена едва през 1994, носейки всички предимства на мини-инвазивната хирургия, РЕА постепенно се превърна в стандартен метод за лечение на бенигнените лезии на надбъбречните жлези.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: ретроперитонеална ендоскопска адреналектомия, мини-инвазивна адреналектомия

tages of minimal access surgery REA has become the standard of care for benign adrenal tumors.

KEY WORDS: retroperitoneal endoscopic adrenalectomy, mini-invasive adrenalectomy

Въвеждането и развитието на миниинвазивната хирургия доведе до реализирането на една отдавна мечтана от хирурзите цел – да се редуцира до минимум травмата от хирургическата манипулация върху човешкото тяло.

Ретроперитонеалната ендоскопска адреналектомия (РЕА) е въведена от Kelly през 1994г., а в България само две години по-късно – през 1996 г. във II-ра Хирургия при УМБАЛ „Александровска“, София. Оттогава досега в клиниката са извършени близо 80 РЕА, като в последните години техният брой значително надвишава този на конвенционалните адреналектомии (КА).

Материал и методи

За периода 11.1996г. - 12.2004г. в Катедрата по хирургически болести при УМБАЛ „Александровска“ са проведени 119 адреналектомии при различни патологични процеси на надбъбречните жлези.

Разгледани са две съпоставими групи пациенти. Група I (проспективен анализ) - 63 РЕА, проведени при 61 пациента и група II (ретроспективен анализ) – 45 КА, проведени при 44 пациента. На табл. 1 е представена демографската характеристика на двете групи:

Таблица 1. Демографска характеристика на групите РЕА и КА

Table 1. Demographic characteristics of the groups REA and CA

	РЕА/REA (n* = 61)	КА/CA (n = 44)	p**
Период/Period	11.1996 г. – 12.2004 г.		
Пол (мъже/жени) Gender-men/women	17/44	7/37	p = 0,266
Средна възраст (години) Mean age (years)	48,6 (17 -77)	44,5 (16-71)	p = 0,252

*n – брой пациенти

**p > 0,05 – без сигнификантна разлика

Всички болни бяха насочени към клиниката от ендокринологични клиники след еднократна или многократни хоспитализации там и уточняване на диагнозата.

С оглед правилната селекция на пациенти-те сме изработили протокол за предоперативна оценка и поведение при пациентите с адrenalна патология. Показанията и противопоказания-та за РЕА са посочени в табл. 2 и табл. 3.

Таблица 2. Показания за РЕА

Table 2. Indications for REA

ПОКАЗАНИЯ/INDICATIONS

Билатерална адrenalна хиперплазия Bilateral adrenal hyperplasia (BAH)

Билатерална адrenalна хиперплазия при
АКТХ-зависим Cushing-синдром
ACTH – dependent BAH

Функционално активни адrenalни тумори Functioning adrenal tumours

АКТХ – независим Cushing-синдром (Cush-
ing - аденом)
ACTH – independent Cushing's syndrome
Първичен алдостеронизъм (Conn-аденом)
Primary aldosteronism (Conn's adenoma)
Феохромоцитом / *Pheochromocytoma*
Вирилизирани тумори / *Virilizing tumours*

Функционално неактивни адrenalни тумори

Инциденталомии 3-8 см
Incidentaloma
Кисти на надбъбречната жлеза
Adrenal cysts
Хемангиоми на надбъбречната жлеза
Adrenal hemangiomas

Всички пациенти с феохромоцитом в предоперативния период бяха подготвени с β -блокери, при необходимост комбинирани с β -блокери или други антихипертензивни средства, за постигане на оптимален контрол на артериалното налягане. При пациентите със синдром на Conn подготовката включваше прилагане на калий-съхраняващи диуретици и адекватна калиева субституция.

Операцията извършваме под обща интубационна анестезия, централна венозна катетеризация, постоянно мониториране на хемодинамичните показатели, капнометрия и капнография. Пациентът е в типично лумботомно положение. Чрез 15 mm кожна инцизия под 12-то

ребро се прониква в ретроперитонеалното пространство и се създава работно пространство – напрегнат ретропневмоперитонеум. Местата за поставяне на троакарите се проектират по предна и задна аксиларна линия. По остър начин се отваря фасцията на Gerota, която е основен ориентир и се достига до мастната капсула на бъбрека. След дисекция и/или резекция ѝ посредством ултразвуковия дисектор се визуализира горният полюс на бъбрека. Визуализира се и перитонеалният лист, което е от съществено значение за по натъшния ход на оперативната интервенция. Мобилизацията на адrenalната жлеза започва от латералното ѝ краче, краниално. След отпрепарирането на v. centralis поставяме титаниеви клипове. Спесименът в пластмасов Endo - bag се екстирпира през първоначалната кожна инцизия. Поставя се контактен дренаж в ретроперитонеалното пространство с последващи десуфлация и затваряне на кожните инцизии.

Всички пациенти са насочвани към съответната ендокринологична клиника за проследяване и евентуално субституираща терапия след изписването им.

За контролни прегледи на 1, 6, 12 месец следоперативно са поканвани всички пациенти. По време на контролните прегледи сме оценявали субективните оплаквания на болните, времетраенето на нетрудоспособността, срокът за възвръщане към нормалната физическа активност, локалният статус на оперативните цикатрикси, спиране, редуциране или без промяна на медикаментозната терапия.

Статистическата обработка на резултатите е направена с използване на статистически софтуерен продукт – SPSS 12,0 (Chicago, IL, USA:2004). Резултатите са представени като средни, съответно с минимална и максимална стойности. Използвани са Student-Fisher test, тестове за непараметричен анализ (Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis test, Chi-Square test), както и GLM (general linear model) multivariate analysis. За статистически значима е приемана стойност $p < 0,05$.

Таблица 3. Противопоказания за РЕА
Table 3. Contraindications for REA

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ CONTRAINDICATIONS

Абсолютни/Absolute

Големи тумори – над 10 см в диаметър

Large tumours (> 10 cm)

Инфилтративни тумори на надбъбречните жлези / *Infiltrative adrenal tumours*

Адренкортикален карцином
Adrenocortical carcinoma

Големи метастатични лезии в надбъбречните жлези / *Large adrenal metastases*

Малигнен феохромоцитом
Malignant pheochromocytomas

Екстраадренална локализация на феохромоцитом

Билатерален феохромоцитом
Bilateral pheochromocytomas

Относителни / Relative

Предишни оперативни интервенции в ретроперитонеалното пространство
Surgery previons retroperitoneal

Тумори с размер между 7 и 10 см
Tumours between 7 and 10 cm in size

Резултати

В групата от 61 пациента сме извършили 63 ретроперитонеални ендоскопски адреналектомии. При двама по повод Cushing-синдром е извършена билатерална адреналектомия на два етапа. Разпределението на пациентите по нозологични единици е както следва : Cushing - аденом (n = 21), Cushing-синдром (n = 18), феохромоцитом (n = 5), инциденталом (n = 5), Conn-аденом (n = 10), карцином (n = 2).

19, 68 % от пациентите, при които се проведе РЕА, бяха с морбидно затлъстяване – BMI > 30. При четирима от тях BMI беше над 40.

Най-голям процент 72,13 %, от пациентите са с артериална хипертония, съпроводена и с други придружаващи заболявания, най-често захарен диабет и ИБС.

Средният размер на отстранените туморни формации е 3,75 см (2-8см).

От проведените оперативни интервенции

54 завършихме ендоскопски. От тях тотална адреналектомия е извършена при 34 (53,97 %), а при 20 – субтотална адреналектомия (31,75 %). В 9 случая (14,28 %) се наложи конверсия.

Общият процент значими интраоперативни усложнения бе 7,94 %. Те включваха: лезия с кървене от туморната формация, кървене от лезия на бъбречния паренхим, пневмоперитонеум, пневмоперитонеум с пневмоторакс, хемодинамични нарушения при един случай с феохромоцитом. Значими постоперативни усложнения (постоперативна хеморагия, ретроперитонеален абсцес) наблюдавахме при 5 от нашите пациенти (7,94 %). Средната интраоперативна кръвозагуба бе 85 ml (30-550), а средното оперативно време – 135 min (45-240). Само при 5 пациента се наложи системно прилагане на обезболяващи средства в рамките на два следоперативни дни. При останалите анагетик е прилаган само еднократно в ранния постоперативен период. Пациентите бяха раздвижвани между 4- и 6-час след оперативната интервенция. Средният постоперативен престой е 5 дни (2-10).

В групата на 45-те конвенционални адреналектомии 44 са едностранни и 1 двустранна на два етапа при мъж с феохромоцитом. Показанията са били: Cushing-аденом (n = 12), Cushing-синдром (n = 8), феохромоцитом (n = 9), инциденталом (n = 5), Conn-аденом (n = 4), карцином (първичен n = 1, метастатичен n = 1), други (n = 5, киста n = 1, хемангиом n = 2, андроген-продуциращ аденом n = 2). 22,72 % от пациентите, при които се проведе РЕА бяха с морбидно затлъстяване – BMI > 30. При трима BMI беше над 40.

При 8 пациента установихме интраоперативни усложнения – 17,77 %. Средното оперативно време при конвенционалните адреналектомии е 120 min (75-240). Постоперативните усложнения, установени при 10 пациента – 22,22 %, включваха: ретроперитонеален абсцес (n = 1), супурация на оперативната рана (n = 3), ретроперитонеален хематом (n = 3), хеморагия с последваща необходимост от хемотрансфузия (n = 1), белодробен тромбоемболизъм (n = 1) и токсичен хепатит (n = 1).

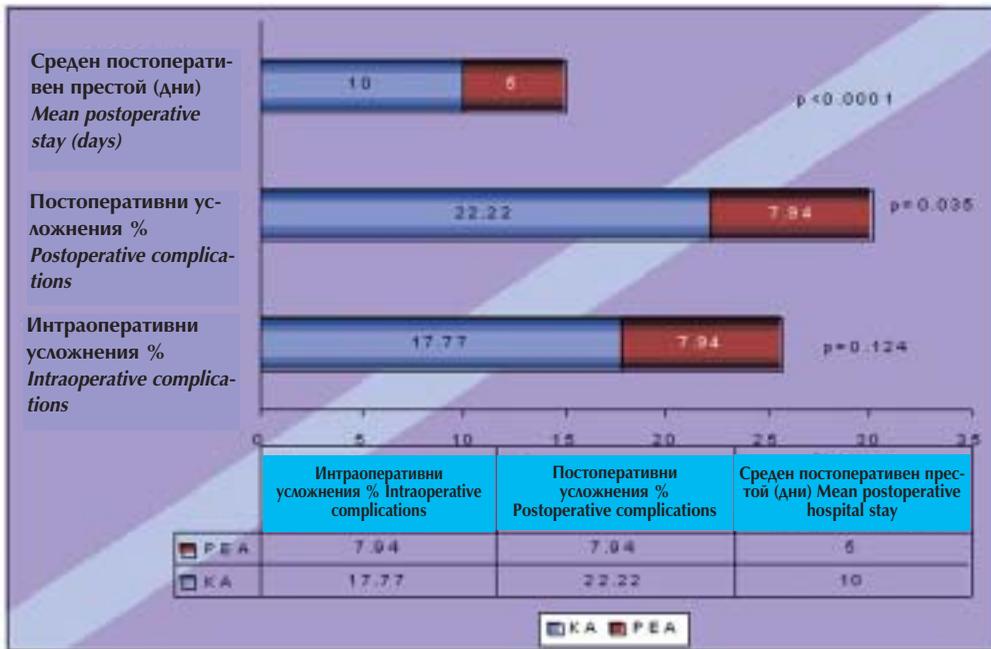
Средната продължителност на постоперативния престой е 10 дни (6-21).

Обсъждане

Ретроперитонеалната ендоскопска адреналектомия носи всички предимства на миниинвазивната хирургия – намалена инвазивност на оперативната интервенция, по-малко постоперативни усложнения, в частност свързани с оперативната рана, редуциране до минимум на следоперативните адхезии, намаляване на постоперативната болка, скъсен постоперативен престой, по-бързо възстановяване на пациентите и възвръщане към нормалните физически и социални активности, намален козметичен дефект (1, 3, 6). В нашия материал установихме сигнификантна разлика в постоперативните усложнения ($p = 0,035$) и средния постоперативен престой в полза на РЕА ($p < 0,0001$) (фиг.1).

тервенция (2, 8, 9, 11).

Размерът на тумора се разглежда както като основен показател за неопластичен потенциал, така и като фактор за определяне достъпа за хирургична интервенция (4). Адреналните карциноми обикновено са с размери над 5-6 см. В литературата няма съобщение за карцином под 2,5 см. Предлагани са различни размери като критерий за резекция на тумора ("cut-off size") - от 2,5 до 6см, като за такава граница най-често се използва 4см. Наличието или не на признаци на инвазивен локален растеж в съседни тъкани и органи, структурната характеристика на формацията – интратуморна некроза и/или кръвоизлив, наличие на калцификати, увеличени регионални лимфни възли, наличие на далечни метастази се разглеждат като прецизиращи фактори



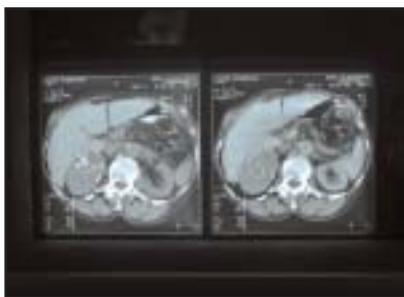
Фигура 1. Сравнение между РЕА и КА по отношение компликации, постоперативен престой

Figure 1. Complication rate, postoperative stay - comparison between REA and CA

В процеса на преодоляване на обучителната крива и стандартизиране на метода се наблюдава и намаляване и постепенно приближаване стойността на средното оперативно време на РЕА (135 мин) към тази при КА (120 мин) ($p = 0,91$).

Бенигнената адренална патология е водещата индикация за миниинвазивен хирургичен достъп, докато доказано инвазивните адренални лезии са показани за конвенционална, съобразена с основните онкологични принципи, ин-

при определяне на хирургическия достъп. Наше становище е, че при инциденталомии с размери до 6-8см без данни за локален инвазивен растеж РЕА е една добра опция за тяхното отстраняване. Ограниченото работно пространство налага определяне размера на бенигнената туморна формация от 6-8 до 10 см като релативно противопоказание за РЕА. Данните за инвазивен растеж на туморната формация, независимо от размера ѝ, предопределят конвенционален подход с цел постигане максимална он-



Снимки 1, 2, 3 – КТ, интраоперативен изглед, спесимен - адренокортикален карцином, р-р = 8см, остранен посредством РЕА

Photos 1, 2, 3 – CAT, Intraoperative view, specimen - adrenocortical carcinoma, tumour size - 8 cm, removed by REA

кологична радикалност. В нашия опит описваме два случая на РЕА при първичен адренокортикален карцином. В единия предоперативната диагноза беше – Cushing-аденом, а във втория – инциденталом с наличие на съмнителни за малигненост КАТ-данни - 6-сантиметрова, с нехомогенна структура лезия, с наличие на калциеви депозити по периферията. Интраоперативно в първия случай се установи 5,5 см, а във втория – 8 см формация без данни за локален инвазивен растеж (снимки 1, 2, 3). И в двата случая се отдаде ендоскопски тотално отстраняване на формациите. Хистологичните резултати показаха наличие на адренокортикален карцином. Едната пациентка е починала на втората година, като причината за смъртта е била заболяване на сърдечно-съдовата система без връзка с надбъбречната патология. Другата при контролен преглед на 18 месец е без оплаквания и без данни за локален рецидив, далечни и порт-метастази.

Феохромоцитомът като функционално активен тумор на надбъбречната жлеза не бива да се разглежда като контраиндикация за РЕА. В тази насока адекватната предоперативна подготовка, включваща задължително α -блокада, както и стриктният хемодинамичен контрол, особено при създаването на ретропневмоперитонеума и клипсирането на v. centralis, прецизната техника на дисекция и внимателното манипулиране на жлезата, максимално ранният контрол на съдовите структури са безспорни предпоставки за избягване и редуциране до минимум интраоперативните усложнения и честотата на конверсии при тази патология (5, 7, 10). В нашия материал само при един случай на феох-

ромоцитом се наложи конверсия по причина - хемодинамични нарушения по време на оперативната интервенция.

Не установихме сигнификантна зависимост на оперативното време или постоперативния престой при РЕА от ВМІ на пациента. Сигнификантно по-голям е броят на постоперативните усложнения при тази коморбидност при групаа КА ($p = 0,046$), като и в трите случая това е супурация на оперативната рана. По-голям е и средният постоперативен престой при групата КА - 17,5 дни в сравнение с РЕА-групата - 6,5 ($p < 0,0001$). Това ни дава основание да не считаме морбидното затлъстяване за противопоказание за прилагане на РЕА при пациенти с адренална патология. Напротив, при тези пациенти РЕА е добра и технически осъществима хирургична терапевтична опция.

Заклучение

Миниинвазивните техники бързо, безапелационно и с голям консенсус се налагат в хирургическата практика. Не малка част от тях вече са завоювали мястото си като „нов златен стандарт“ при лечението на редица заболявания. Това се дължи на вече добре познатите и доказани техни предимства. В този аспект, РЕА не само, че не прави изключение, но напротив - въведена едва преди 10 години, тя успя да докаже както предимствата си на оперативен метод, така и ползата си за пациента. РЕА успя не само да намери и постепенно да утвърди мястото си в адреналната хирургия, но и да се превърне в стандартен метод за лечение на бенигнената надбъбречна патология.

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Тодоров Г. Т., Ретроперитонеална лапароскопска адrenaлектомия - 3 - троакарна оперативна техника, *сп. Хирургия*, 50, 1997, 2, 25-7.

2. Тодоров Г. Т., Р. Петков, В. Младеновски, Възможности на ендоскопската хирургия в лечението на заболяванията на надбъбречните жлези, *сп. Хирургия*, LX, 2004, 1, 22-25.

3. Balogh A., L. Varga, J. Julesz, Minimally invasive adrenalectomy with posterior retroperitoneoscopy, *Orv Hetil.*, 141(16), 2000, 845-8.

4. Barnett C, Limitations of size as a criterion in the evaluation of adrenal tumours, *British Journal of Surgery*, 128, 2000, 973-82.

5. Berends F. J., E. V. Harst, G. Giraudo, Safe retroperitoneal endoscopic resection of pheochromocytomas, *World J. Surg.* 26, 2002, 527-531.

6. Bonjer H. J., V. Sorm, F. J. Berends, Endoscopic retroperitoneal adrenalectomy: lessons learned from 111 consecutive cases. *Ann-Surg.* ,232(6), 2000, 796-803.

7. Hemal A. K., R. Kumar, Misra MC, Retroperitoneoscopic adrenalectomy for pheochromocytoma: comparison with open surgery. *JSL.S.* , 2003, 7(4), 341-5.

8. Marescaux J., D. Mutter , M.Vix, Endoscopic surgery. Ideal for endocrine surgery? *World J Surg*, 23, 1999, 825-34.

9. Pisanu A., A. Cois , A. Montisci, A. Uccheddu, Current indications for laparoscopic adrenalectomy in the era of minimally invasive surgery. *Chir Ital.* ,56 (3), 2004,313-20.

10. Salomon L., R. Rabii , M. Soulie , Experience with retroperitoneal laparoscopic adrenalectomy for pheochromocytoma, *J Urol.* , 2001,165(6 Pt 1),1871-4.

11. Walz M. K., K. Peitgen, V. Markus, Posterior Retroperitoneoscopic Adrenalectomy: Lessons Learned within Five Years, *World J. Surg.* 25, 2001, 728-734.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Д-р Цонка Луканова
УМБАЛ „Александровска“, Клиника по
хирургически болести - II-ра хирургия,
София, 1431 Тел. 9 230 290,
моб. тел. 0889547517, Луканова
e-mail:lukanova@mail.bg

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Dr Tsonka Lukanova MD
Second Surgical Department, „Aleksandrovska“
University Hospital, 1431 Sofia,
Tel 9 230 290, e-mail:lukanova@mail.bg

ЕДНО ГОЛЯМО ИМЕ В БЪЛГАРСКАТА МЕДИЦИНА A DISTINGUISHED FIGURE IN BULGARIAN MEDICINE



ПРОФ. Д-Р АЛЕКСАНДЪР Т. ПОПОВ

Българската ендокринологична общност отбелязва с дълбока почит и уважение 90-та годишнина на един от първостроителите на ендокринологията у нас, блестящия лекар, преподавател и учен, професор д-р Александър Т. Попов.

Д-р Ал. Попов е роден в гр. София на 18 октомври 1915 г. Потомствен лекар, израстнал в интелектуална среда с високи морални принципи, младият Александър Попов завършва Медицинския факултет в София през 1940 г., след което последователно работи като селски участъков лекар и като ординатор във вътрешно отделение на болницата на Червения кръст (понастоящем Института „Пирогов“). През 1946 г. той е избран за асистент към консултативната поликлиника на Медицинския факултет, прехвърлен впоследствие към Терапевтичната клиника на проф. Алекси Пухлев.

През 1951 г. д-р Ал. Попов става главен асистент към Клиниката по вътрешни болести, ендокринология и болести на обмяната към новосъздадения Институт за специализация и усъвършенстване на лекарите (ИСУЛ), ръководител на която е доцент, по-късно академик Иван Г. Пенчев. Професионалната и преподавателската кариера на д-р Ал. Попов преминава през всички академични степени – от доцент (1957), старши научен сътрудник към БАН (1964) до професор по ендокринология (1967), завеждащ диабетно отделение и заместник-директор на Научния институт по ендокринология, геронтология и гериатрия към Медицинската академия.

Prof. ALEKSANDER POPOV

The Bulgarian endocrine society announces with great honor and respect the 90-th anniversary of one of the founders of Bulgarian endocrinology, a brilliant physician, teacher and scientist, Professor Alexander T. Popov, MD.

Dr Al. Popov was born in Sofia on October 18, 1915 in a family of physicians and raised with the cultural traditions and high morality principles of his intellectual background. The young Alexander Popov graduated the Medical Faculty in Sofia in 1940 and in succession occupied positions as a village doctor and a resident in the Clinic of internal medicine of the Red Cross Hospital (Nowadays the Institute for Emergency Medicine „Pirogov“). In 1946 he was elected for an assistant professor to the Outpatients Clinic of the Medical Faculty and later was moved to Prof. Aleksi Puhlev's Clinic of Therapy.

In 1951 dr Al. Popov became a chief Assistant professor to the Clinic of internal medicine, endocrinology and metabolism of the newly formed Institute for postgraduate specialization, whose head was Associate professor (and later on academician) Ivan Pentchev. The professional and academic career of dr. Al. Popov went through all academic steps: Associate professor (1957), Senior research associate at the Bulgarian Academy of Sciences (1964), head of Clinic of Diabetology and Vice director of the Scientific Institute of Endocrinology, Gerontology and Geriatric Medicine of medical Academy. After the transformation of the Academy's structure in 1974, he joined the Depart-

След преобразуванията в структурата на Академията през 1974 г. той преминава към Катедрата по вътрешни болести на Медицинския факултет, избран е за ръководител на същата Катедра и Клиниката по ендокринология в Александровска болница, на който пост той остава до пенсионирането си. Заемал е редица отговорни длъжности в системата на здравеопазването – републикански специалист по ендокринология, методичен ръководител на окръжни болници и др. Той продължава да работи активно и след пенсионирането си като консултант към Катедрата и към Института за лечение на чужди граждани, дългогодишен председател е на Специализирания научен съвет по гастроентерология, ендокринология, хематология, клинична лаборатория и хранене към ВАК.

Научната дейност на проф. Ал. Попов е отразена в близо 200 научни статии, монографии и учебни ръководства у нас и в чужбина. Той е член на много международни научни асоциации и редакционни колегии, почетен член е на Българското научно дружество по ендокринология, а през последните години и активен сътрудник на Българското дружество по психо-соматична медицина.

През своята научна кариера проф. Ал. Попов е работил по всички основни направления на ендокринологията и болестите на обмяната. Основните му научни приноси са главно в областта на захарния диабет и предиабета, хипоталамо-хипофизната патология, нарушенията в калциево-фосфорната обмяна и др.

Професор Александър Попов е известен на своите ученици и сътрудници като блестящ клиницист и преподавател с богата ерудиция.. На основата на прецизните си знания той винаги е отстоявал собствена позиция, критичност и възискателност, бидейки образец на етичност, колегиалност и благородство на духа при всякакви ситуации. Широките му интереси обхващат не само медицината, но също художествената литература, музиката и други сфери на научното и художественото творчество. Въпреки възрастта си, той и досега продължава да следи новостите в науката, развитието на медицината и обществения живот, давайки достоен пример на по-младите поколения лекари и учени.

От името на цялата ендокринологична общност Редакцията на списание „Ендокринология“ сърдечно поздравява своя именит колега и доайен, като му пожелава здраве, бодрост на духа и дълголетие.

ЧЕСТИТ ЮБИЛЕЙ!

ment of Internal Medicine of the Medical Faculty and was elected Head of the Department and later of the Clinic of Endocrinology of Alexandrovska Hospital. He remained at this position until retirement. Prof. Popov occupied several positions in the healthcare system: chief state endocrinologist, a methodological advisor of a number of regional hospitals etc. He continued active work after his retirement as a consultant to the Department and the Institute for treatment of Foreign Citizens. For many years he was chair of the Specialized Scientific Board of Gastroenterology, Endocrinology, Hematology, Clinical Laboratory and nutrition to the Higher Attestation Commission.

The scientific work of Prof. Al. Popov is reflected in the almost 200 papers, monographs and manuals published in Bulgaria and abroad. He is a member of numerous international scientific associations and editorial boards and an honorary member of the Bulgarian Society of Endocrinology. In the recent years he has been an active associate of the Society for psychosomatic medicine.

In his scientific career Prof. Al Popov has worked in all spheres of endocrinology and metabolism. His principal scientific merit lies in the area of diabetes mellitus and prediabetes, the hypothalamic-pituitary disorders, the disorders of calcium-phosphorus homeostasis etc.

Prof. Alexander Popov is well known to his students and associates as a brilliant clinician and an experienced teacher... Based on his profound knowledge he always withstood his firm position. He was an example for ethics and collegiality, and spiritual honorability in every situation. His broad interests expanded not only in medicine but also in literature, music, and other areas. He still continues to follow closely the advances in endocrinology and the dynamic developments in medicine and the society, being a model for the younger generations of physicians and scientists.

On behalf of the whole endocrine community the Editorial Board of Endocrinologia journal greets cordially our famous colleague and doyen and wishes him health, spiritual vigour and longevity.

Списание
ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ISSN 1310-8131
Българското 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 избран превод на български.

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

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

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 the illustrations (figures and tables) are printed in Bulgarian and English. The papers from abroad are published in “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).

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.

тоди, 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 за ведение 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 извод.

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.

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 и 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 мястото (горе, долу). Таблиците се представят с готово написани обяснителни текстове на български и на английски, които са разположени над тях; номе-

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

References

The references should be presented on a separate page at the end of the manuscript. It is recommended that the number of references should not exceed 15-20 titles for the original articles and 30-35 titles for the reviews; 2/3 of them should be published in the last 5 years. References in Cyrillic should be listed first, followed by the Latin ones in the respective alphabetic order. The number of the reference should be followed by the family name of the first author and then his/her

рацията им е отделна (също с арабски цифри). Посочените в таблицата 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, последва ни 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 книгата, началната и крайната страница. Глави (раздели) от книги се изписват по аналогичен начин, като след автора и заглавието на главата (раздела) се отбелязват пълното заглавие на книгата, имената на редакторите (в скоби), издателството, градът и годината на издаване, началната и крайната страница.

Примери:

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.

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, подписани 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.

initials, names of the second and other authors should start with the initials followed by the 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 off the chapter first, followed by "In:", full 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 Cretenism. 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 revisions and not received back in 60 days it shall be treated as newly submitted manuscripts. Manuscripts of articles accepted for publication will not be returned to the authors.

Address for sending of manuscripts and other editorial correspondence

Editorial board:

Clinical Center of Endocrinology and Gerontology

6, D. Gruev Str.

1303 Sofia, BULGARIA

Prof. B. Lozanov (Editor-in chief)

or Assoc. Prof. Ph. Kumanov

(Scientific Secretary)

8th European Congress of Endocrinology

incorporating the **BES**

1-5 April 2006

Scottish Exhibition and Conference Centre
GLASGOW, UK



Abstract Deadline:
21 October 2005

Preliminary Programme and Call for Abstracts

This event, activity code 28042, has been approved for external credit for the CPD scheme of the Federation of the Royal Colleges of Physicians of the UK



www.ece2006.com



ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ENDOCRINOLOGIA



Списание
на Българското дружество
по ендокринология
към СНМД в България

Journal
of the Bulgarian Society
of Endocrinology
(BSE)

Главен редактор
Проф. Боян ЛОЗАНОВ
Научен секретар
Доц. Филип КУМАНОВ

Редактор на английски
Д-р Александър ШИНКОВ
Отговорен редактор
Румен НИНОВ
© *Първа корица и графичен дизайн*
Румен НИНОВ

Editor-in-chief
Prof. Bojan LOZANOV
Scientific secretary
Assoc. prof. Philip KUMANOV

English editor
Alexander SHINKOV, MD
Art director
Rumen NINOV
© *Cover&Desing*
Rumen NINOV

Каталожен
номер 938

Абонамент

за списание „Ендокринология“ – 2006 г.
(том. 11, 4 книжки)

Списанието се индексира от водещите агенции за научна медицинска литература в Европа и САЩ

Цена за едногодишен абонамент – 30 лв.

Абонаментът се извършва във всички станции на Български пощи,
и в СБАЛЕНГ, ул. Дамян Груев 6, София 1303,
тел.: 02/987 15 53, 987 72 01 (Габриела Георгиева)