



ISSN 1310-8131

Том XII / Volume XII

Книжка 3 / Number 3, 2007

ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ENDOCRINOLOGIA

Списание
на Българското дружество
по ендокринология
(БДЕ)

Journal
of the Bulgarian Society
of Endocrinology
(BSE)

Гл. редактор: Боян Лозанов
Зам. Гл. редактор: Вл. Христов
Секретар: Р. Ковачева

Editor-in-Chief: Bojan Lozanov
Associate-Editor-in Chief: Vl. Christov
Scientific secretary: R. Kovatcheva

Редакционна колегия:

А.-М. Борисова, Ал. Куртев, В. Цанева,
Д. Коев, Ив. Цинликов, К. Христовозов, К. Копри-
варова, Л. Коева, Л. Дянков, М. Орбецова, М.
Протич, М. Петкова, С. Захариева, Ц. Танкова

Editorial Board:

А.-М. Borissova, Al. Kurtev, V. Tzaneva, L. Koeva, I.
Tzinlikov, D. Koev, K. Koprivarova, K. Hristozov
M. Protich, M. Petkova, L. Dyankov, M. Orbetzova,
S. Zakharieva, Tz. Tankova,

Редакционен съвет:

Ат. Киряков, Г. Кирилов, Е. Рачев, Ж. Геренова,
Ил. Атанасова, И. Даскалова, К. Цачев,
Т. Хаджиева, Т. Сечанов, Ф. Куманов

Advisory Board:

A. Kiriakov, G. Kirilov, E. Rachev, J. Gerenova,
I. Atanassova, I. Daskalova, K. Tzachev,
T. Hadzieva, T. Sechanov, F. Kumanov

Международен научен съвет:

М. Богоев (Скопие), А. Булатов (Москва), Ф.
Деланж (Брюксел), Г. Ердоган (Анкара),
Е. Збранка (Яш), А. Изгори (Рим),
Б. Каранфилски (Скопие), П. Кенгъл-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 (Буганеца)

International Scientific Board:

M. Bogoev (Skopje), A. Bulatov (Moscow),
M. Coculescu (Bucharest), F. Delange (Brussels),
G. Erdogan (Ankara), J. Fovenyi (Budapest),
A. Isidori (Rome), B. Karanfiski (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/The journal is indexed by:

- *Bulgarian Citation Index*
- *National Library of Medicine, Bethesda*
- *The Librarian Royal Society of Medicine, London*
- *Academic National de medicine Bibliotheque, Paris*
- *British Diabetic Association, London*
- *Who Regional Office for Europe, Copenhagen*
- *Who Health Organization Library (periodicals), Geneva*
- *Canadian Institute for Scientific and Technical Information, Ottawa*

Списание

ЕНДОКРИНОЛОГИЯ

том XII, книжка 3, 2007

Съдържание

Обзор

Г. Кирилов

Особености и аналитични проблеми на тиреоглобулина и тиреоглобулиновите автоантитела при мониториране на пациентите с тиреоидни карциноми 132

Христо П. Чалъков

Цитокини и захарен диабет тип 1 138

Ралица Робева, Десислава Добрева, Алексей Савов, Анелия Томова, Филип Куманов

Полиморфизъм на андрогенния рецептор в българската популация 146

Цветалина Танкова

Съвременни критерии за диагноза на захарен диабет: препоръки на СЗО (2006) 96 155

Йоанна Матрозова, Сабина Захариева, Георги Кирилов, Красимир Калинов, Владимир Христов

Съотношението алдостерон/ренин при скрининга за първичен алдостеронизъм – плазмена ренинова активност или активен ренин?..... 164

Указания за авторите 180

Хроника 183

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), Доц. Р. Ковачева – научен секретар (GSM 0898/60 86 02)

• Elsevier Bibliographic Databases, Netherlands
• Nagasaki University Medical Library, Nagasaki
• Державна Наукова Медична Библиотека, Київ

• Library, National Institute of Infectious Diseases, Tokio
• ВИНТИ/РАН-МинНауке России, Москва

ISSN 1310-8131

Journal
ENDOCRINOLOGIA

volume XII, number 3, 2007

Contents

Review

G. Kirilov

Special Features and Analytical Problems of Thyroglobulin and Thyroglobulin
Autoantibodies in the Follow-up of Thyroid Cancer Patients 132

Hristo P. Chalakov

Cytokines and Diabetes Mellitus Type 1 138

Ralitsa Robeva, Desislava Dobрева, Aleksey Savov, Anelia Tomova, Philip Kumanov

Polymorphism of the Androgen Receptor in the Bulgarian Population 146

Tsvetalina Tankova

Current Criteria for the Diagnosis of Diabetes Mellitus:
2006 WHO Recommendations 155

Joanna Matrozova, Sabina Zacharieva, Georgi Kirilov, Krasimir Kalinov, Vladimir Hristov

Aldosterone-to-Renin Ratio in the Screening for Primary Aldosteronism- Plasma Renin
Activity or Active Renin? 164

Instructions to Authors 180

Chronicle 183

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 (GSM 0888/68 03 43), Assoc. Prof. R. Kovatcheva
– Sci. Secretary (GSM 0898/60 86 02)

Особености и аналитични проблеми на тиреоглобулина и тиреоглобулиновите автоантитела при мониториране на пациентите с тиреоидни карциноми

Г. Кирилов

Клиничен център по ендокринология, Медицински университет – София

Special Features and Analytical Problems of Thyroglobulin and Thyroglobulin Autoantibodies in the Follow-up of Thyroid Cancer Patients

G. Kirilov

Clinical Center of Endocrinology, Medical University – Sofia

Резюме

Тиреоглобулинът (Тг) е много важен и чувствителен биохимичен туморен маркер за проследяване лечението на пациентите с тиреоиден карцином. За съжаление обаче, измерването на Тг е технически усложнено и различните типове анализи за Тг (ИРМА и РИА) предоставят противоречиви резултати. Присъствието на тиреоглобулинови антитела (ТгАм) в серумите на пациентите оказва сериозно въздействие върху надеждността на резултатите за Тг и компрометираща клиничната употреба на сегашните анализи за Тг. По принцип

Abstract

Thyroglobulin (Tg) is a very important and sensitive biochemical tumor marker in the follow-up of thyroid cancer patients. However, Tg determination is technically complicated and different types of Tg assays (IRMA and RIA) produce controversial results. The presence of thyroglobulin antibodies (TgAb) in patients sera has serious effects on the reliability of the Tg value reported and compromise the clinical utility of current Tg assays. In principle, the IRMA methods were prone to underestimate serum Tg in the presence of TgAb, whereas RIA methods appeared resistant to TgAb influence. It is impor-

ИРМА методите са склонни да подценяват нивата на Т₂, докато РИА анализите изглеждат по-устойчиви на интерференцията на Т₂Ат. Много съществено е измерванията и сравняванията на Т₂ да се извършват по един и същ метод и в една и съща лаборатория. Вече се смята за задължително във всяка изпратена проба за определяне на Т₂ винаги да се изследват с чувствителен метод и Т₂Ат.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: тиреоглобулин, тиреоглобулинови антитела, тиреоиден карцином

tant to compare Tg measurements made by the same methods and performed by the same laboratory. Moreover, it is mandatory to determine TgAb with a sensitive method in every specimen sent for Tg measurement.

KEY WORDS: thyroglobulin, thyroglobulin antibodies, thyroid cancer

Тиреоглобулинът като проблемен тест

Диагностичната позиция на тиреоглобулина (Т₂) в качеството му на туморен маркер и ключов показател за следоперативно мониториране на пациентите с диференциран тиреоиден карцином (ТК) – папиларен и фоликуларен, е добре известна, утвърдена и развивана вече от десетилетия (6). Това личи и от няколко публикации у нас през последните години (1,2). Т₂ е важен лабораторен тест за преценка на наличната тиреоидна тъкан, понеже той се продуцира само от щитовидната жлеза или от нейни следоперативни остатъци, респ. туморни части. Един грам тиреоидна тъкан дава кореспондиращо увеличение на кръвния Т₂ с един нанограм на милилитър. При нормален обем на щитовидната жлеза и липса на йоден дефицит това води до установяване на референтни стойности на серумния Т₂ за общата популация – от 5 до 35 нг/мл.

Повод за „завръщане“ отново към темата за Т₂ като туморен маркер е, че макар и усъвършенствано като стратегия и диагностичен подход, измерването на Т₂

все още не е преодоляло редица аналитични трудности и несигурни моменти, а от друга страна опитът и ежедневното сблъскване с тези проблеми сочат, че Т₂ е „особена проба“ и много проблеми свързани с нея все още не се познават. Това рефлектира върху точната интерпретация на резултатите, а от тук и върху терапевтичното поведение при ТК. В следващото изложение ще се опитаме да откритим някои от основните моменти, придаващи специфични особености на определянето на Т₂.

Определими нива на Т₂

Основен постулат е, че при пациенти претърпели тотална тиреоидектомия по повод на ТК, неопределимите или липсващи нива на Т₂ (при чувствителните методи <1 нг/мл) са показател за липса на туморен растеж. Нашият опит показва, че в не малко случаи обаче, Т₂ показва измерими количества (от 2 до 5 нг/мл), въпреки че щитовидната жлеза е отстранена. Пак в повечето случаи най-често се касае за Т₂, продуциран от минимални следоперативни остатъци на жлезата, а не от наличие на

тумор или метастази. Понеже остава известна несигурност, някои автори смятат за уместно назначаването на адекватни дози радиоiod за да се ликвидират тези остатъци от нормалната жлеза (8). Целта е по-нататъшното определяне на T₂ да „бъде изчистено от този артефакт“ и с това той да стане по-сигурен биохимичен маркер за туморен растеж.

Зависимост на T₂ от ТСХ

Счита се, че ТСХ е отговорен за растежа на повечето ТК. Този факт е в основата на продължителното следоперативно приемане на супресионни, а не субституиращи дози левотироксин (L-T₄) >2 мкг/кг телно с цел подържане на субнормални нива на ТСХ (< 0,3 ИЕ/мл). Тъй като ТСХ стимулира не само секрецията на тиреоидни хормони, но и тази на техния прекурсор-T₂, не е възможно да бъдат сравнявани, респ. интерпретирани, нивата на T₂ при ниско ТСХ (прием на L-T₄) с тези при високи нива на ТСХ (спиране на терапията с L-T₄ или след стимулация с рекомбинантен ТСХ).

Има ли смисъл от предоперативното определяне на T₂

За разлика от други биохимични туморни маркери (напр. простатно специфичния антиген) предоперативното измерване на T₂ няма разпознавателна диагностична стойност, което значи че високите нива на T₂ не са индикатор за тиреоиден тумор. Има обаче някои особености, които правят уместно евентуалното предоперативното определяне на T₂. Например, в случаите, когато биопсията изяснява данни за малигнен растеж високият предоперативен T₂ би означавал, че вероятно туморът произвежда достатъчно T₂ и поради това следоперативно той може да се използва с по-голяма сигурност като чувствителен туморен маркер. Логично е, че постоперативното измерване на T₂ би било най чувствително когато карциномни-

ят растеж е слаб, а предоперативния T₂ е бил висок. Обратното, ако предоперативния T₂ е бил нисък, евентуалният туморен растеж не би предизвикал ефективно повишение на T₂. При такива пациенти, неопределимите нива на T₂ след операция не дават необходимата гаранция срещу рецидив, така както е при пациентите, които са показвали високи предоперативни стойности. От друга страна, при последните ако T₂ показва определени стойности, въпреки извършената аблация на цялата нормална тиреоидея, това би било сигурен белег за персистиращ туморен растеж. Изтъкнатите примери представляват важни особености, които са съществени за интерпретацията на T₂. Въпреки дискутираните по-горе особености трябва да се подчертае, че рутинното предоперативно определяне на T₂ не се базира на утвърдени диагностични критерии и като правило не се препоръчва от тиреоидните експерти.

В настоящото изложение не се спират на другите диагностични показания за определяне на T₂ каквито са конгениталния хипотиреоидизъм, thyreotoxicosis factitia, тиреотоксичните състояния с ниска йодна каптация при тиреоидити и за диференциалната диагноза на тиреоидни и паратиреоидни кисти.

Следоперативно определяне на T₂

Проследяването и сравняването на промените в нивото на T₂ във времето – на всеки 6 месеца или 1 година, е много по-важно отколкото всеки един отделен резултат на T₂. Като правило след операция кръвните проби за T₂ се взимат на фона на лечението с L-T₄, т.е. при ниски нива на ТСХ. Със сензитивни методи за определяне на T₂ е установено, че ако пациентите са със стойности на T₂ < 1,0 нг/мл, рядко рекомбинантният ТСХ стимулира T₂ над 2нг/мл и обикновено 131-iod скенирането е негативно (7). Обаче, в наскоро публику-

ваните препоръки на Американската тиреоидна асоциация се посочва, че съмнителни за рецидив са не стимулираните нива на Т₂ > 2 нг/мл или също повишаването на стимулираните нива над 2 нг/мл в хода на проследяването (4).

Различия в аналитичните методи за определяне на Т₂

За съжаление, измерването на Т₂ страда от много аналитични проблеми (7), а освен това факт е, че с различните методи се получават много често различни резултати. Вариациите между отделните методи достигат близо 50%, а въввеждането на стандартизация CRM-457 за Т₂ също не решава проблема (8). По наши наблюдения, а също и по данни от външно лабораторния контрол една проба на пациент измерена в различни лаборатории дава стойности на Т₂ вариращи повече от два пъти. За избягване на методологичните различия принципно е препоръчително проследяването на Т₂ да се извършва в една и съща лаборатория и по един и същ аналитичен метод, респ. с един и същи кит. В противен случай е много трудно да се направи правилна интерпретация на резултата, т.е. да се даде отговор дали промените в Т₂ се дължат на разлика в методиките или са вследствие на персистиращ тумор.

Интерференцията на тиреоглобулиновите автоантитела (Т₂Ат) – най-трудно разрешимия проблем при анализите на Т₂.

Известно е, че при пациенти с ТК се регистрира по-често наличие на Т₂Ат – до 15 – 20 %. Невъзможността за надеждно отчитане на интерференцията на Т₂Ат компрометира клиничната употреба на съвременните методи за определяне на Т₂. При по-новите, тип „сандвич“, имунометрични определяния (IRMA) присъствието на Т₂Ат в кръвта на пациента интерферира с аналитичните Т₂Ат и отчетените стой-

ности на Т₂ са обикновено фалшиво ниски. Обратното, при по-стария тип конкурентни RIA анализи Т₂Ат предизвикват несъответстващо високи нива на Т₂. И в двата случая се подава фалшив сигнал към терапевтичното поведение, в първия – забавяне на лечението, а във втория – стресиране на пациента от резултата и назначаване на излишно скениране.

Сред професионалистите има дискусия относно избора на типа метод за анализ на Т₂ – IRMA или RIA (8). Повечето са на мнение, че RIA методите са по-подходящи, интерференцията с Т₂Ат е по-незначителна и резултатите за Т₂ са по-надеждни. Някои препоръчват IRMA да не се използват, когато при пациента има Т₂Ат, защото фалшиво ниският Т₂ създава по-големи проблеми от фалшиво високия Т₂. Последното може да е „полезно“, защото засилва бдителността на лекаря. Напоследък се забелязва известен отлив от употребата на IRMA, чието използване би било поуместно при пациенти без Т₂Ат, докато RIA е препоръчителният метод, когато има Т₂Ат.

Тъй като стана ясно, че взаимодействието на наличните Т₂Ат е най-проблемният момент, влияещ върху надеждността на резултатите за Т₂, възниква и още един въпрос – за употребата на чувствителни и точни методи за определяне на Т₂Ат. За съжаление и тук сме свидетели даже на по-големи различия и неточни резултати. Не рядко се случва един и същ пациент изследван по един метод да е Т₂Ат позитивен, а по друг негативен. Ето защо лабораториите трябва да изследват Т₂Ат с модерни стандартизирани имуноанализи, отчитащи стойностите на Т₂Ат в IU/ml, а старите аглутинационни тестове, даващи титрите на Т₂Ат трябва да останат в миналото. И тук е валидна препоръката за изследване на Т₂Ат в една и съща избрана лаборатория и по един и същ метод. През последните години повечето експертни препоръки изтъкват важността на за-

дължителното изследване на Т₂Ат в проби-те, които са изпратени за изследване на Т₂ (5). Това е продиктувано от факта, че не рядко стойностите на Т₂Ат при пациенти с ТК варират в двете крайности – от негативни до позитивни и че от важно прогностично значение е да знаем каква е тенденцията на промените в Т₂Ат в хода на лечението за 6 месеца до 1 година, което дава допълнителна информация за чувствителността на тумора към терапията. Установено е, че тенденцията към понижаване на Т₂Ат за по-дълъг период от няколко години е добър белег за ефективност на лечението. При някои пациенти не е не-обичайно да се наблюдава временно покачване на Т₂Ат в първите месеци след лечението с радиоидод, което може да се отчете като знак за ефективността му. Обикновено след 6 месеца в тези случаи Т₂Ат се възвръщат към изходните стойности.

Препоръка за успоредното повторно изследване на Т₂

Според цитираните по горе указания (5) в някои лаборатории вече е въведена практика на съхраняване на серумите от изработените проби за Т₂ и замразяването им (архивиране) с цел пробата за Т₂ да се изработи отново след 6 месеца или година заедно с новата проба за Т₂. Благодарение на подобен подход, за едновременно пускане на стара и нова проба, би могло да се отговори на въпроса дали настъпилите промени в нивото на Т₂ са вследствие на промени в тумора или са свързани с аналитични причини. Този замисъл би трябвало да се има предвид и по отношение на други биохимични туморни маркери.

Бъдещи перспективи

Напоследък бяха изпробвани някои нови подходи за преценка на тиреоглобулиновия статус при пациенти с ТК, които вдъхват надежда за преодоляване на проблемите с интерференцията на Т₂Ат (3). Тъй ка-

то в тиреоидните туморни клетки се експресират функциониращи ТСХ рецептори (ТСХР), рецепторният транскрипт – ТСХ-мРНК би могъл да служи като специфичен туморен маркер и като анализ да се изследва в периферната кръв чрез RT-PCR технология. Установено е, че измерването на ТСХ-мРНК, а също и на Т₂-мРНК в циркулацията е еднакво чувствително и високо специфично като маркер за мониториране на пациентите с ТК. Резултатите показват съвпадение от 95 % между измерването на ТСХ-мРНК, Т₂-мРНК и Т₂.

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Кирилов, Г. Тиреоглобулинът като туморен маркер в следоперативния контрол на диференцирания тиреоиден карцином – методологични и клинични особености. *Рентенология и Радиология*. 37, 1998, 2, 8- 11.
2. Кирилов, Г. , Б. Лозанов. Клинико-лабораторна стратегия за преценка на тиреоидния статус. *Ендокринология*. 7, 2002, 3, 4-14.
3. Chinnappa, P., L. Taguba, R. Arciaga, C. Faiman, A. Siperstein, A. E. Mehta, S. Reddy, C. Nasr, M. Gupta. Detection of thyrotropin-receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) and thyroglobulin mRNA transcripts in peripheral blood of patients with thyroid disease: sensitive and specific markers for thyroid cancer *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2004, 3705 - 3709.
4. Cooper, DS., G. Doherty, B. Haugen, R. Kloos, S. Lee, S. Mandel, E. Mazzaferri, B. McIver, S. Sherman, R. Tuttle. Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 16,2006,109-142
5. Demers, L. , C. Spencer. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. http://www.nacb.org/lmpg/thyroid_lmpg_pub.stm

6. Mazzaferri, EL., R. Robbins, C. Spencer, L. Braverman, F. Pacini, L. Wartofsky, B. Haugen, S. Sherman, D. Cooper, G. Braunstein, S. Lee, T. Davies, B. Arafa, P. Ladenson, A. Pinchera. A consensus report of the role of serum thyroglobulin as a monitoring method for low-risk patients with papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 88, 2003, 1433-1441.

7. Smallridge, R., S. Meek, M. Morgan, G. Gates, T. Fox, S. Grebe, V. Fatourehchi. Monitoring thyroglobulin in a sensitive immunoassay has comparable sensitivity to recombinant human TSH-Stimulated thyroglobulin in follow-up of thyroid cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 92, 2007, 82-87.

8. Spencer, C., L. M. Bergoglio, M. Kazarosyan, S. Fatemi, J. S. LoPresti. Clinical impact of thyroglobulin (Tg) and Tg autoantibody method differences on the management of patients with differentiated thyroid carcinomas. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 90, 2005, 5566-5575.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

г-р Георги Кирилов

Клиничен център по ендокринология

Бул. „Д. Груев“ 6, 1303 София

e-mail: drgkirilov@abv.bg

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Dr. Georgi Kirilov

Clinical Center of Endocrinology

6, Bul. D.Gruev, 1303 Sofia, Bulgaria

e-mail: drgkirilov@abv.bg

Цитокини и захарен диабет тип 1

Христо П. Чалъков

Клиника по интензивна токсикология и алергология към ВМА, София

Cytokines and Diabetes Mellitus Type 1

Hristo P. Chalakov, M.D.

Clinic of Toxicology, Military Medical Academy, Sofia, Bulgaria

Резюме

Настоящият материал представлява обзор върху горната тема, която е обект на многобройни изследвания от страна на различни специалисти – молекулярни биолози, генетици, имунолози, патофизиолози и разбира се, не по-малко вълнуваща е за ендокринолозите, които като крайно звено във веригата, в пряк досег с пациента, са призвани да прилагат научните достижения с цел предотвратяване на заболяването, подобряване на качеството и удължаване продължителността на живота на болелите. Обзорът се базира върху малка част от публикациите по темата (те са над 500!), затова не може да претендира за изчерпателност, но е в състояние да представи различни гледни точки по въпроса, тенденции в проучванията, промени

Abstract

The following material is a survey on the topic „Cytokines and diabetes mellitus type 1“, which is an object of umpteen examinations of different experts – molecular biologists, geneticists, pathophysiologists. Naturally the endocrinologists are expected to be interested in this topic too, because they have been the last link in the chain, in direct contact with to the patients. The endocrinologists are called to apply the scientific achievements in order to prevent the disease, to improve their lifestyle and prolong the average life expectancy of the people suffering with diabetes.

The review is based on a small part of the publications on the topic/there have been above 500 publications/, therefore this material claim to be comprehensive. It is supposed to present different points of view on the theme,

и/или допълнения в утвърдени теоритични аспекти на етиологията и патогенезата на захарния диабет. Проучванията върху ролята на цитокините в етиологията и патогенезата са многобройни, нерядко озадачаващи или направо противоречиви. Не може да не се отбележи и фактът, че експериментите важат за тъканни култури, а когато са *in vivo*, в огромното си мнозинство са върху животински модели – NOD мишки или *dp* плъхове.

Материалът включва в себе си информация за етиологията и патогенезата на захарен диабет тип 1 през призмата на цитокините, отчитайки съвременните научни постижения и открития.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: цитокини, диабет тип 1, обзор

Освен познатите генетичните фактори, водещи до предиспозиция за развитието на ЗД тип 1, се установи, че полиморфизмът на цитокинови гени може да играе важна роля в модифицирането на имунния отговор. Полиморфизмът на гена за IL-6 на позиция 174 може да усилва експресията на гена. Изследван е G/-174//C полиморфизма и се оказва, че при хомозиготите G, G/-174/ генотипът е по-чест в сравнение с контролите и почти двойно по-рядък е C генотипа (при болни от диабет). При двойно обременените фамилии, G алелът е бил предаден в 29 от 53 мейози. Така се предполага, че генът на IL-6, се включва към генетичните фактори за предразположение към диабет (15).

Проучване при NOD мишки открива, че в централната част на хромозома 11 е

including trends in investigations, changes and/or additions to approved theoretical aspects of the etiology and pathogenesis of diabetes mellitus. The explorations on the influence of cytokines on the etiology and pathogenesis are numerous, often surprising or just contradictory. It is important to underline the fact that the experiments apply to tissue cultures and when *in vivo*, in most occasions they have been experimented on animal species – NOD mice and *dp* rats.

The material has included information on the etiology and pathogenesis of diabetes mellitus type 1, taking into account the influence of the cytokines and reckoning with the novel scientific achievements.

KEY WORDS: Key words: cytokines, diabetes type 1, survey.

разположена област наречена бета-хемокинова генна фамилия, която е отговорна за липсата на T клетъчна пролиферация след свързването на T-клетъчният рецептор (ТКР) с CD3 молекулата. IL-4 коригира това състояние и предотвратява диабет при NOD мишки. Авторите предполагат, че бета-хемокините регулират T клетъчния отговор, а оттук развитие на диабет при горния животински вид. Последвалото подробно изучаване на централната област на хромозома 11 установи, че участъкът отговорен за развитието на диабет е Idd4 и по-точно намиращият се в него 5.2 cM интервал, който включва хемокинови гени (4, 14).

Друго изследване, използвайки високотелен олигонуклеотиден анализ идентифицира повече от 150 гени, чийто ефект

се отключва от цитокини. Някои от тези гени са очевидно зависими от транскрипционният NF- κ B, считан за главен фактор, отключващ цитокиновия ефект върху бета клетката, като контролира различни мрежи от транскрипционни фактори и ефекта им върху гените, необходими за бета-клетъчната диференциация, цитозолната и ендоплазморетикулната калциева хомеостаза и клетъчната апоптоза.

Експресията на гена на IL-11 потиска активирането на NF- κ B и активирания протеин-1/AP-1/, които са въввлечени в изявта на гените на проинфламаторните цитокини (3).

M55V полиморфизма на гена SUMO-4 се счита, че увеличава заболяемостта от ЗД-1, чрез повишаване активността на NF- κ B. Чрез удължаване на възпалителния отговор и чрез апоптозата на бета клетката, вероятно се намесва в патогенезата на автоимунния тип диабет (23).

При болни от диабет тип 1, е установен полиморфизъм на гена за хемокиновия рецептор 2/CCR2/, определящ движението на левкоцити в базален и инфламаторен статус (4).

Оформя се следната ситуация – при вирусна инфекция причинителят се посреща от АПК/макрофаги/МФ/, В-лимфоцити, гендритни клетки/. При болни с диабет е установена повишена макрофагеална активност. Такава е намерена и при здрави, но фамилно обременени. МФ поемат агента, преработват го и експресират части от него на повърхността си, в комбинация с молекули клас II от МНС. Комплексът се разпознава от CD4+ Т клетки, които се свързват чрез ТКР в комплекс с CD3. За пълноценно активиране са необходими действията на адхезионни и костимулаторни молекули (5). В резултат на това взаимодействие, макрофагите (МФ) отделят свободни радикали, азотен окис, TNF- α , IL-6 и IL-1. Последният усилва активирането на хелперните Т-лимфоцити, които освобождават IL-2 и гама-IFN. Той е най-силният активатор за МФ, а IL-2 се секретира основно от Th1, Tc и NK и усилва проли-

ферацията на Т, В и NK клетките. Освен това IL-1 има и ефект върху пролиферацията и диференциацията на В-клетките (1). В същото време е установена повишена експресия от островите на макрофагеални хемотаксични фактори (MCP – 1, 3 и 5), макрофагеален инфламаторен протеин/MIP – 1 α и 1 β ета/, RANTES/регулатор на нормалната Т-клетъчна експресия и секреция/, както и индуцирания от гама-IFN протеин 10/IP-10/(4). IP-10 е с повишена концентрация при лица с +/- антитела/antiGAD65, IA-2/, а самият той е инкриминиран за фактор, отключващ миграцията на Th1. МФ мигрират в панкреаса, следвайки горните стимули. Там именно те отделят гама интерферон. По това време (2-4-и ден от инфекцията), CD4+ и CD8+ Т клетки в островите няма/въз основа на експеримента лимфоцит хорион менингит вируса-LCMV/ (21). Гама-IFN-ът предизвиква свръхекспресия на клас I и аберадна експресия на клас II молекули от бета клетките. Към 7-я ден, когато вирусът е извън гостоприемника, няколко автореактивни и специфични към него цитотоксични Т-лимфоцити нахлуват в панкреаса, произвеждат главно гама-IFN и TNF- α , които засилват още повече експресията на клас I молекулите върху бета клетката, в комбинация с части от собствени антигени с определена идентичност/подобност на инфекциозния агент – молекулярна мимикрия.

Най-вероятно в тази фаза се извършва перфорин-зависимото убийство от CD8+Тлимфоцити – те имат ТКР за клас I, но не и в ефекторната фаза (21). Не липсват и други твърдения – че само перфоринът е достатъчен за ликвидирането на островните клетки (NOD мишки!). Но бета-клетъчен лизис имаме и при перфорин-дефицитни животински модели. Най-вероятната теза е за първоначално унищожение от перфорин-синтезиращи цитотоксични Т клетки, след което в ефекторната фаза са необходими достатъчно високи концентрации от гама-IFN, в комбинация с други цитокини, защото той сам, също не е в състояние да доведе до пълно уни-

щожение на островния апарат (21). Нещо повече, ЗД-1 се развива и при гама-IFN дефицитни животни (8). Аберантната експресия на клас II от бета клетката в комплекс със собствени антигенни епитопи, се разпознава разбира се, от хелперната популация лимфоцити (1).

Отделеният в островите МФ IL-1 има след себе си директни и индиректни ефекти. Преките – повишение на активността на изоформите на NO-синтазата/iNOS/ - увеличение на NO – блокиране на ензими съдържащи Fe-S центрове – намаляване на инсулиновата секреция (9,11). Непреките - заедно с TNF-alfa участва в индуцирането на продължителна, неосцилираща активност на NF-kB и това важи изключително за инсулин-секретиращи клетки (18). Един от таргетните гени на NF-kB е Fas – рецептор, който е въввлечен в програмираната клетъчна смърт/апоптоза/ на много клетъчни типове. За Fas е доказано, че се експресира от инсулин-произвеждащи клетки у мишки и хора (20). Гама-IFN също повишава експресията на Fas, но по друг механизъм. Горните три цитокина подготвят бета клетката за Fas-зависимо лизиране от автореактивни CD4+Тлимфоцити (2). Явно има и Fas-независими механизми за клетъчна смърт, защото експресията на негативна точкова мутация в мъртъв домен на Fas - Fascd, отлага развитието на диабет при NOD мишки, които остават чувствителни към трансферирането на спленоцити от болни животни (20). Освен това, се изучава и взаимодействието между Fas и Fas лиганда/FasL/ – мембранен протеин тип 2 от семейството на TNF. Горепосоченото взаимодействие води до апоптоза – програмирана клетъчна смърт, без излив на клетъчно съдържимо (8,19). Все пак, да се има предвид, че FasL е установен само имунохистохимично, но не и чрез поточна цитометрия (19). Важността на Fas се подчертава и от опита, че дори когато CD4+ Т клетки експресират силно диабетогения ТКР 4.1, намаляването на Fas експресията води до почти пълна протекция от диабет (2), без това да се отразява на инсу-

лита. Действията си IL-1/b/ осъществява, като предава сигнала в бета клетката, чрез сигналната молекула на цитокините-1/CS-1/ – клетъчен рецептор за вътреклетъчни пътеки, чрез c-Jun N-терминалната киназа/JNK/, с активност насочена към цитозола или мембранно-свързани субстрати и активиране на p38MAP киназата (17). При опити със свръхекспресия на супресора на CS-1/SOCS-1/, не се развива ЗД-1 – вероятно отчасти, поради блокирането на Fas експресията, индуцирана от гама-IFN и TNF-alfa. Наличните цитотоксични Т лимфоцити *in vivo*, се явяват неефективни, поради инхибиране отговора на бета клетката към цитокините и оттук неразпознаването и от горните лимфоцити като таргетна (6). Други изследователи при опити с Коксаки В вируса/CVB4/ и свръхекспресия на SOCS-1, лишават бета клетката от възможност за синтеза на IFN – alfa/gamma, като отговор спрямо вирусната инфекция в островните клетки. По този начин не се потиска вирусната репликация и се затруднява неговото очистиране, с последващо локално възпаление, тъканна увреда, освобождаване на секвестрирани островни антигени, което стимулира автореактивните Т клетки по пътя на „bystander“ активация (12). Т.е. един и същ процес, в различни експерименти, води до коренно противоположни резултати. Излиза, че CS-1 е ангажиран, както с предаването на сигнала навътре в бета клетката на отделените в ендокринния панкреас цитокини, така и с реакцията на бета клетката към директната вирусна атака. Отделените проинфламаторни цитокини от бета клетката/IFNs тип 1 и 2/ стимулират имунния отговор спрямо вируса, но те също така могат да отключат и аутоимунни реакции в генетично обременени индивиди по пътя на молекулярната мимикрия, чрез мобилизация на ендогенен антиген, да стимулират автореактивни Т клетки или да предизвикват суперантигенна стимулация (12). От една страна, отговорът на бета клетката със синтез на интерферон, е необходим и е нормален с

цел неутрализация на вирусната инфекция в островите и предпазване от диабет. От друга, същият отговор може да спомогне за отключването на диабет в предразположени лица. От трета, липсата на отговор чрез горния експеримент, също води до уязвимост на островните клетки към вирусната инфекция, с последваща атака от страна на НК клетките и развитие на диабет, като бета клетките умират в ранната фаза, когато Т и В лимфоцити в островната тъкан няма. Авторите на този материал считат, че тези резултати представляват доказателство, че в ранните фази на вирусната инфекция CVB4 може би е директно отговорен за развитието на диабет. Колкото до молекулярната мимикрия има автори, които са на мнение, че въпросът подлежи на дебати. Привеждат се примери, като този – защо мишки, обременени с предразполагащи към диабет адели от голямата система на хистосъвместимост (МНС), не показват ускоряване на развитието на болестта под действието на вируси. Молекулярната мимикрия според тях е с относителна тежест и вероятно има други механизми, които да обяснят патогенезата на заболяването (12).

Поведението на хелпери и цитотоксични Т клетки зависи и от експресията по повърхността им на хемокинови рецептори. Например, ако CD4+ и CD25+Т клетки експресират във високи концентрации хемокинов рецептор 7/CCR7/, съществува реална възможност за отлагане развитието на диабет в потомството. Но, ако имаме наличие на свързани рецептори – CXCR4/прости Т клетки/, CCR5, CXCR3/Th1 свързани/ и CCR3, CCR4/ Th2-свързани/ в периферни мононуклеарни клетки е налице положителна корелация с нововъзникнали случаи с диабет. В други проучвания, е установена намалена експресия на хемокинови рецептори CCR5 и CXCR3 при болни със ЗД-1. Особено значение се отдава на CCR4+Т клетки, за които се предполага, че са морфологичният субстрат на автоимунната деструкция и

ефекторните клетки съхраняващи имунната памет. Твърдението не е категорично, защото трябва да има предвид, че лиганди за CCR4 имат и тимус и активационно-регулираните хемокини/TAPX/. Откритието, че при изявата на ЗД-1, CCR4+Т лимфоцити са намалени в периферията, не се дължи на липса на реакция, а на натрупването им в островите (4).

По отношение ролята на Th1 и Th2 цитокините трябва да се отбележи, че схващането на Th1 цитокините като „лоши“, а Th2 като „добри“, както и отчитането като положително явление на конверсията от Th1 към Th2, е недостатъчно коректно. Най-общо Th1/Th2 моделът се приема, но с много уговорки и изключения (4). На практика, вече има недвусмислени доказателства, че Th1 и Th2 цитокините си сътрудничат в унищожението на островния апарат. Има обаче разлика в патоморфологичните промени, в зависимост кои цитокини са преобладаващи. Ако Th1 доминират в процеса на възпаление и разрушение, тогава имаме локален, ограничен инсулит, съдържащ най-вече CD4+ и CD8+ Т лимфоцити, а клетките умират от апоптоза, щадейки околната екзокринна тъкан. Ако преобладават Th2, лезиите са по-разпръснати, като инфилтратите съдържат предимно еозинофили, макрофаги, фибробласти, генерира се извънклетъчен матрикс и има малко на брой пръснати Т клетки, а бета клетката умира некротизирайки (5). Така защитниците и на двете тези – за апоптоза или некроза, са прави. За механизмите на задействане на апоптозата е споменато по-горе, а за некрозата на бета-клетъчния апарат, също има достатъчно доказателства. В експеримент е била проведена цитокинова атака/IL-1b и гама-IFN/ върху бета-клетъчен материал. Установява се, че липсва повишение на каспаза-3, който да индуцира синтеза на анексин V/маркер на апоптозата;/ липсва кумулация на липиди върху клетъчната повърхност/характерно за апоптозата;/ отделя се хроматин-свързващ протеин 1/HMGB-1/- нехарактерно за апоптозата, както и имаме намале-

ние на АТФ съдържимото/при апоптоза се увеличава/ (11, 7). Некрозата води до отделяне на антигени и HMGB-1, които стимулират проинфламаторните отговори. Видно е, че цитокините са в основата и на двата механизма на клетъчна смърт на инсулин-продуциращите клетки, като IL-1, гама-IFN и TNF-а, се оформят като основна триада в цитокин-медираното унищожение на островно-клетъчния апарат.

Такива са съвременните схващания за патогенезата на ЗД-1 при вирусна етиология. Когато болестта се отключва от хранителни антигени, пускът/обострянето се дължи на молекулярната мимикрия между части от тирозин-фосфатаза – два пептида със сходство 80-85 % с белтъка на млякото, пшеницата и фасула. Епитопите са различни от ключовия – 805-820 аминокиселина, който е идентичен 56 % и 100 % подобен на VP7 – най-големият имуногенен протеин на човешкия Рота вирус (16). Проучват се промените в чревната лигавица и мононуклеарните периферни клетки в зависимост от диетата, на която е поставено новороденото. При развитите диабет се наблюдава значително увеличение на uPHK за гама-IFN и TNF-а в чревните вили и експресия на клас II молекулите в биопсия на тънко черво, ако и през първите пет дни от раждането се приема диабет-протективна диета. Тези промени са с 1/3 по-малко, ако през първите пет дни новороденото се хранва с диабетогенна храна/житно-базирана/. Счита се, че увеличеният цитокинов отговор в червата води до възпалителни увреди, а те до повишена пропускливост на чревната лигавица с прехвърляне на антигени в кръвното русло, след което процесите са вероятно сходни на гореописаните. Изследването на мононуклеари в периферна кръв на болни от ЗД и здрави открива, че при болните в алфа4бетаТ-клетките секрецията на гама-IFN е повишена, а тази на TGF- β намалена (13).

Очевидно увреждането настъпва по повече от един начин, всеки от който съдържа в себе си многостъпални взаимо-

действия. С оглед на гореизложеното, автори поддържащи мнения за Th2 недостатъчност, поради намалена секреция на IL-4 от Valpha24JalfaQ+T клетките/Th1 регулирани/, които първоначално го синтезират заедно с гама-IFN/16/, изглеждат не толкова концептуални. От обработената информация, могат да се опишат и следните действия на споменати вече цитокини, както и други медиаторни молекули за които не е ставало въпрос:

IL-1 – увеличава експресията на индуцируемата субединица на протеазома LMP27, също свързана с производството на NO./22/

IL-2 – вероятно подпомага възстановяването на островите след увреждането им със Стрептозотоцин. Локалната му свърхекспресия води до инсулит, но прилаган системно предпазва от диабет (8).

IL-4 – има лек потискащ ефект върху панкреасните острови/на плъх/ и елиминира ефекта на IL-1 β върху проинсулиновата синтеза (22). Локално – тъканната му експресия от островите води до негеструктивен инсулит у NOD мишки (5). Но ако мишките експресират антигена BDC 2.5, предпазващото действие отпада (8). Освобождаването му от T χ 2 „потвърждава“ разпознаването на антигена от „правилната“ В-клетка и я активира към пролиферация и диференциация до плазмоцит, произвеждащ антитела (1, 5).

IL-6 – свърхекспресията му от бета клетките на NOD мишки води до негеструктивен инсулит. Инфилтратите съдържат CD4+, CD8+ и B220 клетки. Инсулитът е факт, но е налице и отлагане на началото на диабета. Затова се предполага, че IL-6 има локално протективно действие и/или то се осъществява чрез инфилтратите от лимфоцити. Взаимодействието между цитокина и предразполагащите за диабет гени индуцира появата на инсулит, защото, ако няма генетично предразположение, не се стига до възпалителна инфилтрация на панкреаса (10).

IL-10 – ускорява появата на диабет при някои проучвания, но в други се явява като

протектор (8). Локалната му продукция, за разлика от IL-4, усилва автоимунната деструкция и причинява некроза чрез запушване на микросъдовото русло. Стимулира активираните Т и В клетки. Отговорът от различните АПК към IL-10 е различен. IL-10, както и другите Th2 цитокини, участват в инсулита и периинсулита, увеличавайки експресията на клас II молекулите или чрез усилването на експресията на ендотелин-свързания агресин и така стимулира натрупването в островите на МФ, В-клетки, Ео (5). Th2 цитокините увеличават цитокиновата продукция от ендотелни и други клетки и усилват каскадата от автоимунни процеси в островчетата, чрез активирането на местни имунни клетки и увеличаване на инфилтрацията на панкреаса от други клетки, както и натрупването на фибробласти и генериране на извънклетъчен матрикс, което вторично води до некроза (5).

IL-11 – намалява активирането на NF- κ B, AP-1, IKK. Сметчава отговора на бета клетката към гамма-IFN и TNF- α , които повишават Fas експресията, която в комплекс с молекули клас I и II става обект на атака от автореактивни CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцити. Стимулира производството на IL-4 (3).

IL-12 – слаб потискащ ефект върху островите на здрави (животни). Ефектът не е свързан с производство на NO (22). Приложен при NOD мишки предизвиква инфилтрация на панкреаса с Th1 и деструкция. Но диабет имаме и при животни с липса на IL-12. Хипергликемията усилва генната експресия на множество цитокини и най-много (20кратно) на uPHK за IL-12 в МФ. Този резултат е доказателство за потенциално важния механизъм, който свързва повишената КЗ при диабетици с възпалението (24).

IL-13 – сам по себе си е без ефект, но противодейства на упражняваната от страна на IL-1 инхибиция на инсулиновата секреция. Ако се назначи заедно с IL-4, липсва протективен ефект (22).

TNF- α в опити ускорява развитието на ЗД при NOD мишки, но локалната му експресия от островните клетки може да предпази от спонтанно развитие на заболяването (22, 8).

Алфа-IFN – експресията му от бета клетките улеснява имуномедираната увреда. Обаче, орален прием на същия потиска появата на ЗД-1 при NOD мишки и запазва остатъчната бета-клетъчна функция при болни хора (8).

Гамма-IFN – заедно с TNF- α (но не и поотделно), намалява средната инсулинова кумулация и базалната инсулинова секреция, като глюкозостимулираното отделяне на инсулин остава увеличено/непроменено. Комбинацията им, но не и поотделно, също като IL-1, индуцира продукцията на NO (22).

В заключение може да се каже, че темата цитокини и ролята им в развитието на ЗД-1 е далеч от изчерпване. Необходими са още изследвания, с оглед уточняването на отделните цитокини, взаимоотношенията им, съвместните им действия, както и ефектите им върху различните клетъчни типове – бета клетки, клетки на имунната система и други с цел практическо приложение на откритията в профилактиката и лечението на автоимунния захарен диабет.

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Атанасова И., *Ендокринология, Раздел генетика и имунология на ендокринните заболявания*, под редакцията на проф. Б. Лозанов с. 62-69, 2000
2. Abdelaziz Amrani, Joan Verdagner, Shari Thiessen et al., IL-1a, IL-1b and gamma-IFN are in the base of Fas expression, leading to destruction through CD4+T lymphocytes. *Journal of Clinical Investments*, vol. 105, No.4, p459-468, February 2000
3. Abdelhakim Igssiar, Mohamed Hassan et al. Interleukin-11 inhibits NF-kB and AP-1 in islets and prevents diabetes induced with Streptozotocin in mice., *J. Experimental Biology and Medicine* 229, 425-436, 2004
4. Atkinson Mark A., S. Brian Wilson., Fatal attraction: chemokines and type 1 diabetes. *J. Clin. Invest.* 110: 1611-1613p 2002
5. Azar Sami T., Hala Tamim, Hayfa N. Beyhum et al., Type I diabetes is a Th1 and Th2-mediated autoimmune disease. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, vol. 6, No. 3, p 306-310, May 1999
6. Chong Mark, Ye Chen, Rima Darwiche et al., Suppressor of cytokine signaling-1 overexpression protects pancreatic beta cells from CD8+ T cells mediated autoimmune destruction. *J. of Immunology* 172, 5714-5721, 2004
7. Collier JJ., Fueger PT., et al. Pro- and antiapoptotic proteins regulate apoptosis but do not protect against cytokine-mediated cytotoxicity in rat islets and beta-cell lines. *Diabetes*, 55(5), 1398-1406, May 2006
8. Cytokines & diabetes, *Canadian journal of diabetes*, 28(1), 30-42, 2004
9. Daniel ML., G. Kwon, JR Hill et al., Cytokines and NO in islets inflammation and diabetes development. *J. Experimental Biology and Medicine*, vol 211, 24-32p, 1996
10. DiCosmo Bruno F., Dominic Picarella, Richard Ravell, Local production of IL-6 promotes insulinitis, but retards the onset of insulin-dependent diabetes mellitus in NOD mice. *International Immunology*, vol. 6, No 12, pp1829-1837, December 1994
11. Death by necrosis: The early stages of type 1 diabetes. *PLoS Medicine* 3(2): e51 DOI December 20, 2005
12. Fairweather DeLisa & Noel Rose, Type 1 diabetes: virus infection or autoimmune disease? *Nature immunology* 3, pp 338-340, 2002
13. Fraser Scott, Paul Rowsel et al., Oral exposure to diabetes-promoting food or immunomodulators in neonates alters gut cytokines and diabetes. *Diabetes* 51, 73-78, 2002
14. Gill B.M., A. Jaramillo, L.Ma et al. Genetic linkage of thymic T-cell proliferative unresponsiveness to mouse chromosome 11 in NOD mice. A possible role for chemokine genes. *Diabetes*, vol 44, pp 614-619, 1995
15. Jahromi M.M., B.A.Millward, A.G.Demaine, A polymorphism in the promoter region in the gene for IL-6 is associated with susceptibility to type 1 diabetes, *Journal of interferon and cytokine research*, vol 20, №10, pp885-888, oct. 2000
16. Kukrela Anjli, Noel K. MacLaren., Autoimmunity & diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 84, No.12, 4371-4377, 1999
17. Mayor Christofer, Cytokine and type 1 diabetes: Role of cytokine mediated signal transduction pathway in beta cell dysfunction. *University of Pennsylvania, PennLibrary*, 2000
18. Ortis Fernanda, Al. K. Cardozo et al., Cytokine-induced pro-apoptotic gene expression in insulin-producing cells is related to rapid, sustained and non-oscillatory NF-kB activation. *Molecular Endocrinology*, doi10.1210/me.2005-0268, march 17, 2006
19. Petrovsky N, D. Silva, L. Socha et al.. The role of Fas ligand in beta cell destruction in autoimmune diabetes of NOD mice. *Annals of New York Academy of Science* 958: 204-208, 2002
20. Savinov Al., A. Tcherepanov, E. A. Green et al., Contribution of Fas to diabetes development. *PNAS, January 21*, vol. 100, No.2, 2003
21. Seewaldt Sonja, Helen E. Thomas, Mette Ejrnaes et al., Virus-induced autoimmune diabetes. Most beta cells die through inflammatory cytokines and not perforin from autoreactive/anti-viral/ cytotoxic T-lymphocytes. *Diabetes*, vol 49, november 2000
22. Sternesjo Johny, Avhandlingar fran Upsala universitet. *Universitetsbibliotek, Doctoral thesis*, 1999
23. The SUMO-4 gene and type 1 diabetes, 12/7/2004, by *Medical College of Georgia*
24. Wen Yeshao, Jiali Gu, Shu-Lian li et al., Elevated glucose and diabetes promote IL-12 cytokine gene expression in mouse macrophages. *Endocrinology*, vol. 147, No.5, 2518-2525, 2006

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Д-р Христо Чалъков

Клиника по интензивна Токсикология и Алергология, ВМА-ВВМИ
Ул. „Св. Георги Софийски“ №3 София -1606
тел./02/9225026 моб. 089 8996479
E-mail - hristop63@abv.bg

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Hristo Petrov Chalakov, M.D.

Clinic of Toxicology, Military Medical Academy,
Sofia, Bulgaria, тел./02/9225026
моб. 089 8996479, E-mail - hristop63@abv.bg

Полиморфизъм на андрогенния рецептор в българската популация

Ралица Робева¹, Десислава Добрева², Алексей Савов²,
Анелия Томова¹, Филип Куманов¹

Клиничен център по ендокринология и геронтология, МУ – София¹

Лаборатория по молекулярна патология, СБАЛАГ „Майчин дом“, МУ – София²

Polymorphism of the Androgen Receptor in the Bulgarian Population

Ralitsa Robeva¹, Desislava Dobрева², Aleksey Savov², Anelia Tomova¹, Philip Kumanov¹

Clinical center of endocrinology and gerontology, MU – Sofia¹

Laboratory of molecular pathology, SBALAG „Maichin Dom“, MU – Sofia²

Резюме

Действието на андрогените в човешката физиология и патология се осъществява чрез андрогенния рецептор. Рецепторният полиморфизъм се определя от дължините на полиглициновата и полиглутаминовата верига в неговия вариабилен участък. Дължината на полиглутаминовата верига се кодира от различен брой CAG мотиви и е в отрицателна обратна зависимост с транскрипционната активност на рецептора. Нормалният брой на CAG мотивите варира в различните популации от 6 до 39, като показва съществени етнически различия.

Бяха изследвани общо 80 мъже и 35

Abstract

The key role of the androgens in the human physiology and pathology is exerted through the androgen receptor. The polymorphism of the receptor is determined by the length of the polyglutamine and polyglycin chains in its variable region. The number of the CAG repeats defines the length of the polyglutamine chain and is inversely associated with the transcriptional activity of the receptor. The normal CAG repeat number varies in the different populations between 6 and 39 and shows significant ethnical differences.

80 men and 35 women from bulgarian origin were investigated. The mean CAG repeat lengths were determined.

жени от български произход. Определена беше средната дължина на CAG повторенията.

При анализ на 150 X – хромозоми се установява, че средната дължина на CAG повторенията е $21,55 \pm 3,31$ (11-32). За българската популация полиморфизмът се характеризира с висока алелна хетерогенност, като средната дължина на триплетния мотив е по-малка от тази във френската, английската и някои скандинавски популации.

Към момента ролята на триплетния CAG полиморфизъм се свързва пряко с болестта на Kennedy и индиректно с рака на простатата, гърдата, дебелото черво и хранопровода, както и с някои страни на мъжкия инфертилитет. В настоящото проучване за първи път се описва полиморфизмът на андрогенния рецептор в българската популация като се прави сравнение между алелното разпределение у нас и в други европейски страни. Необходими са нови изследвания, които да посочат конкретната връзка между разпределението на CAG полиморфизма и тези заболявания в българската популация.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: андрогенен рецептор, полиморфизъм, инфертилитет, ПКЯБ.

Ключовата роля на андрогените в човешката физиология и патология се осъществява чрез андрогенния рецептор (AR). Най-голям афинитет към него проявява дихидротестостеронът, следван от тестостерона. Причина за това е по-бързата дисоциация на тестостерона от рецептора. Афинитетът на AR към адреналните андрогени /дехидроепиандростерон, андростендион/ и към неандрогенните стероиди /прогестерон, естрадиол/ е слаб (12).

Рецепторният полиморфизъм се определя от дължините на полиглициновата и полиглутаминовата верига във вариабил-

The analysis of 150 X-chromosomes showed that the mean CAG repeat length is $21,55 \pm 3,31$ (11-32). High allelic heterogeneity for this polymorphism has been observed in the Bulgarian population. The mean CAG repeat is shorter than those in French, English and some Scandinavian populations.

In currently the role of the CAG repeat polymorphism is related directly to the Kennedy disease and indirectly to the cancer of the prostate, breast, colon and esophagus, and some aspects of male infertility. In the present study we describe for the first time the androgen receptor polymorphism in Bulgarian population and make a comparison between ours and other European populations. Further investigations are needed in order to find the relationships between the androgen receptor polymorphism and these diseases in the Bulgarian population.

KEY WORDS: androgen receptor, polymorphism, infertility, PCOS.

ния участък на рецептора. Всеки глутаминов остатък се кодира в гена на AR, разположен в X хромозомата, чрез CAG триплетти. Те определят броя на глутаминовите остатъци в белтъчната верига, който е в отрицателна обратна зависимост с транскрипционната активност на рецептора. Нормалният брой на CAG мотивите варира в различните популации от 6 до 39, като показва съществени етнически различия (1).

Ролята на полиморфизма на андрогенния рецептор се изучава основно във връзка с простатната карциногенеза и ферти-

литета у мъже, както и като допълнителен фактор при състояния на хиперандрогения у жени. Значителното увеличение на САГ триплетите над 40 причинява т. нар. болест на Kennedy. Заболяването е с честота 1/40 000 мъже и се характеризира с бавно прогресираща мускулна слабост и атрофия, поради засягане на спинални и булбарни мотоневрони (10). Освен с типичните неврологични симптоми, болестта се извява и като неklasическа форма на умерената, късно започваща андрогенна резистентност (12). Най-честите ендокринни признаци са гинекомастия, намалена маскулинизация, тестикуларна хипотрофия и понижен фертилитет. Тези промени могат да предшестват с няколко години неврологичните и съответно да затруднят правилната диагноза (3). В настоящото проучване за първи път се описва полиморфизмът на андрогенния рецептор в българската популация като се прави сравнение между алелното разпределение у нас и в другите европейски страни.

Методи:

Мъже

Бяха изследвани 80 мъже между 18 и 58 години с нормален гонаден статус. Участниците бяха набрани сред пациенти с обезитет и артериална хипертония, както и сред здрави доброволци. Всички изследвани бяха с нормален гонаден статус. Поради голямата честота на хипогонадизма сред болните със затлъстяване в проучването бяха включени само пациенти с тестостерон над 8 pmol/l и нормални нива на гонадотропините.

Жени

Бяха изследвани 35 жени на възраст между 18 и 36 години. Критериите за включване в проучването бяха наличието на редовен менструален цикъл и овулация при липса на хирзутизъм.

Всички участници мъже и жени са от български етнически произход.

Генетичен анализ на полиморфния САГ мотив на андрогенния рецептор

За генетичния анализ беше използвана високомолекулна ДНК, изолирана чрез солева метод от незамразена венозна кръв, при работа с преситен разтвор на NaCl за преципитиране на белтъците. Изолираната от всеки пациент ДНК се използва за амплификация на полиморфния (САГ)_n участък в първи екзон на гена за андрогенен рецептор. PCR реакционната смес за една реакция с обем 10µl включваше: 1 µl ДНК 100 ng/µl; праймери 0,2 µl ARCAG F [5' TCCA-GAATCTGTTCCAGAGCGTGC 3' - 20 pmol/µl, (10)] и 0,2 µl ARCAG R [5' GCTGTGAAG-GTTGCTGTTCCCTCAT 3' - 20 pmol/µl, (10)], 0,4 µl MgCl₂ 50 mM, 1,00 µl буфер за термостабилна ДНК полимераза, 10X, 0,8 µl нуклеотид трифосфати 5mM, 0,05 µl Taq - полимераза 5U, 6,35 µl H₂O. Амплификацията беше осъществена чрез автоматична система при следните условия: начална денатурация - 5 мин при 95°C, 30 цикъла при денатурация - 94 °C за 1 мин., хибридизация - 60 °C за 35 сек. и синтез - 72 °C за 35 сек., последен етап на нарастване - 72 °C за 5 мин. Идентификацията на големината на PCR продуктите се извърши с помощта на молекулен маркер (100- 1000 н.г.). В настоящото изследване бяха подбрани 11 ДНК проби от пациенти от мъжки пол за секвениране и използване като контроли. Прямо тях бяха установени дължините на САГ повторенията при всички останали пациенти и от двете групи - мъже и жени, чрез разделяне на амплификационния ДНК продукт в денатуриращ полиакриламиден гел 6 % 19:1 АА:БАА със 7М урея. Секвенирането беше извършено с капиларен секвенатор ABI Prism 310 ABiosystems® (фиг.1). За обработка и отчитане на секвенционните резултати бяха използвани софтуерни продукти ABI Prism Data Collection, Sequencing Analysis 3.4.1®, ChromasPro®.

Етапите на провеждане на секвенирането включваха амплификация на екзон 1 на гена на андрогенния рецептор чрез PCR; тестване на амплификационния продукт; пречистване на продукта с ExoSAP®; секвениране с праймер F; преутаяване; гетек-

Фигура 1. Хроматограма на пациент N14782. Директното секвениране показва наличието на 28 CAG мотива при този пациент в 1 екзон на гена за андрогенния рецептор.

Figure 1. Chromatogram of the patient N 14782. Direct sequencing shows 28 CAG repeat length.

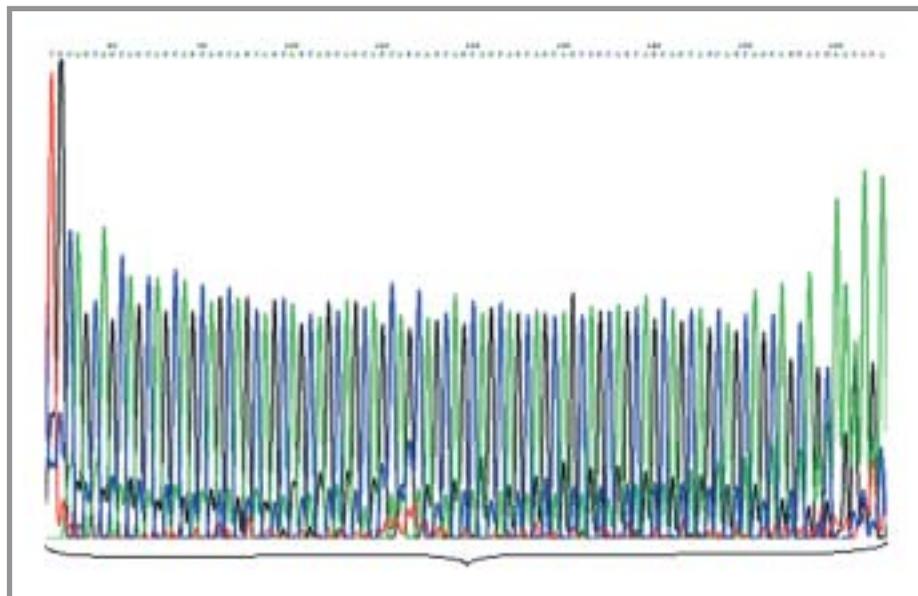


Таблица 1. Разпределение на честотата на повторяемостта на CAG триплетите сред български мъже.

Table 1. Distribution of the CAG repeats frequencies among Bulgarian men.

CAG	Честота Frequency	Процент %	CAG	Честота Frequency	Процент %	CAG	Честота Frequency	Процент %
14,00	1	1,3	20,00	14	17,5	26,00	2	2,5
15,00	1	1,3	21,00	16	20,0	27,00	2	2,5
16,00	2	2,5	22,00	7	8,8	28,00	2	2,5
17,00	2	2,5	23,00	8	10,0	29,00	2	2,5
18,00	3	3,8	24,00	7	8,8	32,00	1	1,3
19,00	4	5,0	25,00	6	7,5	Общо	80	100,0

ция на секвенционната реакция (ABI Prism 310, ABiosystems®) и разчитане на секвенционната реакция (фиг.1).

Резултати:

При изследваните мъже установихме, че честотата на CAG-мотива варира между 14 и 32, като средната стойност е $21,86 \pm 3,24$ (таблица 1). Най-голямо е разпространението на алелите с дължина 20 и 21, което е типично за бялата раса.

Поради наличието на две X хромозоми в групата на жените (35 изследвани) повто-

ренията на CAG срещнахме както в хомотака и в хетерозиготно състояние. Изчислихме средната стойност на дължините на CAG триплетите. Освен това за всяка жена определихме по-къс и по-дълъг алел, като разпределението на двата алела в популацията е представено на таблица 2.

Нашите данни показаха, че дължината на алелите при жени варира между 11 и 29. Средната стойност е $21,20 \pm 3,36$, а средните стойности за по-късия и по-дългия алел са съответно $19,40 \pm 2,97$ и $23,00 \pm 2,73$.

При анализ на всички изследвани инди-

Таблица 2. Алелно разпределение на CAG-триплетите у жени.

Table 2. Distribution of the CAG repeats alleles in women.

CAG-триплет (по-къс алел) CAG-repeat Short allele	Честота Frequency	Процент %	CAG-триплет (по-дълъг алел) CAG-repeat Long allele	Честота Frequency	Процент %
11,00	1	2,9	18,00	1	2,9
12,00	1	2,9	19,00	1	2,9
15,00	2	5,7	20,00	4	11,4
16,00	1	2,9	21,00	7	20,0
17,00	1	2,9	22,00	2	5,7
18,00	5	14,3	23,00	7	20,0
19,00	3	8,6	24,00	4	11,4
20,00	10	28,6	25,00	4	11,4
21,00	2	5,7	27,00	1	2,9
22,00	4	11,4	28,00	3	8,6
23,00	4	11,4	29,00	1	2,9
24,00	1	2,9			
	35	100,0		35	100,0

види установихме, че средната триплетна повтораемост е $21,55 \pm 3,31$. Сравнение с финландската популация е показано на фиг. 2, а със средиземноморските страни на таблица 3.

Обсъждане

Ролята на андрогенния рецептор (AR) се изучава активно в последните 10 години. Множество епидемиологични проучвания показват, че андрогенният полиморфизъм може да повлияе риска и прогресията на простатния карцином у мъже. Броят на CAG триплетите е най-малък при афроамериканците, среден при бялата раса и най-голям при азиатците. Честотата на простатния карцином е обратнопропорционална в тези три расови групи. По-късата CAG последователност се свързва с по-ранна изява на заболяването, като обаче съществуват изразени етнически различия (9). В този смисъл е важно да се уста-

нови разпределението на алелната честота сред конкретната популация и да се селектират мъжете с повишен риск. Освен това определянето на полиморфизма при мъже има клинично значение, тъй като той модулира андрогенизацията. При мъжете с по-дълга рецепторна полиглютаминава верига се наблюдава по-слаб андрогенен ефект в сравнение с мъже със сходни нива на тестостерона. Следователно при лечение на хипогонадни пациенти с тестостерон би трябвало да се отчита и индивидуалната чувствителност, т. е. андрогенния полиморфизъм (20).

Ролята на CAG полиморфизма при жените в сравнение с мъжете е по-слабо проучен, най-вече поради наличието на два гена за AR, от които в различните тъкани е активен само единия. Пациентките рядко са хомозиготни по този алел, което затруднява интерпретацията на генетичния анализ. Често използвани методики за ре-

Таблица 3. Характеристики на разпределението на CAG мотива сред някои Средиземноморски популации (по Esteban et al., 2006) и у българи.

Table 3. Characteristics of the CAG repeat distribution among different Mediterranean populations /Esteban et al., 2006/ and in Bulgarians.

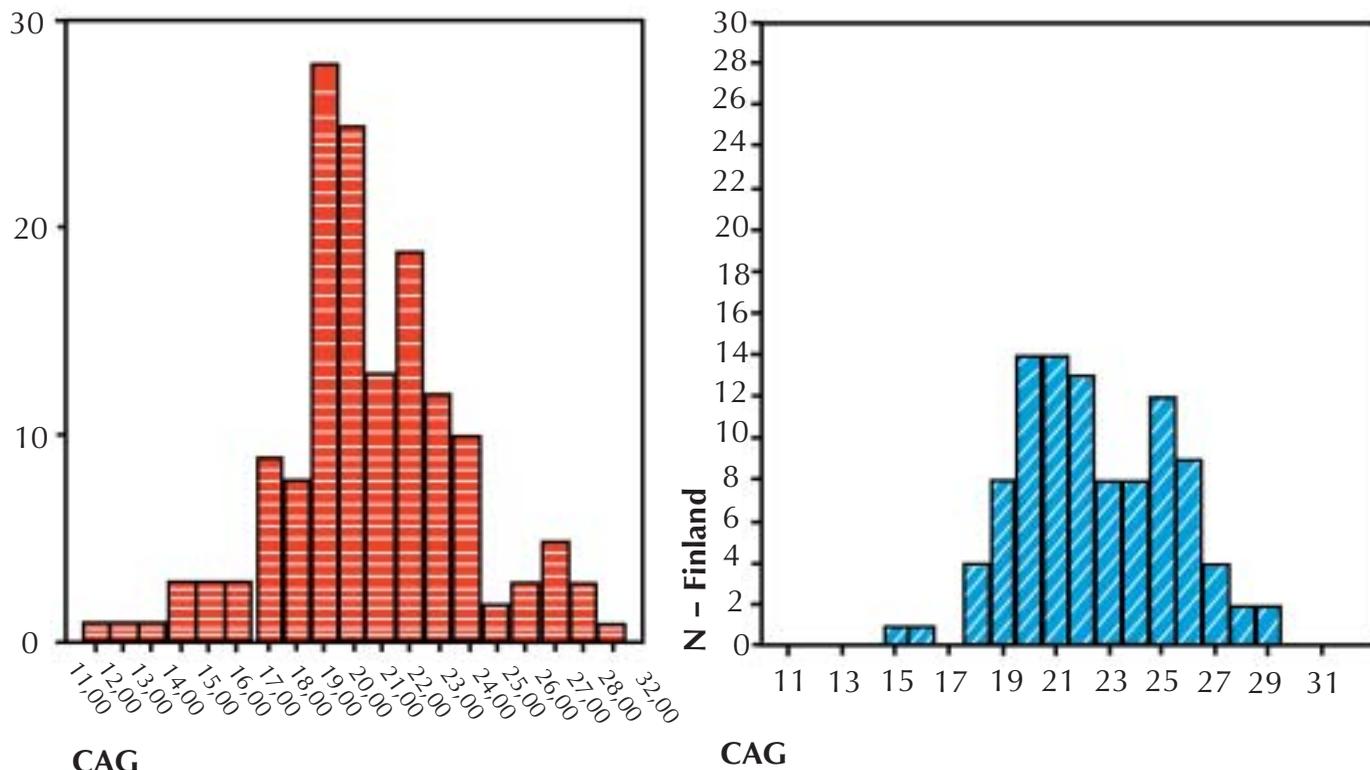
Област Region	N	CAG (средна ст.) Mean	CAG (медиана) Median	Вариация Variance	CAG <19	CAG /19-21/ CAG>21	CAG>21
България Bulgaria	150	21,55 (11-32)	21	10,93	14%	40,67%	45,33%
Южна Испания South Spain	112	22,25 (14-31)	22	9,28	6,25%	39,28%	54,47%
Баски Basque	62	21,42 (15-27)	21	5,07	6,45%	45,16%	48,39%
Северна Испания North Spain	105	21,89 (14-31)	21	7,01	3,81%	47,61%	48,58%
Сардиния (центр. част) Inner Sardinia	68	21,84 (14-28)	22	8,76	11,76%	33,82%	54,42%
Сардиния (брегова част) Coast Sardinia	85	21,39 (16-29)	21	8,31	12,94%	42,35%	44,71%
Гърция Greece	66	21,33 (16-26)	21	5,03	7,57%	45,45%	46,98%
Турция Turkey	149	22,59 (14-31)	22	5,97	3,35%	34,23%	62,42%
Берберу (Египет) Berbers/Egypt	81	20,58 (14-30)	20	10,37	35,80%	20,98%	43,22%
Берберу (Алжир) Berbers/Algerian	74	21,11 (14-26)	21	7,39	17,56%	35,13%	47,31%
Бряг на Слоновата кост Ivory coast	89	19,13 (14-24)	19	5,91	35,95%	50,56%	13,49%

шение на проблема са определянето на активната X хромозома и изчисляването на осреднена CAG дължина. При жени полиморфизмът на AR се свързва не само с хиперандрогенните състояния, но и с някои туморни образувания (13). Тези данни по-

казват необходимостта от генетичен анализ на полиморфния CAG мотив на андрогенния рецептор сред етнически българи, което е и целта на настоящото проучване.

Фигура 2. Разпределение на честотите на CAG алелите в българската и финландската популация (по Lund et al., 2000). N-брой българи със съответна дължина на CAG мотива; N-Finland- брой финландци със съответна дължина на повторенията на CAG.

Figure 2. Distribution of the CAG repeat lengths in the Bulgarian and Finland populations /Lund et al., 2000/.



Данните за българската популация показват много висока степен на полиморфност на изследваната триплетна последователност, като ние установихме 19 различни алела в групата. При сравнение на разпределението на алелите с данните от други популации прави впечатление, че средната дължина на повторенията е значимо по-къса у нас ($n=150$; $21,55 \pm 3,31$ [11-32]) в сравнение с полската популация ($n=200$; $22,25 \pm 2,73$ [16-30], $p=0,031$) и изследвана обща скандинавска група /шведски, датски и финландски етнически контроли/ ($n=142$; $22,37 \pm 2,93$ [15-29], $p=0,026$) (16, 11). В голяма английска контролна група също се намира по-дълга средна алелна дължина - 23 (4). Обаче в друго проучване сред 213 финландци се установява средна дължина

на повторенията $22 \pm 2,7$, като данните не се различават значимо от тези у българите ($p > 0,05$). Мъжете са набрани сред граждани, живеещи в района на Турки, но не се посочва дали всички те са от финландски етнически произход (6). Изследване сред датски мъже също показва дължина на триплетта почти еднаква с българската $21,8 \pm 3,4$ (14). При друго проучване на 47 пациента от турски етнически произход с доказан фертилитет се намира средна честота съответно $22,41 \pm 0,54$ /16-29/, като разликата не достига статистическа значимост, вероятно поради малкия брой изследвани (18).

Българските жени имат значимо по-дълъг триплет от този при здрави нехирзутидни жени от италиански етнически про-

изход /21,20 ± 3,36 vs. 13,85±0,64, p<0,001/ (19). В сравнение с финландско проучване върху здрави жени и такива с поликистозна яйчникова болест се установяват сходни средни дължини на CAG мотива (21,2 vs. 21,5). Сред здравите финландки, обаче не се срещат алели под 16 триплета, докато 5,1 % от здравите българки са с алелна дължина 11-15 мотива (8). Дължината на алела сред контролна група момичета от Барселона е 22,0, като прави впечатление двойно по-ниската честота на къси алели /CAG≤20/ – 24,6 % в сравнение с българската контролна група – 42,9 %, което се дължи на преобладаващата честота на CAG=20 сред българките (7). В сравнение с френски жени също се установява значимо по-малък брой триплети /21,20 ± 3,36 vs. 22,4±2,6, p<0,001/ (15). Друго испанско проучване обаче показва по-ниска от българската дължина на алелите сред здрави контроли-17±3 (2). Смуцаващите разлики в двете испански проучвания могат да се свържат с разликите в набирването на двете контролни групи. В първото проучване за здрави се приемат момичета без преждевременно пубархе (поява на пубисно окосмяване преди 8 годишна възраст), които обаче са набирани сред деца с нисък ръст (10-25 перцентил) и такива претърпели леки хирургични манипулации или гинекологичен преглед в болничните отделения (7). Във второто проучване контролната група се състои от испански жени с нормален менструален цикъл, без хирзутизъм, като тази група е много по-близка до нашите критерии за подбор и съответно е по-уместно сравнение с нея (2).

Данните показват, че в българската популация полиморфизмът на андрогенния рецептор се характеризира с висока алелна хетерогенност (19 алела) с дължини от 11-32 триплета, като средната дължина на триплетните повторения е по-малка от тази във френската, английската и полската популации, докато данните за скандинавските страни са противоречиви.

Esteban и сътр., 2006 разглеждат поли-

морфизма на андрогенния рецептор при няколко Средиземноморски популации и етническа група от Брега на Слоновата кост, като акцентират върху различното разпределение на по-късите алели, които се свързват най-вече с повишен риск от рак на простатата (таблица 3) (5). За българската популация е характерна изразената вариабилност и относително голямата честота на по-къси алели в сравнение с другите южно-европейски страни.

Към момента ролята на триплетния CAG полиморфизъм се свързва пряко с болестта на Кенеди (спинална и булбарна мускулна атрофия) и индиректно с рака на простатата, гърдата, дебелото черво и хранопровода, както и с някои страни на мъжкия инфертилитет (17). Необходими са нови изследвания, които да посочат конкретната връзка между разпределението на CAG полиморфизма и тези заболявания в българската популация.

Авторите изказват своята искрена благодарност към МОН за предоставеното финансиране по проект Л-1504/2005.

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Робева, Р., Ф., Куманов. Полиморфизъм на андрогенния рецептор - физиологични и клинични аспекти. *Съвр. Мед.*, 57, 2006, 4, 50-57.
2. Calvo, R., M. Asuncion, J. Sancho, J.L. San Millan, H.F. Escobar-Morreale. The role of the CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene and of the skewed X-chromosome inactivation in the pathogenesis of hirsutism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85, 2000, 1735-1740.
3. Dejager, S., H. Bry-Gauillard, E. Bruckert, B. Eymard, F. Salachas, E. LeGuern, S. Tardieu, R. Chadarevian, P. Giral, G. Turpin. A comprehensive endocrine description of Kennedy's disease revealing androgen insensitivity linked to CAG repeat length. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 8, 2002, 3893-3901.

4. Dunning, A.M., S. McBride, J. Gregory, F. Durocher, N.A. Foster, C.S. Healey, N. Smith, P.D. Pharoah, R.N. Luben, D.F. Easton, B.A. Ponder. No association between androgen or vitamin D receptor gene polymorphisms and risk of breast cancer. *Carcinogenesis*, 20, 1999, 11, 2131-2135.
5. Esteban, E., N. Rodon, M. Via, E. Gonzalez-Perez, J. Santamaria, J.M. Dugoujon, F.E. Chennawi, M. Melhaoui, M. Cherkaoui, G. Vona, N. Harich, P. Moral. Androgen receptor CAG and GGC polymorphisms in Mediterraneans: repeat dynamics and population relationships. *J. Hum. Genet.*, 51, 2006, 2, 129-136.
6. Harkonen, K., I. Huhtaniemi, J. Makinen, D. Hubler, K. Irjala, M. Koskenvuo, M. Oettel, O. Raitakari, F. Saad, P. Pollanen. The polymorphic androgen receptor gene CAG repeat, pituitary-testicular function and andropausal symptoms in ageing men. *Int. J. Androl.*, 26, 2003, 3, 187-194.
7. Ibanez, L., K.K. Ong, N. Mongan, J. Jaaskelainen, M.V. Marcos, I.A. Hughes, F. De Zegher, D.B. Dunger. Androgen receptor gene CAG repeat polymorphism in the development of ovarian hyperandrogenism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88, 2003, 7, 3333-3338.
8. Jaaskelainen, J., S. Korhonen, R. Voutilainen, M. Hippelainen, S. Heinonen. Androgen receptor gene CAG length polymorphism in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.*, 83, 2005, 6, 1724-1728.
9. Jiang, M., I. Huhtaniemi. Polymorphisms in androgen and estrogen receptor genes: effects on male aging. *Exp. Gerontol.*, 39, 2004, 1603-1611.
10. La Spada, A.P., E.M. Wilson, D.B. Lubahn, A.E. Harding, K.H. Fischbeck. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*, 352, 1991, 77-79.
11. Lund, A., B. Udd, V. Juvonen, P.M. Andersen, K. Cederquist, L.O. Ronnevi, P. Sistonen, S.A. Sorensen, L. Tranebjaerg, C. Wallgren-Pettersson, M.L. Savontaus. Founder effect in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) in Scandinavia. *Eur.J.Hum.Genet.*, 8, 2000, 631-636.
12. Quigley, C.A., A. De Bellis, K.B. Marschke, M.K. El-Awady, E.M. Wilson, F.S. French. Androgen receptor defects: historical, clinical and molecular perspectives. *Endocr. Rev.*, 16, 1995, 271-332.
13. Rajender, S., L. Singh, K. Thangaraj. Phenotypic heterogeneity of mutations in androgen receptor gene. *Asian. J. Androl.*, 9, 2007, 2, 147-179.
14. Rajpert-De Meyts, E., H. Leffers, J.H. Petersen, A.G. Andersen, E. Carlsen, N. Jorgensen, N.E. Skakkebaek. CAG repeat length in androgen-receptor gene and reproductive variables in fertile and infertile men. *Lancet*, 5, 2002, 359(9300), 44-46.
15. Retornaz, F., F. Paris, S. Lumbroso, F. Audran, F. Tigoulet, C. Michelon, C. Jeandel, C. Sultan, H. Blain. Association between androgen receptor gene polymorphism and bone density in older women using hormone replacement therapy. *Maturitas*, 55, 2006, 4, 325-333.
16. Sulek, A., D. Hoffman-Zacharska, W. Krysa, W. Szirkowiec, E. Fidzianska, J. Zaremba. CAG repeat polymorphism in the androgen receptor (AR) gene of SBMA patients and a control group. *J. Appl. Genet.*, 46, 2005, 2, 237-9.
17. The Androgen Receptor Gene Mutations Database. <http://www.androgendb.mcgill.ca>
18. Tufan, A.C., N.L. Satiroglu-Tufan, B. Aydinuraz, M.H. Satiroglu, K. Aydos, H. Bagci. No association of the CAG repeat length in exon 1 of the androgen receptor gene with idiopathic infertility in Turkish men: implications and literature review. *Tohoku. J. Exp. Med.*, 206, 2005, 2, 105-115.
19. Vottero, A. C. Stratakis, L. Ghizzoni, C.A. Longui, M. Karl, G.P. Chrousos. Androgen receptor-mediated hypersensitivity to androgens in women with nonhyperandrogenic hirsutism: skewing of X-chromosome inactivation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 1999, 1091-1095.
20. Zitzmann, M. Mechanisms of disease: pharmacogenetics of testosterone therapy in hypogonadal men. *Nat. Clin. Pract. Urol.*, 4, 2007, 3, 161-166.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

г-р Ралица Робева

Клиничен Център по Ендокринология
София 1303
Ул. „Даме Груев“ 6-8,
e-mail: rali_robewa@yahoo.com

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Dr. Ralitsa Robeva

Clinical Center of Endocrinology
Bulgaria, Sofia 1303
6, Dame Grouev Str.
e-mail: rali_robewa@yahoo.com

Съвременни критерии за диагноза на захарен диабет: препоръки на СЗО (2006)

Цветалина Танкова

Клиника по Диабетология, Клиничен Център по Ендокринология,
Медицински Университет, София

Current Criteria for the Diagnosis of Diabetes Mellitus: 2006 WHO Recommendations

Tsvetalina Tankova

Department of Diabetology, Clinical Center of Endocrinology, Medical University, Sofia

Резюме

През 2006г. СЗО публикува последните си препоръки за диагноза на захарен диабет. Според тях се запазват настоящите критерии за диагноза на захарен диабет: плазмена глюкоза на гладно $\geq 7,0$ mmol/l или плазмена глюкоза на 2-я час при ОГТТ $\geq 11,1$ mmol/l. Не се променя определението за нарушен глюкозен толеранс (НГТ): плазмена глюкоза на гладно $< 7,0$ mmol/l и плазмена глюкоза на 2-я час при ОГТТ $\geq 7,8$ и $< 11,1$ mmol/l. Препоръчва се долната граница за нарушена гликемия на гладно (НГГ) да остане $6,1$ mmol/l и за тази категория да се приема плазмена глюкоза на гладно от $6,1$ до $6,9$ mmol/l и (ако е измерена) плазмена глюкоза на 2-я час при ОГТТ $< 7,8$ mmol/l. СЗО препоръчва означаването на НГГ и НГТ с понятието интермедиерна хипергликемия. Препоръчва се тези две категории да бъдат заменени от цялостна оценка на риска

Abstract

WHO published in 2006 the current recommendations for the diagnosis of diabetes mellitus. The current WHO diagnostic criteria for diabetes are maintained – fasting plasma glucose $\geq 7,0$ mmol/l or 2-h plasma glucose $\geq 11,1$ mmol/l. The definition for impaired glucose tolerance (IGT) is maintained for the present – fasting plasma glucose $< 7,0$ mmol/l and 2-h plasma glucose $\geq 7,8$ and $< 11,1$ mmol/l. The fasting plasma glucose cut-point for impaired fasting glucose (IFG) has remained at $6,1$ mmol/l and IFG is defined as fasting plasma glucose between $6,1$ and $6,9$ mmol/l and (if measured) 2-h plasma glucose $< 7,8$ mmol/l. WHO recommends using the term intermediate hyperglycaemia to describe the two states – IFG and IGT. Consideration should be given to replacing these categories of intermediate hyperglycaemia by an overall risk assessment for diabetes, cardiovascular disease, or both, which should

от диабет, сърдечно-съдово заболяване, или и двете, която да включва и измерване на глюкоза като продължителна променлива. Венозната плазмена глюкоза трябва да е стандартен метод за измерване и означаване на концентрацията на глюкоза в кръвта. ОГТТ трябва да се запази като диагностичен тест; препоръчва се провеждането му при лица с плазмена глюкоза на гладно 6,1-6,9 mmol/l. Понастоящем HbA_{1c} не се приема за подходящ диагностичен тест за захарен диабет или интермедиерна хипергликемия.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: захарен диабет, диагноза, нарушена гликемия на гладно, нарушен глюкозен толеранс, ОГТТ

Захарният диабет е хронично социално-значимо заболяване, което се превръща в световна епидемия. Понастоящем има данни за 246 милиона души със захарен диабет по света, като ежегодно броят им се увеличава с около 7 милиона. Тревожна статистика показва, че около половината от хората с диабет не знаят, че имат това заболяване. Ето защо своевременното поставяне на диагнозата захарен диабет е от изключителна важност.

Световната Здравна Организация (СЗО) е публикувала неколkokратно досега Технически Доклади с препоръки за диагноза на захарния диабет – през 1965, 1980, 1985, 1999 и 2006 г. (25,26).

През последните години се натрупват допълнителни данни, свързани с диагнозата на захарния диабет. През 2003 г. Американската Диабетна Асоциация (ADA) преразглежда собствените си критерии за диагноза на захарен диабет, като препоръчва снижаване на долната граница за нарушена гликемия на гладно и препоръчва плазмената глюкоза на гладно за диагноза на асимптоматичен диабет, докато СЗО препоръчва оралния глюкозо-толерансен тест (ОГТТ) (20). Всичко това налага създаването

include a measure of glucose as a continuous variable. Venous plasma glucose should be the standard method for measuring and reporting glucose concentration in blood. The oral-glucose-tolerance test (OGTT) should be retained as a diagnostic test; it should be used in individuals with fasting plasma glucose 6,1-6,9 mmol/l. Currently HbA_{1c} is not considered a suitable diagnostic test for diabetes or intermediate hyperglycaemia.

KEY WORDS: diabetes mellitus, diagnosis, impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance, OGTT

през м. ноември 2005г. на съвместна работна група на СЗО и Международната Диабетна Федерация (IDF), която има за цел да анализира и да актуализира действащите дотогава Препоръки на СЗО за определение, диагноза и класификация на захарния диабет и неговите усложнения, публикувани през 1999 г. (25). Последните препоръки са публикувани в края на 2006 г. (26).

През 1999г. СЗО утвърждава четири основни степени на глюкозен толеранс – нормален глюкозен толеранс, нарушена гликемия на гладно (НГГ), нарушен глюкозен толеранс (НГТ) и захарен диабет, които са обстойно анализирани в препоръките от 2006 г. (25).

Нормален глюкозен толеранс

СЗО (2006) приема следните критерии за нормален глюкозен толеранс:

плазмена глюкоза на гладно < 6,1 mmol/l
и
плазмена глюкоза на 2-я час при ОГТТ < 7.8 mmol/l

Има редица проблеми при определяне на нормалните стойности на плазмена глю-

коза – трудно е да се постави конкретна граница между норма и патология по отношение на продължителна променлива. Нещо повече, и други фактори, като възраст, пол и етническа принадлежност, също имат отношение към определяне на нормалните стойности. Редица популяционни проучвания са установили връзка между нивото на плазмена глюкоза и риска от смъртност, сърдечно-съдово заболяване и развитие на захарен диабет (8, 18, 23). Тези проучвания, обаче, не са осигурили дефинитивен отговор на въпроса коя стойност на плазмена глюкоза трябва да се счита за нормална. Приемането на границата от 6.1 mmol/l като горна граница за нормогликемия от СЗО се базира на факта, че над тази стойност са наблюдавани загуба на първа фаза на инсулинова секреция в отговор на венозно обременяване с глюкоза, както и прогресивно нарастване на риска от развитие на микро- и макроваскуларни усложнения (19, 25).

Ясно е, обаче, че рискът от диабет и сърдечно-съдови заболявания е най-нисък при стойности на плазмена глюкоза, които най-често се срещат при видимо здрави лица. Ето защо терминът „нормогликемия“ трябва да се използва за нива на глюкоза, които са свързани с нисък риск от развитие на диабет и сърдечно-съдови заболявания, т.е. нива под тези използвани за определяне на НГГ.

Нарушена гликемия на гладно

Понятието нарушена гликемия на гладно е въведено през 1997г. от Експертен Комитет на Американската Диабетна Асоциация (19) и е прието от СЗО през 1999г. за означаване на зоната между горната граница на нормалната плазмена глюкоза на гладно и долната граница на плазмената глюкоза на гладно при захарен диабет (25). НГГ се отнася за стойности на плазмена глюкоза на гладно между 6,1 и 6,9 mmol/l. НГГ не е клинична единица, но е рисков фактор за бъдещо развитие на диабет и сърдечно-съдови заболявания. Редица проучва-

ния са установили, че нарушената гликемия на гладно е свързана с нарушена инсулинова секреция и нарушена супресия на ендогенната чернодробна глюкозна продукция (1). Честотата на НГГ варира в различните популации и възрастни групи, като най-често е около 5%. Среща се по-често при мъже. През 2003 г. ADA предлага снижаване на долната граница за НГГ от 6,1 на 5.6 mmol/l (20), с което честотата на НГГ нараства 2-3 пъти. Съществува линейна зависимост между плазмена глюкоза на гладно и риск от захарен диабет и сърдечни инциденти, поради което определянето на конкретна стойност е до известна степен условно (2). Ето защо, би трябвало да се имат предвид други фактори - сърдечно-съдови заболявания и смъртност, изява на захарен диабет, възможности за превенция, рисков профил на индивидите, влияние върху честотата на НГГ, икономически аспекти, отношение към здравните власти и политика. През 2006г. СЗО не приема предложението на ADA за снижаване на долната граница за НГГ поради липса на сериозни доказателства за ползата от това (26).

СЗО (2006) приема следните критерии за нарушена гликемия на гладно:

плазмена глюкоза на гладно 6,1 до 6,9 mmol/l

и (ако е изследвана)

плазмена глюкоза на 2-я час при ОГПТ < 7,8 mmol/l

Нарушен глюкозен толеранс

Понятието нарушен глюкозен толеранс е въведено през 1979г. от US National Diabetes Data Group с цел да се обозначи състояние с повишен риск от прогресиране към захарен диабет, въпреки че е отбелязано още тогава, че много от тези индивиди ще се върнат към нормален глюкозен толеранс (16). НГТ е признат от СЗО през 1980г. Той не е клинична единица, но е рисков фактор за бъдещ диабет и сърдечно-съдови заболявания. Редица проучвания са

установили, че НГТ е свързан с мускулна инсулинова резистентност и нарушена инсулинова секреция (1). Честотата му варира, но най-общо е около 10 % от възрастното население. Среща се по-често при жени. Честотата му нараства с възрастта. В проучването DECODE е установено нарастване на честотата на НГТ от 2,9 % при 30-39-годишни мъже на 15,1% при 70-79-годишни мъже и от 4,5 % на 16,9 % при съответните възрастови групи при жените (10). С установената връзка между постпрандиална кръвна захар и сърдечно-съдов риск се отдава все по-голямо внимание на нарушения глюкозен толеранс. Постпрандиалната хипергликемия води до редица нарушения – ендотелна дисфункция, повишена тромбогенеза, намалена фибринолиза, повишени молекули на адхезия, неензимно гликиране на протеини, окислителен стрес.

СЗО (2006) запазва настоящите критерии за нарушен глюкозен толеранс:

плазмена глюкоза на гладно < 7,0 mmol/l
и

плазмена глюкоза на 2-я час при ОГТТ
≥ 7,8 и <11,1 mmol/l

Границата от 7,8 mmol/l е приета на базата на проучвания, проведени при индианци Пима (4). Въпреки, че данните в подкрепа на тази стойност са ограничени, настоящата граница изглежда адекватна. Трябва да се има предвид, обаче, че рискът от бъдещ диабет, преждевременна смъртност и сърдечно-съдови заболявания започва да нараства при стойности на 2-я час в хода на ОГТТ под посочваната граница за НГТ (8). Тъй като смисълът от обозначаването на тази категория е да се определи рискът от диабет и/или сърдечно-съдово заболяване и преждевременна смъртност, по-логичният подход би трябвало да включва въвеждане на рисков индекс, съчетаващ известните рискови фактори, включително и нивото на плазмената глюкоза.

Съществуват различни определения, обединяващи НГТ и НГТ – преддиабет, латентен диабет, скрит диабет, лек диабет, на

чалан диабет. През 2004г. ADA предложи понятието преддиабет, а през 2005г. Международната Диабетна Федерация препоръча поставянето на преддиабет в кавички – „преддиабет“. Тези две състояния са свързани с повишен риск от развитие на захарен диабет, но не всички индивиди с преддиабет развиват диабет през живота си. Данните от редица проучвания показват, че чрез промяна в начина на живот или чрез приложение на редица медикаменти (метформин, акарбоза, орлистат, тиазолидиндиони) е възможно обратно развитие на НГТ и НГТ и превенция на преход към захарен диабет (6, 21, 22, 24).

При нарушен глюкозен толеранс рискът от прогресиране към диабет е 6-кратно по-висок в сравнение с нормален глюкозен толеранс (14). За период от 5 години е установена изява на диабет при 24 % от лицата с НГТ спрямо 4 % при лица с нормален глюкозен толеранс. Нещо повече, наблюдаван е 1,48 пъти по-висок риск от фатални сърдечно-съдови инциденти при НГТ в сравнение с нормален глюкозен толеранс (14).

При нарушената гликемия на гладно е установен 4,7 пъти по-висок риск от прогресиране към диабет в сравнение с нормален глюкозен толеранс (10). Рискът от нефатален миокарден инфаркт, нефатално сърдечно-съдово заболяване, сърдечно-съдова смъртност и обща смъртност е 1,19-1,28 пъти по-висок при НГТ в сравнение с лица с нормален глюкозен толеранс (14).

Има доказателства, че сърдечно-съдовият риск предшества с около 15 години изявата на захарния диабет. Установена е увеличена дебелина на интима-медия при лица с НГТ спрямо лица с нормален глюкозен толеранс. Има данни за наличие и на други усложнения при състоянията НГТ и НГТ – нефропатия с дифузно задебеляване на гломерулната базална капилярна мембрана; невропатия с миелинна дисфункция на дисталните сетивни фибри и нарушена скорост на нервна проводимост; ретинопатия. Ето защо през 2006г. СЗО предлага

НГГ и НГТ, като състояния между нормален глюкозен толеранс и захарен диабет, да се означават с понятието интермедиерна хипергликемия (26). При обозначаването им като „преддиабет“ се посочва само връзката на тези състояния с диабет, като се отклонява вниманието от значимо повишения при тях сърдечно-съдов риск. Освен това много от хората с НГГ и НГТ не прогресират към диабет. Това налага да се направи преоценка на използването на понятията НГГ и НГТ. Определянето на специфични нива за интермедиерна хипергликемия може би не е най-подходящия начин за определяне на бъдещия риск от диабет и сърдечно-съдови заболявания. Рискът би могъл по-добре да се оцени чрез прилагане на предиктивни индекси, които включват и други рискови фактори в допълнение към плазмената глюкоза.

Захарен диабет

Има съществена разлика по отношение на това дали се поставя диагноза захарен диабет с цел да се определи даден индивид като такъв с диабет, с последващите от това клинични и социални аспекти на заболяването, или се поставя диагноза диабет с епидемиологична цел. В първия случай поставянето на диагнозата налага повторно изследване в друг ден, освен в случаите, когато има изразени симптоми на диабет или плазмената глюкоза е прекомерно висока. В епидемиологичните проучвания рядко се провежда повторно изследване. При провеждането на повторно изследване, обичайно при около 75 % от хората с диабет, открит при епидемиологични изследвания, се потвърждава диагнозата захарен диабет (7, 15).

През 2006г. СЗО запазва настоящите критерии за диагноза на захарен диабет:
плазмена глюкоза на гладно $\geq 7,0$ mmol/l
или
плазмена глюкоза на 2-я час при ОГТТ $\geq 11,1$ mmol/l

Не е необходимо задължително да са налице и двата критерия; единият от тях

е достатъчен за поставяне на диагноза захарен диабет. Трябва да се има предвид, че лицата, диагностицирани на базата на плазмена глюкоза на 2-я час в хода на ОГТТ, са с по-лоша прогноза в сравнение с лицата, диагностицирани на базата само на плазмена глюкоза на гладно. Установено е, че рискът от смъртност при тях е 2,7 пъти по-висок при мъже и 2 пъти по-висок при жени спрямо лица, диагностицирани само на базата на плазмена глюкоза на гладно (17).

Диагностични тестове за определяне на гликемичния статус

Измерване на глюкозата в кръвта

Определянето на нивото на плазмена глюкоза е основен диагностичен критерий за захарен диабет и интермедиерна хипергликемия.

Нивото на глюкозата, измерена в плазма, е с около 11 % по-високо от нивото на глюкозата, измерена в цяла кръв. Тази разлика зависи от хематокрита и нараства до 15 % при хематокрит 0,55 и намалява до 8 % – при хематокрит 0,30 (12). Според препоръките на Международната Федерация по Клинична Химия (IFCC) всички портативни уреди за измерване на кръвна захар трябва да са калибрирани да дават стойности за плазма, а не за цяла кръв (11).

Разлики по отношение на измерванията могат да възникнат и поради различно място на вземане на кръвна проба. Венозните и капилярните проби дават еднакви резултати при състояния на гладно. При състояния, които не са на гладно, обаче, капилярната кръв дава по-високи резултати от венозната (5):

венозна плазмена глюкоза	капилярна плазмена глюкоза
7,8 mmol/l	8,9 mmol/l
11,1 mmol/l	12,2 mmol/l

Обработването на пробите след вземането на кръвта е важно с оглед на точността на измерване на плазмената глюкоза. Необходимо е бързо сепариране на плазмата след вземането на кръвта (в рамки-

те на минути). Вземането на кръв в епруветка с гликолитичен инхибитор (напр. NaF) е отчасти ефективно. Минимално изискване е епруветката да се постави незабавно след вземането на кръвта и преди отделянето на плазмата в лед, като в тези случаи сепарирането на плазмата трябва да стане в рамките на 30 минути. Тъй като на инхибиторите на гликолизата им трябва време, за да проникнат в еритроцитите, само с непосредственото сепариране на плазмата ще се избегне известно снижаване на нивото на глюкозата в пробата (5).

Венозната плазмена глюкоза трябва да е стандартния метод за измерване и означаване на концентрацията на глюкоза в кръвта. При използване на капиларна кръв, особено в страни с ограничени ресурси, трябва да се има предвид коригиращ фактор за стойностите след обременяване.

Орален глюкозо-толерансен тест (ОГТТ)

Приложението на ОГТТ за клинични и епидемиологични цели е спорно. Тестът определено се препоръчва от СЗО (25, 26), докато ADA не го препоръчва за диагностични цели в клиничната практика; в такива случаи се дава приоритет на плазмената глюкоза на гладно (20). Редица проучвания са установили, че чрез плазмена глюкоза на гладно и чрез плазмена глюкоза на 2-я час при ОГТТ не се идентифицират едни и същи лица със захарен диабет. В проучването DECODE, от 1517 души с новооткрит захарен диабет, 40 % са отговорили на критериите за плазмена глюкоза на гладно, 31 % – на критериите за плазмена глюкоза на 2-я час при ОГТТ и 28 % и на двата критерия (9). Поради това, с използването само на плазмена глюкоза на гладно, ще се пропусне диагнозата при около 30 % от хората с диабет. Този процент се оказва по-висок при по-възрастното население. Установено е, че при 70% от жените и 48% от мъжете на възраст между 50 и 89 години, диагнозата захарен диабет се поставя само на базата на стойността на плазме-

ната глюкоза на 2-я час при ОГТТ (3). Има доказателства, че лицата, диагностицирани на базата на плазмена глюкоза на 2-я час в хода на ОГТТ, са с по-лоша прогноза от диагностицираните на базата на плазмената глюкоза на гладно (17). Поради това ОГТТ има място при диагнозата на захарния диабет, тъй като дава възможност за откриване на 30 % от хората с диабет. Нещо повече, НГТ може да се установи само с помощта на ОГТТ.

СЗО препоръчва запазването на ОГТТ като диагностичен тест. Той често е необходим за потвърждаване или изключване на нарушение на глюкозния толеранс при асимптоматични лица. СЗО препоръчва провеждане на ОГТТ при лица с плазмена глюкоза на гладно 6,1-6,9 mmol/l, за да се определи степента на глюкозен толеранс при тях.

Гликиран хемоглобин (HbA_{1c})

Гликираният хемоглобин отразява средната плазмена глюкоза за предишните 2-3 месеца в еднократно измерване, което може да бъде проведено по всяко време на деня и не налага специална подготовка, напр. гладуване. Той е златния стандарт за оценка на гликемичния контрол при хора със захарен диабет. Възниква въпросът относно възможността за приложение на този тест за оценка на глюкозния толеранс при хора с недиагностициран диабет. Въпреки че в референтните лаборатории по света е установена идентична точност при измерването на HbA_{1c} и плазмена глюкоза, съответствието на стойностите му в различни лаборатории по света остава проблем. Измерването на HbA_{1c} не е достъпно в много страни по света. Стойността на HbA_{1c} се влияе от редица фактори – анемия, хемоглобинопатии, бременност, уремия, като ефектът на тези фактори зависи от използвания лабораторен метод (13).

Имайки предвид проблемите при изследването на HbA_{1c}, СЗО счита, че ролята му за диагноза на захарен диабет и интермедерна хипергликемия не е установена и

не може да бъде препоръчан за подходящ диагностичен тест понастоящем.

Основни препоръки на СЗО за диагноза за захарен диабет и интермедиерна хипергликемия – 2006

Препоръка 1

Настоящите критерии на СЗО за диагноза на захарен диабет трябва да се запазят:

плазмена глюкоза на гладно $\geq 7,0$ mmol/l
или

плазмена глюкоза на 2-я час при ОГТТ $\geq 11,1$ mmol/l

Препоръка 2

Терминът „нормогликемия“ трябва да се използва за нива на глюкозата, свързани с нисък риск от развитие на захарен диабет или сърдечно-съдово заболяване – т.е. нива пог тези, използвани за определяне на интермедиерна хипергликемия

Препоръка 3

Настоящото определение на СЗО за нарушен глюкозен толеранс трябва да се запази засега:

плазмена глюкоза на гладно $< 7,0$ mmol/l
и

плазмена глюкоза на 2-я час при ОГТТ $\geq 7,8$ и $< 11,1$ mmol/l

Тази категория на интермедиерна хипергликемия би трябвало да бъде заменена от цялостна оценка на риска от диабет, сърдечно-съдово заболяване, или и двете, която да включва и измерване на глюкозата.

Препоръка 4

Долната граница за нарушена гликемия на гладно трябва да остане 6,1 mmol/l. За нарушена гликемия на гладно се приема:

плазмена глюкоза на гладно 6,1 до 6,9 mmol/l

и (ако е измерена)

плазмена глюкоза на 2-я час при ОГТТ $< 7,8$ mmol/l

Тази категория на интермедиерна хипергликемия би трябвало да бъде заменена от

цялостна оценка на риска от диабет, сърдечно-съдово заболяване, или и двете, която да включва и измерване на глюкозата.

Препоръка 5

Венозната плазмена глюкоза трябва да е стандартния метод за измерване и означаване на концентрацията на глюкоза в кръвта. При използване на капилярна кръв, особено в страни с ограничени ресурси, трябва да се има предвид коригиращ фактор за стойностите на капилярна плазмена глюкоза след обременяване. Стойностите на гладно за капилярна и венозна плазмена глюкоза са идентични.

Глюкозата трябва да се измерва непосредствено след вземане на кръвта. Плазмата трябва да се сепарира незабавно, или кръвната проба трябва да се вземе в епруветка с гликолитичен инхибитор и да се постави в лег до отделянето непосредствено преди измерването.

Препоръка 6

ОГТТ трябва да се запази като диагностичен тест поради следните причини:

- при изследване само на плазмена глюкоза на гладно се пропуска диагнозата на приблизително 30 % от случаите с недиагностициран диабет

- ОГТТ е единственото средство за установяване на лицата с НГТ

- ОГТТ често е необходим за потвърждаване или изключване на нарушение на глюкозния толеранс при асимптоматични лица

ОГТТ трябва да се провежда при лица с плазмена глюкоза на гладно 6,1-6,9 mmol/l, за да се определи степента на глюкозен толеранс.

Препоръка 7

Понастоящем HbA_{1c} не се приема за подходящ диагностичен тест за захарен диабет или интермедиерна хипергликемия.

Таблица 1. Основни критерии за диагноза на различни форми на глюкозен толеранс (СЗО, 2006)
Table 1. Main criteria for the diagnosis of different forms of glucose intolerance (WHO, 2006)

<ul style="list-style-type: none"> Нормален глюкозен толеранс Normal glucose tolerance плазмена глюкоза на гладно / <i>fasting plasm glucose</i> и/and плазмена глюкоза на 2-я час при ОГТТ <i>plasma glucose at 2h in OGTT</i> 	<p>< 6,1 mmol/l</p> <p>< 7,8 mmol/l</p>
<ul style="list-style-type: none"> Нарушена гликемия на гладно – НГТ Impaired Fasting Glucose – IFG плазмена глюкоза на гладно / <i>fasting plasm glucose</i> и (ако е изследвана) плазмена глюкоза на 2-я час при ОГТТ 	<p>6,1 до 6,9 mmol/l</p> <p>< 7,8 mmol/l</p>
<ul style="list-style-type: none"> Нарушен глюкозен толеранс – НГТ Impaired Glucose Tolerance – IGT плазмена глюкоза на гладно / <i>fasting plasm glucose</i> и/and плазмена глюкоза на 2-я час при ОГТТ <i>plasma glucose at 2h in OGTT</i> 	<p>< 7,0 mmol/l</p> <p>≥ 7,8 и < 11,1 mmol/l</p>
<ul style="list-style-type: none"> Захарен гуабем Diabetes Mellitus плазмена глюкоза на гладно и/и/and плазмена глюкоза на 2-я час при ОГТТ <i>plasma glucose at 2h in OGTT</i> 	<p>≥ 7,0 mmol/l</p> <p>≥ 11,1 mmol/l</p>

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Abdul-Ghani M.A., C.P. Jenkinson, D.K. Richardson et al. Insulin secretion and action in subjects with impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance. Results from the Veterans Administration Genetic Epidemiology Study. *Diabetes*, 55, 2006, 1430-1435.
2. Balkau B., T. Hillier, E. Vierron et al. Creating a pandemic of prediabetes : the proposed new diagnostic criteria for impaired fasting glycaemia. *Diabetologia*, 48, 2005, 801-802.
3. Barrett-Connor E., A. Ferrara. Isolated postchallenge hyperglycemia and the risk of fatal cardiovascular disease in older women and men: the Rancho Bernardo Study. *Diabetes Care*, 21, 1998, 1236-1239.
4. Bennett P.H., W.C. Knowler, D.J. Pettitt et al. Longitudinal studies of the development of diabetes in the Pima Indians. In: *Advances in Diabetes Epidemiology* (Ed. E.Eschwege). Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands, 1982, 65-74.

5. Burrin J.M., K.G.G.M. Alberti. What is blood glucose: can it be measured? *Diabetic Medicine*, 7, 1990, 199-206.
6. Chiasson J., R. Josse, G. Gomis et al. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet*, 359, 2002, 2072-2077.
7. Christensen J.O., A. Sandbaek, T. Lautitzen et al. Population-based stepwise screening for unrecognized Type 2 diabetes is ineffective in general practice despite reliable algorithms. *Diabetologia*, 47, 2004, 1566-1573.
8. DECODE Study Group. Is the current definition for diabetes relevant to mortality risk from all causes and cardiovascular and non-cardiovascular diseases? *Diabetes Care*, 26, 2003, 688-696.
9. DECODE Study Group. Will new diagnostic criteria for diabetes mellitus change phenotype of patients with diabetes? *Reanalysis of European epidemiological data. BMJ*, 317, 1998, 371-375.
10. DECODE Study Group. Age- and sex-specific prevalences of diabetes and impaired glucose regulation in 13 European Cohorts. *Diabetes Care*, 26, 2003, 61-69.
11. D'Orazio P., R.W. Burnett, N. Fogh-Andersen et al. Approved IFCC Recommendation on Reporting Results for Blood Glucose (Abbreviated). *Clinical Chemistry*, 51, 2005, 1573-1576.
12. Fogh-Andersen N., P.D. Wimberley, J. Thode et al. Direct reading glucose electrodes detect the molality of glucose in plasma and whole blood. *Clin Chem Acta*, 189, 1990, 33-38.
13. Goldstein D.E., R.R. Little, R.A. Lorenz et al. Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care*, 27, 2004, 1761-1773.
14. McMaster University Evidence Based Practice Center. Diagnosis, prognosis and treatment of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Evidence Report 128*. www.ahrq.gov
15. Mooy J.M., P.A. Grootenhuls, H. de Vries et al. Intra-individual variation of glucose, specific insulin and proinsulin concentrations measured by two oral glucose tolerance tests in a general Caucasian population: the Hoorn study. *Diabetologia*, 39, 1996, 298-305.
16. National Diabetes Data Group: Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes*, 28, 1979, 1039-1057.
17. Shaw J.E., A.M. Hodge, M. de Courten et al. Isolated post-challenge hyperglycaemia confirmed as a risk factor for mortality. *Diabetologia*, 42, 1999, 1050-1054.
18. Sorkin J.D., D.C. Muller, J.L. Fleg et al. The relation of fasting and 2-h postchallenge plasma glucose concentrations to mortality. Data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging with a critical review of the literature. *Diabetes Care*, 28, 2005, 2626-2632.
19. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 20, 1997, 1183-1197.
20. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow-up Report on the Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 26, 2003, 3160-3167.
21. The Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med*, 346, 2002, 393-403.
22. The DREAM Trial Investigators. Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose: a randomized controlled trial. *Lancet*, 368, 2006, 1096-1105.
23. Tirosh A., I. Shai, D. Tekes-Manova et al. for the Israeli Diabetes Research Group. Normal fasting plasma glucose levels and Type 2 diabetes in young men. *N Engl J Med*, 353, 2005, 1454-1462.
24. Torgerson J., J. Hauptman, M.N. Boldrin et al. XENical in the Prevention of Diabetes in Obese Subjects (XENDOS) Study. *Diabetes Care*, 27, 2004, 155-161.
25. World Health Organization. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. *Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. Geneva, World Health Org., 1999.
26. World Health Organization. Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycemia. *Report of a WHO/IDF Consultation*. Geneva, World Health Org., 2006.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Доц. Д-р Цветалина Танкова

Клиника по Диабетология, Клиничен Център по Ендокринология
Ул. „Дамян Груев“ № 6, София 1303, България
E mail: tankova@iname.com

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Assoc. Prof. Tsvetalina Tankova

Department of Diabetology, Clinical Center of Endocrinology
6, Damian Gruev str., Sofia 1303, Bulgaria
E mail: tankova@iname.com

Съотношението алдостерон/ренин при скрининга за първичен алдостеронизъм - плазмена ренинова активност или активен ренин?

Йоанна Матрозова¹, Сабина Захариева¹, Георги Кирилов¹, Красимир Калинов², Владимир Христов³

¹Клиничен Център по Ендокринология и Геронтология „Акад. Иван Пенчев“, София;

²Нов Български Университет,

³Клиника по Ендокринология, Александровска болница

Aldosterone-to-Renin Ratio in the Screening for Primary Aldosteronism: Plasma Renin Activity or Active Renin?

Joanna Matrozova¹, Sabina Zacharieva¹, Georgi Kirilov¹, Krasimir Kalinov², Vladimir Hristov³

Clinical Center of Endocrinology „Akad. Ivan Penchev“¹

New Bulgarian University²,

Department of Endocrinology, Alexandrovska hospital³

Резюме

Доскоро се считаше, че първичният алдостеронизъм (ПА) е рядко заболяване, което включва около 0,5-2 % от болните с артериална хипертония. Днес все повече се налага становището, че ПА е най-честата ендокринна хипертония, която обхваща 5-15% от хипертониците. В последните години като съвременен метод за скрининг на ПА се утвърди определянето на съотношението на хормоните алдостерон и ренин.

Целта на настоящето изследване бе да се сравни съотношението алдостерон/ренин чрез прилагането на два подхода – измерване на плазмена ренинова активност (ПРА) и на активен ренин (АР).

Abstract

Until recently primary aldosteronism (PA) was thought to be rare, accounting for as many as 0,5-2 % of the hypertensive patients. Nowadays, PA is considered as the most frequent form of endocrine hypertension, which comprises 5-15 % of the hypertensives. In the last decade the aldosterone to renin ratio was recognized as the appropriate current method for screening for PA.

The aim of this study was to compare the aldosterone to renin ratio, using the measurements of either plasma renin activity (PRA) or active renin (AR).

The relationship between AR and PRA and between the aldosterone to PRA ratio and the aldosterone to AR ratio was investigated in 101

Взаимовръзката между АР и ПРА и между алдостерон/ПРА и алдостерон/АР бе изследвана при 101 пациенти с артериална хипертония, разделени на две подгрупи- 94 болни с есенциална хипертония (ЕХ), 7 болни с ПА, и при 20 здрави контроли. Плазменият алдостерон и ПРА се определиха по радиоимунологичен, а АР- по имунорадиометричен метод. Резултати. Висока корелация между АР и ПРА се установи сред общата група пациенти с артериална хипертония ($r = 0,942, p < 0,001$), поотделно при групата с ЕХ ($r = 0,946, p < 0,001$) и с ПА ($r = 0,945, p < 0,001$). При здравите контроли също се установи висок корелационен коефициент между ПРА и АР ($r = 0,858, p < 0,001$). Висока корелационна зависимост между съотношението алдостерон/АР и съотношението алдостерон/ПРА се установи сред общата група пациенти с артериална хипертония ($r = 0,853, p < 0,001$), както и при пациентите с ЕХ ($r = 0,78, p < 0,001$) и с ПА ($r = 0,951, p < 0,001$). При здравите контроли също така се намери висока корелация между същите показатели ($r = 0,637, p < 0,001$).

Резултатите от нашето проучване установяват висока чувствителност на АР, съпоставима с тази на ПРА. Следователно за определянето на съотношението алдостерон/ренин може да се използва както ПРА, така и АР, според конкретните нужди и възможностите на съответната лаборатория.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: Алдостерон, ренин, първичен алдостеронизъм

Дълго време първичният алдостеронизъм (ПА) се считаше за рядко заболяване, което включва около 0,5-2 % от болните с артериална хипертония (9). Редица проучвания от последните години наложиха становището, че ПА е една от най-честите форми на симптоматична артериална хи-

пертензивна хипертония, разделена на две групи- 94 пациенти с есенциална хипертония (ЕХ) и 7 пациенти с ПА. Плазма алдостерон и ПРА бяха определени с радиоимуноанализ, а АР- по имунорадиометричен метод.

Голяма корелация между АР и ПРА била открита в общата група пациенти с хипертония ($r = 0,942, p < 0,001$), както и в групите с ЕХ ($r = 0,946, p < 0,001$) и с ПА ($r = 0,945, p < 0,001$). Голяма корелационна зависимост била открита и в групата на здрави субекти ($r = 0,858, p < 0,001$). Голяма корелация между съотношението алдостерон/ПРА и съотношението алдостерон/АР била открита в общата група пациенти с хипертония ($r = 0,853, p < 0,001$), както и в групите с ЕХ ($r = 0,78, p < 0,001$) и с ПА ($r = 0,951, p < 0,001$). Подобна голяма корелация била открита и в групата на здрави субекти ($r = 0,637, p < 0,001$).

Резултатите от нашето проучване потвърждават високата чувствителност на АР в сравнение с ПРА. Следователно както ПРА, така и АР могат да се използват за определянето на съотношението алдостерон/ренин, в зависимост от различните нужди и ресурси на всяка лаборатория.

KEY WORDS: Aldosterone, Renin, Primary Aldosteronism

пертензивна хипертония, която обхваща 5-15 % от хипертоничните (12, 14, 20, 6). Основният фактор, обуславящ увеличената честота на ПА през последното десетилетие, е методът, използван за скриниране на пациентите- съотношението алдостерон/ренин

(19, 1, 2). Според обобщените данни от ретроспективни проучвания, извършени в различни гържави и сред различни етнически групи, след въвеждането на този показател откриваемостта на първичния алдостеронизъм се е увеличила неколкостранно (12). Тези данни насочват вниманието към изследване и усъвършенстване на съществуващите методи за определяне на ренин в организма. Ренинът може да бъде измерен индиректно чрез ензимната си активност- плазмена ренинова активност (ПРА) или чрез директно определяне на концентрацията на хормона в плазмата- активен ренин (АР) (3). В диагностичния алгоритъм на ПА се прилага основно съотношението алдостерон/ПРА и по-рядко съотношението алдостерон (АР) (липса на комерсиални набори за определяне на активен ренин в рутинната практика). В повечето публикации досега се използваше съотношението алдостерон/ПРА, като най-често посочваната прагова стойност за скрининга на ПА е 750 (pmol/l) / (ng/ml/h) (10). Само няколко са публикуваните проучвания, при които АР е приложен в скрининга за ПА (7, 13).

Целта на настоящето проучване бе да се сравни надеждността на съотношението алдостерон/ ПРА с тази на съотношението алдостерон/АР за поставянето на диагнозата първичен алдостеронизъм при група пациенти с есенциална хипертония (ЕХ), с ПА и контролна група от здрави лица.

Пациенти и методи

Пациенти. В периода 06. 2006 г. – 04. 2007г бяха изследвани 101 болни с артериална хипертония, хоспитализирани в Университетска специализирана болница за активно лечение по ендокринология (УСБА-ЛЕ), и 20 контроли (здравни лица). За подбора на пациентите с артериална хипертония бяха използвани следните включващи и изключващи критерии:

Включващи критерии:

1. Мъже и жени на възраст 18- 70 години.
2. Болни с доказана артериална хипертония:

систолично артериално налягане > 140 или диастолично артериално налягане >90 при трикратно мануално измерване на артериалното налягане на двете ръце на пациента в седящо положение след 5 минути покой ;

– Болни с артериална хипертония, установена при 24-часово амбулаторно мониториране на артериалното налягане.

– Болни на медикаментозна терапия по повод на поставена в миналото диагноза артериална хипертония

Изключващи критерии:

1. Вторична хипертония с доказана етиология;

- (а) бъбречна хипертония;
- (б) ендокринна хипертония
- (в) стеноза на аортния истмус;
- (г) други причини.

2. Временно покачване на артериалното налягане при заболявания на ЦНС и при остри отравяния.

3. Прием в последната седмица на определени лекарства, взаимодействащи с ренин-ангиотензин-алдостероновата система: АСЕ-инхибитори, сартани, бета-блокери, диуретици, клонидин, нестероидни противовъзпалителни средства, както и вещества, повишаващи кръвното налягане (орални контрацептиви, кортикостероиди, еритропоетин, циклоспорин А, амфетамини, кокаин).

Диагноза на първичния алдостеронизъм. Преди извършване на хормонални изследвания евентуална хипокалиемия бе коригирана предварително чрез прилагане на калий пер ос, а за контролиране на артериалната хипертония бяха използвани калциеви антагонисти, алфа блокери и клонидин. За поставяне на диагнозата ПА беше използвана прагова стойност на съотношението алдостерон/ПРА 750 (pmol/l) / (ng/ml/h)

(10). Като прагова стойност за нивото на алдостерон в кръвта беше приета 416 pmol/l (21). Кръвните проби за ренин и алдостерон бяха взети сутрин между 8-10ч, при пациенти в седнало положение, след 30 минутна почивка. Кръв за алдостерон и показатели включени в минимума на СЗО за изследване на болен с артериална хипертония бяха взети в епруветки с клот активатор на стайна температура, а за ПРА – в епруветки с клот активатор в лег. Кръвните проби за изследване на активен ренин бяха взети на стайна температура в епруветки с Na₂EDTA (K₃EDTA). Отделянето на плазмата за ПРА се извърши на хладилна центрофуга на (+) 4°C, а на серума за активен ренин и алдостерон на обикновена центрофуга, след което плазмите и серума се съхраниха на температура (-) 20°C до момента на изследването на хормоните. Като потвърдителен тест се приложи теста с каптоприл. Диагнозата ПА се прие при ниво на алдостерон в кръвта над 330 pmol/l на 90тата минута след приложение на 50 мг каптоприл пер ос (5). При пациенти с биохимично доказана диагноза на ПА се използваха образни изследвания (КТ и/или ЯМР) за диференциране на двете основни форми на ПА- аденом на Кон или идиопатичен хипералдостеронизъм. При болни с визуализирана формация на надбъбречна жлеза се прие диагноза аденом на Кон и бе предложено оперативно лечение. Диагнозата алдостерон-продуциращ аденом бе потвърдена ретроспективно следоперативно, чрез използване на хистологичните данни и на показателите при проследяването на болните- излекуване и/или подобрене на артериалното налягане и/или хипокалиемията.

Всички болни и здрави контроли подписаха информирано съгласие за включване в проучването.

Лабораторни измервания. Определянето на показатели, включени в минимума на СЗО (кръвна захар, калий, холестерол, триглицериди, пикочна киселина, креатинин) се извърши по стандартни методи в

Клинична лаборатория на УСБАЛЕ. Хормоналните измервания се осъществиха в сертифицирана и централизирана лаборатория (Клинична, стероидна и радиоимунологична лаборатория- УСБАЛЕ „Акад. Иван Пенчев“). Алдостерон и плазмена ренинова активност бяха измерени по радиоимунологичен метод, като се използваха реактиви съответно на фирмите Immupotest, Франция, и Dia Sorin, Италия. Активен ренин беше измерен по имунорадиометричен метод с реактиви на фирмата Cis Bio, Франция.

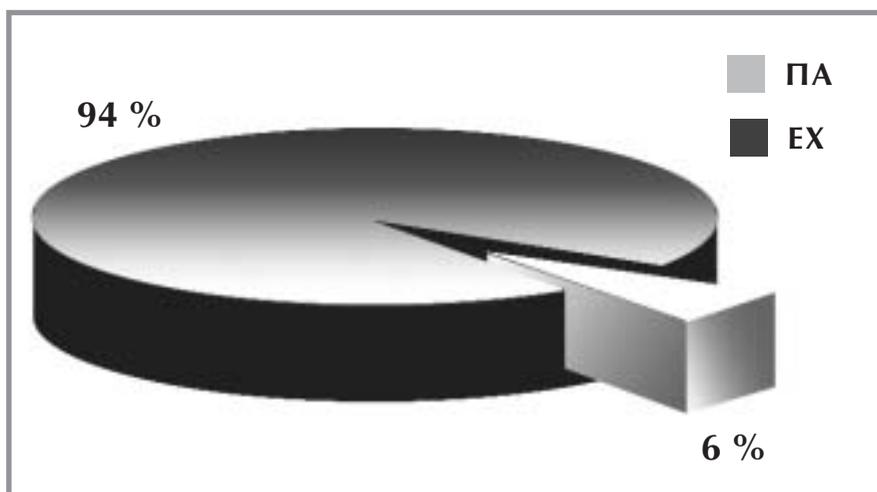
Статистическата обработка на данните (дескриптивни показатели и корелационен анализ) се извърши с помощта на статистически пакет SPSS 9,0, при ниво на значимост $p < 0,05$.

Резултати

Диагнозата ПА се потвърди при 7 болни сред изследваните 101 пациенти с артериална хипертония, което отговаря на честота на ПА от 6,9 % (фиг. 1). Сред пациентите с ПА бяха намерени трима болни с аденом на Кон и четири случая на идиопатичен хипералдостеронизъм. Характеристиките на пациентите с ПА и на пациентите с ЕХ са представени на табл. 1.

Взаимовръзката между АР и ПРА и между съотношението алдостерон/ПРА и алдостерон/АР бе изследвана при общата група пациенти с артериална хипертония, при двете подгрупи хипертоници поотделно (94 болни с ЕХ и 7 болни с ПА), и при здравите контроли.

Сред общата група пациенти с артериална хипертония и в групата пациенти с ЕХ се установи висока корелация между АР и ПРА, съответно $r = 0,942$, $p < 0,001$ (фиг.2) и $r = 0,946$, $p < 0,001$ (фиг. 3). При пациентите с доказан ПА също се доказва висока корелация между АР и ПРА ($r = 0,945$, $p < 0,001$). При здравите контроли се намери висок корелационен коефициент между ПРА и АР ($r = 0,858$, $p < 0,001$).



Фигура 1. Честота на първичния алдостеронизъм (ПА) сред болни с есенциална хипертония (ЕХ)

Figure 1. Revalence at PA among

Таблица 1. Характеристики на пациентите с есенциална хипертония (ЕХ) и с първичен алдостеронизъм (ПА). Стойностите са представени като пропорции или ср. \pm SD

Table 1. Characteristics with the subjects with EH and PA, the values are presented as means \pm ED

	ЕХ= 94	ПА= 7
Пол, М (%) / gender, M	41 (43,6%)	2 (29%)
Възраст, год / age, years	47 \pm 15	48,28 \pm 8,18
ИТМ, кг/м ² / BMI, /kg/m ²	27,8 \pm 6,3	28,43 \pm 5,71
Систолично артериално налягане, mmHg / Systolic blood pressure	140,22 \pm 21,41	150,71 \pm 20,9
Диастолично артериално налягане, mmHg / Diastolic blood pressure	88,7 \pm 13,2	97,14 \pm 12,86
Плазмена ренинова активност (ПРА), ng/ml/h Plasms renin actiits (PRA)	1,49 \pm 3,95	1,33 \pm 2,74
Активен ренин (АР), pg/ml Active renin (AR)	12,36 \pm 32,56	5,9 \pm 10,26
Алдостерон, pmol/l Aldosterone	294,82 \pm 377,71	1132,71 \pm 988,22
Съотношение алдостерон/ПРА Aldosterone/ PRA ratio	485,06 \pm 878,06	3067,71 \pm 3474,6
Съотношение алдостерон/АР Aldosterone/ AR ratio	47,59 \pm 57,92	2452,04 \pm 5848,65

Висока корелация между съотношението алдостерон/АР и съотношението алдостерон/ПРА се установи сред общата група пациенти с артериална хипертония ($r = 0,853$, $p < 0,001$), както и поотделно в подгрупите с ЕХ ($r = 0,78$, $p < 0,001$), с доказан ПА ($r = 0,951$, $p < 0,001$), както и при здравите контроли ($r = 0,637$, $p < 0,001$).

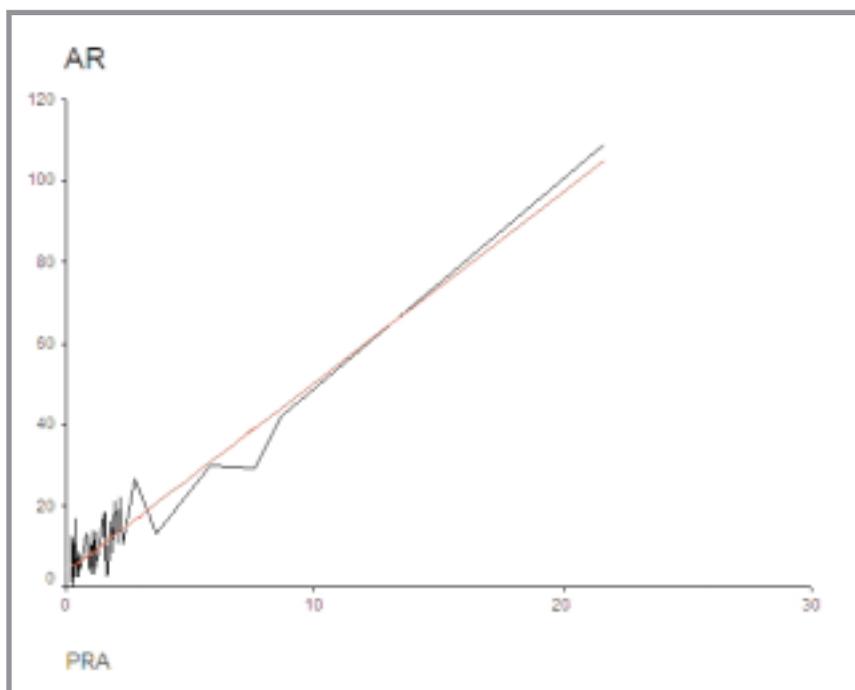
Дискусия

След въвеждането на съотношението алдостерон/ренин от Hiramatsu през 1986 г. (8), методът започва да се прилага широко като скринингов тест за ПА. Най-често съотношението алдостерон/ренин се определя чрез измерване на ПРА. Определенето на ПРА се базира на радиоимунологичното изследване на ангиотензин², образуван в плазмата за дадено време на инкубация, определено рН в присъствие на ангиотензинази и инхибитори на конвертиращия ензим. ПРА се изчислява чрез количеството ангиотензин², образуван за 1 час и се представя в ng/ml/h. Макар и широко разпространен, методът се влияе твърде много от условията на инкубацията (време, рН, избор на инхибитори) и от количеството на ангиотензиногена в плазмата. Повишението на ангиотензиногена при бременност, терапия с естрогени, хиперкортизолизъм води до повишение на ПРА. Обратно, намалението му при чернодробни заболявания и глюкокортикоиден дефицит се придружава с понижена ПРА при непроменено ниво на ренина. Тези недостатъци са избегнати при директното измерване на АР по имунорадиометричния метод (11). За разлика от ПРА, при измерването на АР няма значение плазменото ниво на рениновия субстрат, ангиотензиногена. Методът е бърз и резултатите лесно се стандартизират между отделните лаборатории. Основната слабост при използването на АР е установената според някои автори по-ниска чувствителност на метода в сравнение с определянето на ПРА (16,17). Тази по-слаба чувстви-

телност е особено подчертана в областта на ниските ренинови нива поради значителната кръстосана реактивност с проренина в посочения диапазон (18). Според някои лаборатории чрез използване на АР успешно се диференцират главно ниски от умерено понижени нива на ренина (4). Други проучвания показват висока корелационна зависимост между ПРА и АР. Ferrari, et al., 2004 (7) са изследвали корелацията между АР и ПРА както и между съотношението алдостерон/АР и алдостерон/ПРА при 36 пациенти с артериална хипертония, сред които 9 пациенти с аеном на Кон. Бил установен висок корелационен коефициент между изследваните параметри, съответно за АР и ПРА $r = 0,98$ при $p < 0,01$ и за съотношението алдостерон/АР и алдостерон/ПРА $r = 0,96$ при $p < 0,01$.

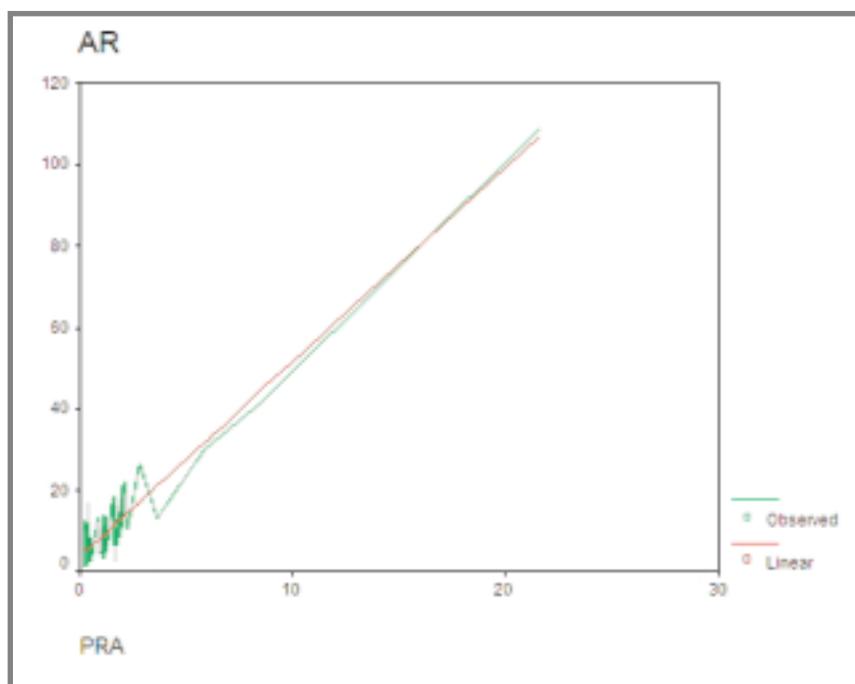
Резултатите от нашето проучване потвърждават високата корелация между ПРА и АР. В анализите, публикувани досега, взаимовръзката между АР и ПРА е изследвана сред обща група хипертоници (7). За първи път в настоящото проучване се представят данни за корелацията между АР и ПРА поотделно при подгрупи с ЕХ, с ПА и здрави контроли. И при двете групи пациенти се установи висока корелация между АР и ПРА, както и между съотношението алдостерон/ПРА и алдостерон/АР. Нашите резултати потвърждават хипотезата, че измерването на активен ренин може да се използва в диагностичния алгоритъм на ПА като резултатите са съпоставими с тези при измерването на ПРА.

В последното десетилетие честотата на ПА сред хипертониците е обект на задълбочени изследвания, тъй като заболяването води до повишен сърдечно-съдов риск. Наскоро бяха установени нови вредни ефекти на алдостерона върху сърдечно-съдовата система (левокамерна фиброза, периваскуларно възпаление (15). Ранното откриване на ПА е важно, тъй като шансът на болните да бъдат напълно излеку-



Фигура 1. Линейна зависимост между плазмена ренинова активност (PRA) и активен ренин (AR) в общата група пациенти с артериална хипертония

Figure 1.



Фигура 2. Линейна зависимост между плазмена ренинова активност (PRA) и активен ренин (AR) сред пациенти с есенциална хипертония

Figure 2.

вани от артериалната хипертония е много вероятен – по хирургичен път или чрез медикаменти. Именно по тази причина се налага усилено търсене и диагностициране на заболяването. Нашите данни показват, че честотата на ПА между болните с артериална хипертония е 6,9 %, което отговаря на повечето съобщения от последните години. Съпоставянето на два метода за определяне на ренина, респективно за измерване на съотношението алдостерон/ренин разширява възможностите за скриниране на болните с ПА.

Изводи

Установи се висока корелация между AP и ПРА при група пациенти с есенциална АХ, и с ПА и при здрави контроли. Намери се и висока корелация между съотношението алдостерон/ПРА и алдостерон/АР при трите групи лица. Резултатите от нашето проучване показват, че за определянето на съотношението алдостерон/ренин може да се използва както ПРА, така и АР, според конкретните нужди и възможности на съответната лаборатория.

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Захариева С, Г Кирилов, А Еленкова К Калинов. Отношението алдостерон /ренин - надежден тест за доказване на първичен алдостеронизъм. *Ендокринология*, 10, 2005, 2, 86-93
2. Матрозова Й, Захариева С. Първичен алдостеронизъм - промяна в диагностичните и лечебните концепции. *Ендокринология*, 11, 2006, 2, 76-85.
3. Cartledge S, N Lawson. Aldosterone and renin measurements. *Ann Clin Biochem* 2000, 37, 262-278.
4. Derkx FHM, RJ de Bruin, JM van Gool, MJ van den Hoek, CC Beerendonk, F Rosmalen, P Haima, MA Schalekamp. Clinical validation of renin monoclonal antibody-based sandwich assays of renin and prorenin, and use of renin inhibitor to enhance prorenin immunoreactivity. *Clin Chem*. 42, 1996, 7, 1051-63.
5. Doi SA, Abalkhail S, Al-Qudhaiby MM, Al-Humood K, Hafez MF, Al-Shoumer KA. Optimal use and interpretation of the aldosterone renin ratio to detect aldosterone excess in hypertension. *J Hum Hypertens*. 20, 2006, 7, 482-9.
6. Fardella C, L Mosso, C Gomez- Sanchez, P Cortes, J Soto, L Gomez, M Pinto, A Huete, E Oestreicher, A Foradori, J Montero. Primary Hyperaldosteronism in Essential Hypertensives: Prevalence, Biochemical Profile, and Molecular Biology. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85, 1863-1867.
7. Ferrari P, S Shaw, J Nicod, E Sanerband, J Nussberger. Active renin versus plasma renin activity to define aldosterone-to-renin ratio for primary aldosteronism *J hypertension* 2004, 22, 377-381.
8. Hiramatsu K, T Yamada, I Komiya et al. A screening test to identify aldosterone-producing adenoma by measuring plasma renin activity. *Arch Intern Med*, 1981, 141, 1589-1593
9. Kaplan NM: Primary aldosteronism, in Kaplan NM (ed): *Clinical Hypertension*, 6th ed. *Williams&Wilkins*, Baltimore, 1994, 389-408.
10. Lim P, E Dow, G Brennan, R Jung, T MacDonald. High prevalence of primary aldosteronism in the Tayside hypertension clinic population *Journal of human hypertension* 2000, 14, 311-315.
11. Menard J, TT Guyenne, P Corvol, B Pau, D Simon, R Roncucci. Direct immunometric assay of active renin in human plasma. *J. Hypertens.*, 3, 1985 (3):S275-8.
12. Mulatero P, M Stowasser, KC Loh, et al. Increased diagnosis of primary aldosteronism, including surgically correctable forms, in centers from five continents. *J Clin Endocrinol Mtab* 2004, 89, 1045-1050.
13. Olivieri O, A Ciacciarelli, D Signorelli, F Pizzolo, P Guarini, C Pavan, A Corgnati, S Falcone, R Corrocher, A Micchi, C Cressoni, G Blengio. Aldosterone to Renin Ratio in a Primary Care Setting: The Bussolengo Study *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89, 4221-422
14. Rossi GP, G Bernini, C Caliumi, G Desideri, B Fabris, C Ferri, C Ganzaroli, G Giacchetti, C Letizia, M Macario, F Mallamaci, M Mannelli, MJ Mattarello, A Moretti, G Palumbo, G Parenti, E Porteri, A Semplicini, D Rizzoni, E Rossi, M Boscaro, AC Pessina, F Mantero; PAPY Study Investigators. A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1,125 hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol.*, 48, 2006, 11, 2293-300.
15. Rossi GP, M Cesari, A Sacchetto. LVH in primary aldosteronism. *Hypertension*. 30, 1997, 5, 1297-8
16. Sealey JE, JH Laragh. Renin and prorenin: advances and declines in methodology. *Clin Chem*. 42, 1996, 7, 993-4
17. Sealey JE, P Trenkwalder, F Gahnem, D Catanzaro, JH Laragh. Plasma renin methodology: inadequate sensitivity of direct renin assay for clinical applications compared with the traditional enzymatic plasma renin activity assay. 13, 1995 1, 27-30
18. Sealey JE, D Catanzaro, JH Laragh. More on renin. *Clin Chem* 1996, 43, 695-7
19. Stowasser M, R Gordon. The Aldosterone-Renin Ratio in Screening for Primary Aldosteronism. *The Endocrinologist*, 2004, 14, 267-276.
20. Strauch B, T Zelinka, M Hampf, R Bernhardt, J Widimsky Jr. Prevalence of primary hyperaldosteronism in moderate to severe hypertension in the Central Europe region. *J Hum Hypertens* 2003, 5, 349-52.
21. Young WF. Primary aldosteronism: renaissance of a syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 66, 2007, 5, 607-18.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Д-р Йоанна Матрозова

Клиника по ендокринна хирургия, УСБАЛЕ
Ул. Дамян Груев № 6, 1303 София
e-mail: jmatrozova@abv.bg

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Dr. Joanna Matrozova

Clinic of Endocrine Surgery
6, Damyan Gruev Str., 1303 Sofia
e-mail: jmatrozova@abv.bg

Клинико-морфологична и биологична характеристика на дифузния склерозиращ вариант на папиларния тиреоиден карцином

Р. С. Иванова, П. Каранова, Р. Ковачева, Н. Кънев, Т. Сечанов
Клиничен Център по Ендокринология, МУ – София

Clinical, Morphological and Biological Characteristics of the Diffuse Sclerosing Variant of Papillary Thyroid Carcinoma

R. Ivanova, P. Karanova, R. Kovacheva, N. Kanev, T. Sechanov
Clinical Center of Endocrinology, Medical University- Sofia

Резюме

Дифузният склерозиращ папиларен тиреоиден карцином (ДСПТК) е рядък вариант на папиларния карцином, който се развива най-често при млади пациенти. Характеризира се с дифузно ангажиране на единия или двата дяла на щитовидната жлеза, множество псамомни телца, изразена лимфоидна инфилтрация и склероза. Познаването на този вариант на папиларния карцином е важно за диференцирането му от лимфоцитарния тиреоидит в млада възраст, поради сходната клинична изява. Цел на настоящето проучване е анализ на специфичните клинико-морфологични особености на ДСПТК. За оценка на биологичното поведение на ДСПК анализирахме някои

Abstract

Diffuse sclerosing papillary carcinoma (DSPC) is a rare variant of papillary thyroid carcinoma (PTC), which develops in very young patients. It is characterized by diffuse tumor involvement of one or both thyroid lobes, numerous psammoma bodies, prominent sclerosis with intense lymphocytic infiltration and squamous metaplasia. The practical importance of the recognition of this variant of PTC is based on its ability to simulate clinically the lymphocytic thyroiditis. The aim of this study was to describe the specific clinical and morphological features of DSPC. To evaluate the biologic behaviour of DSPC we analyzed some prognostic factors (age, sex, tumor stage and the presence of lymph node metastasis) and compared

прогностични фактори (възраст, пол, стадий на тумора (pTN), като ги сравнихме с тези при класическия ПТК. За период от 10 години ДСПК е хистологично диагностициран при 10 болни (1,6 % от 620 болни с ПТК) – 4 мъже, 6 жени, средна възраст 21,2 г.. При всички болни е проведено ехографско изследване на щитовидната жлеза, а при 5 от тях – тънкоиглена биопсия с последващо цитологично изследване. Цитологично се установяват малки групи от туморни клетки с папиларна структура и белези на ядрата, характерни за папиларния карцином, множество псамомни телца и лимфоцити. При всички случаи хистологичното изследване на оперативния материал (щитовидна жлеза и лимфни възли) доказва диагнозата ДСПТК с метастази в лимфните възли. Извършеният сравнителен анализ показва, че болните с ДСПК са по-млади и с по-висока честота на метастази в лимфните възли в сравнение със случаите с класически ПТК (n=249, средна възраст 44,9 г, 88 болни (35 %) – с метастази в лимфните възли). В заключение познаването на ехографските, цитологични и морфологични особености на ДСПК позволяват неговото предоперативно диагностициране и провеждането на адекватно лечение и прогнозиране.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: папиларен карцином, дифузен склерозиращ вариант, особености

Папиларният карцином е най-честият хистологичен вид от злокачествените тумори на щитовидната жлеза, с честота над 80-90 % (2). През последните две десетилетия бяха описани различни варианти на папиларния тиреоиден карцином (ПТК) – класически, микрокарцином, фоликуларен, дифузен склерозиращ, източеноклетъчен или „tall cell“, солиден, онкоцитарен и други, определянето на които има известно прогностично значение. Дифузният склерозиращ

with those in cases with classical PTC. For a period of 10 years DSPC was histologically diagnosed only in 10 patients (1,6 % of 620 cases with PTC) – 4 male and 6 female, with mean age of 21,2 years. In all patients thyroid ultrasonography and in 5 – FNA biopsy were done. The cytological investigation showed the presence of small papillary structures of cells with typical nuclear features for PTC, numerous psammoma bodies and lymphocyte infiltration. Histological evaluation of the thyroidectomy and lymph nodes specimens revealed the features of DSPC and lymph node metastases in all patients. The comparative analysis showed that the patients with DSPC were younger and with higher rate of lymph node metastases compared to the patients with classical PTC (n=249, mean age 44,3 yrs, 88pts (35 %) – with LN metastases). In conclusion the specific sonographic, cytological and morphological features of DSPC contribute to it's preoperative diagnosis and conduction of adequate treatment and prognosis.

KEY WORDS: papillary thyroid carcinoma, diffuse sclerosing variant, features

папиларен карцином (ДСПК) е рядък вариант на ПТК, който се развива най-често при пациенти в млада възраст. По литературни данни честота му е от 0,8 до 5,3 % от тази на ПТК (5). Клиничната му изява е сходна с тази на лимфоцитарния тиреоидит – дифузно увеличена, плътна щитовидна жлеза с или без увеличени шийни лимфни възли. Описан е за пръв път от А. Vickery и сътр. през 1985 год. като по-агресивен вариант на папиларния карцином по-

ради по-голямата честота на метастази (лимфогенни и хематогенни) и рецидиви спрямо болните с класически ПТК (14). В литературата са налице единични съобщения за ехографските и цитологични особености на ДСПК, които допринасят за преоперативното му диагностициране. През последните години се появиха и противоречиви данни за биологичните характеристики на ДСПК и тяхното значение за еволюцията и прогнозата (1, 6).

Цел на настоящето проучване е анализ на специфичните клинично-морфологични и биологични особености на дифузния склерозиращ папиларен карцином.

Материал и методи

За период от 10 години са оперирани и хистологично диагностицирани 10 болни с ДСПК. При всички болни е извършена оценка на данните от анамнезата, клинично-лабораторните показатели и функцията на щитовидната жлеза, ехографско и хистологично изследване на интраоперативни (геффрири и тупфери) и трайни препарати, оцветени с HE и Van Gison методи. Тънкоиглена биопсия под ехографски контрол на щитовидната жлеза и лимфните възли с цитологично изследване – цитонамазки, оцветени по метода на May-Grunwald-Gimza са проведени при 5 от болните.

Хистологичният вариант на тумора е определен след прецизиране на особеностите на епитела и стромата според класификацията на ендокринните тумори на СЗО, 3-то издание, 2004 г. При определяне на p TNM е използвана V-та версия на международната класификация, UICC, 1997 г.

За разкриване на биологичните особености на ДСПК оценихме някои добре известни за папиларния карцином на щитовидната жлеза прогностични показатели, като ги сравнихме с данните за случаите с класическия ПТК (n=239), оперирани за същия период от време – честота, възраст и пол на болните, стадий на тумора и наличие на метастази в лимфните възли. За статистическа обработка на резулта-

тите използвахме дескриптивен и вариационен анализ по програмата SPSS v.9 .

Резултати

1. Клинично-морфологична характеристика

Проучените болни с хистологично диагностициран дифузен склерозиращ папиларен карцином бяха 6 жени и 4 мъже на средна възраст $21,2 \pm 5,3$ г. (от 13-37 г), като при 5 от болните възрастта е под 20 години. Повод за диагностично уточняване и хирургическо лечение при всички болни са физикалните данни за дифузно увеличена, плътна щитовидна жлеза с или без шийна лимфаденопатия. При 1 болен (мъж, 22 години) са установени метастази в белия дроб от карцином с неизвестна локализация. При всички болни е налице еутиреоидна функция на щитовидната жлеза, а при 3 случая – позитивни антитиреоидни антитела.

При ехографското изследване на щитовидната жлеза най-често се отбелязва променена форма, нерезки граници, неравен контур, дифузна нехомогенна, хипоехогенна структура при липса на добре оформени нодули и множество пръснати, хиперехогенни точки, без задължително акустично засенчване (фиг. 1). Наличните увеличени шийни лимфни възли са с ехографска структура, подобна на тази в щитовидната жлеза.

Цитологичната диагноза при 5-те изследвани болни е папиларен карцином с метастази в лимфните възли. В цитонамазките на фона на кръвни и лимфоидни елементи се наблюдаваха малки групи от туморни клетки с папиларна структура и белези на ядрата, характерни за папиларния карцином, като особено характерни бяха множество псамомни телца (фиг. 2).

Въз основа на суспектните клинични, ехографски и цитологични находки проучените болни са насочени за хирургическо лечение и хистологична верификация. След интраоперативно (геффрирно) доказване наличието на папиларен карцином, при

всички болни е проведена тотална тиреоидектомия и шийна лимфна дисекция.

Хистологичното изследване на целия оперативния материал при всички случаи доказва диагнозата на ДСПК, както и наличието на метастази в лимфните възли. В трайните препарати от двата лоба на щитовидната жлеза се наблюдава дифузна туморна инфилтрация, с подчертана инвазия на лимфните съдове от малки папиларни структури и множество псамомни телца, пръснати лимфоидни инфилтрати с формиране на герминативни центрове, изразена склероза и огнища на плоскоклетъчна метаплазия, (фиг. 3). В изследваните лимфни възли са налице метастази от папиларен карцином, също с наличие на псамомни телца. При всички случаи туморът бе стадиян като pT4N1, а при болния с предоперативни данни за метастази в белия гроб – pT4N1M1. След поставяне на окончателната диагноза болните бяха насочени за по-нататъшна преценка и радиотерапия.

За проучения период от време са налице данни за повторна хирургична интервенция при 2 болни поради откриването на нови шийни лимфни метастази. Един от

случаите, с установени метастази в белия гроб и перикарда е починал една година след операцията.

2. Сравнителна оценка на някои прогностични фактори при ДСПК и класически ПТК

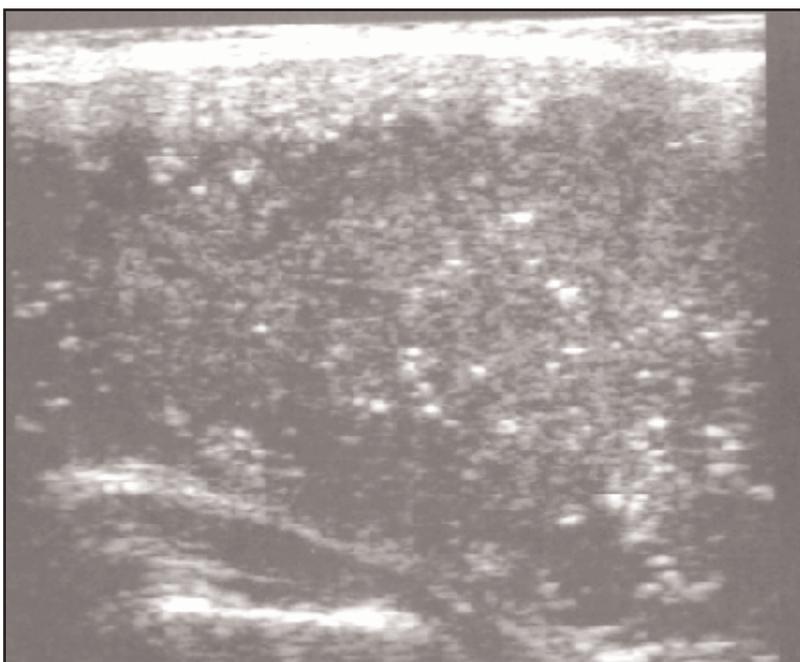
За проучения период от 10 години в Клиничния център по ендокринология са оперирани и хистологично диагностицирани 620 болни с папиларен карцином на щитовидната жлеза. Хистотипизирането на отделните подвидове на ПТК, дадено на фигура 1, показва, че честотата на ДСПК е 1,6 % спрямо всички случаи и 2,5 % – спрямо случаите с класическия ПТК.

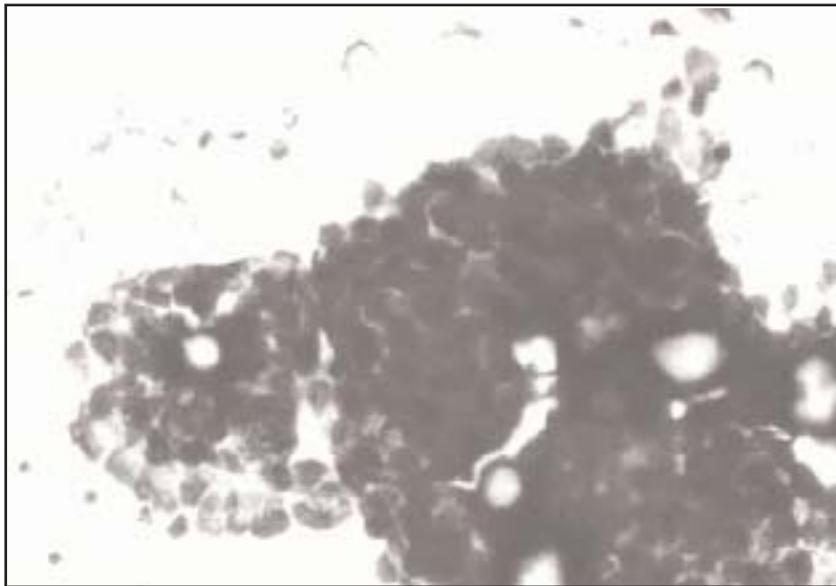
Сравнителните данни за възрастта, пола, стадия на тумора (pT) и наличието на лимфни метастази (pN1) на пациентите с ДСПК и класически ПТК са обобщени в табл. 1. Те показват, че средната възраст на случаите с ДСПК е значимо по-малка, но липсва разлика по отношение на пола – по-често засягане на женския пол и в двете групи болни. При случаите с класически ПТК наличие на лимфни метастази се установява в 35% (88 болни), като е налице връзка с размера на тумора.



Фигура 1. Ехографски образ на десен дял на щитовидната жлеза с множество пръснати, хиперехогенни точки при 20-годишна пациентка с ДСПК

Figure 1. Sonographic image of the right thyroid lobe with numerous scattered hyperechogenic spots in a 20-years old patient with DSPTC





Фигура 2. Цитология – туморни клетки, формиращи папиларна ламела и с белези на ядрата, характерни за папиларния тиреоиден карцином, единични псамомни тела и лимфоидни елементи

Figure 2. Cytology – tumor cells, forming papillary structure, with nuclear features of PTC, single psammoma bodies and lymphoid infiltration

Таблица 1. Сравнителен анализ на някои фактори с прогностично значение при болните с хистологично диагностициран дифузен склерозиращ папиларен карцином (ДСПК) и класически папиларен тиреоиден карцином (ПТК)

Table 1. Comparative analysis of some prognostic factors in the patients with histologically diagnosed DSPTC and classic PTC

Показател Parameter	ДСПК DSPTC (n=10)	Класически ПТК Classic PTC (n=249)	pt
Възраст Age	21,2 ± 7,17	44,57 ± 15,37	< 0,009
Пол – мъже/жени Sex – male/female	4/6	46/203	N.S
Стагий на тумора – pT2 Tumor stage pT3 pT4	- - 10 (100 %)	192 (77 %) 18 (7%) 39 (16 %)	
Метастази в лимфните възли Lymph node metastasis – pN1	10 (100 %)	88 (35 %) (T2-55/192, T3-5/18, T4-28/39)	< 0,001

Обсъждане

Резултатите от нашето проучване са в съгласие с литературните данни, че дифузният склерозиращ папиларен карцином на щитовидната жлеза е рядък тумор, който се установява най-често при млади пациенти (4, 10). Извършеният ретроспек-

тивен анализ за 10-годишен период показва, че от 620 болни с хистологично доказан папиларен тиреоиден карцином ДСПК е верифициран само при 10 болни (1.6%). Определеното на вариантите на ПТК, особено на тези с прогностично значение е предизвикателство за ендокринните патологии. То се извършва на базата на морфологията

на клетките и архитектурата на тумора, като при всички тях са налице характерните за ПТК белези на ядрата. Хистологичните критерии за диагнозата на ДСПК са: 1. дифузно увеличена нодулирана щитовидна жлеза без добре оформена туморна маса; 2. наличие на множество малки папиларни структури с белези на ядрата за ПТК, наблюдавани предимно в лимфните

съдови цепки; 3. изразена лимфоидна инфилтрация, на места с формиране на герминативни центрове; 4. изразена склероза и огнища с плоскоклетъчна метаплазия. Хистологичното изследване на проучените от нас болни отговаря на описаните критерии за поставяне на диагнозата ДСПК. При всички случаи са диагностицирани множество метастази в лимфните

Фигура 3. Хистология, ДСПК – туморна инфилтрация на щитовидната жлеза и инвазия на лимфни цепки от малки папиларни структури с множество псамомни телца, лимфоидни клетки и огнищна склероза (HE, x 40)

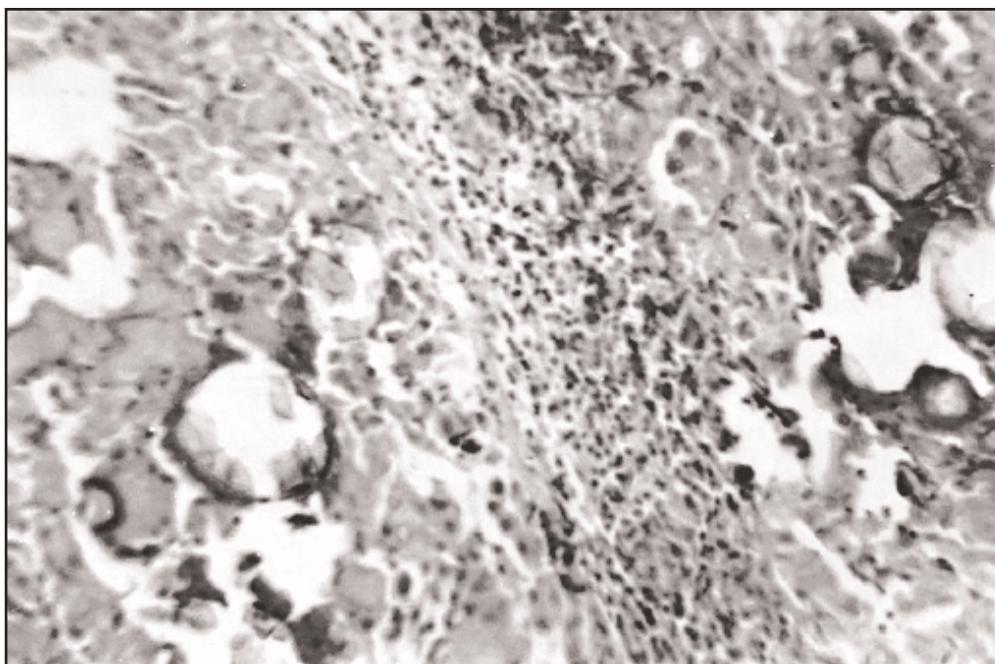
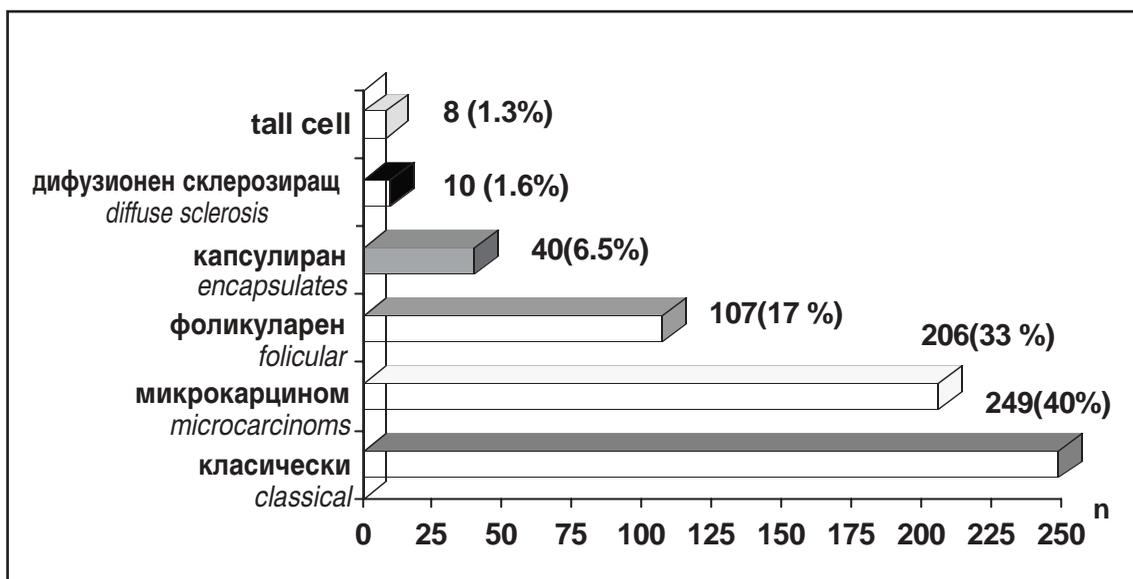


Figure 3. Histology, DSPTC – thyroid tumor infiltration and lymphatic invasion by small papillary structures, numerous psammoma bodies, lymphoid cells and focal sclerosis (HE, x 40)



Фигура 3. Разпределение на хистологични варианти на папиларния тиреоиден карцином (n=620)

Figure 3. Distribution of the histologic variants of PTC (n=620)

възли, като в някои от тях също са налице псамомни телца. Сравнителния анализ с класическия ПТК отново показва, че болните с ДСПК са по-млади. Те са и с по-висока честота на лимфни метастази. В групата болни с класически ПТК наличие на лимфни метастази е доказано в 35%, като е налице връзка с размера на тумора. По наши данни повторна хирургична интервенция по повод нови лимфни метастази е извършена при 2 случая, а смъртен изход е отбелязан при 1 болен (с доказани метастази в белия гроб преди диагностицирането на ДСПК).

Биологичното значение на отделните морфологични белези на ДСПК все още не е напълно проучено. Деструкцията на нормалните фоликули от лимфоидната инфилтрация допринася за образуването на антигени, които вероятно са причина за появата на антитиреоидни антители, докладвани при част от болните с ДСПК. Отличителен морфологичен белег на този вариант на ПТК е изразената туморна инвазия на лимфните съдове, на която се дължи и по-честата поява на лимфни метастази. В едно проучване се докладва за намалена мембранна експресия на адхезионния протеин E-cadherin в сравнение с класическия ПТК (12). Тези данни, отчитайки ролята на адхезионните молекули в процеса на метастазиране на туморите, могат отчасти да обяснят по-високата склонност на ДСПК да инвазира лимфните съдове. Първоначално ДСПК бе определен като агресивен вариант на ПТК поради данните за по-чести лимфни и кръвни метастази при диагностицирането му (6,14). В някои по-нови проучвания се предполага, че болните с ДСПК имат сходна прогноза с тези с класически ПТК, което определя и сходното хирургично поведение (1, 3, 10, 13). При анализ на 63 болни с ДСПК се установява, че честотата на метастази в лимфните възли, локална инвазия и далечни метастази е 75%, 35 % и 16 % съответно, а данни за рецидив са налице при 37% и смъртен изход при двама пациенти (3). Обобщава се,

че ДСПК е биологично по-агресивен от класическия ПТК, но без значими различия в преживяемостта на пациентите.

Познаването на морфологичните и биологични особености на ДСПК има практическо значение – те позволяват поставянето на предоперативна диагноза и планирането на адекватно хирургично лечение. Особено важно е навременното диференциране от лимфоцитарния тиреоидит на Хашимото поради сходната клинична изява при млади пациенти – дифузно увеличена плътна щитовидна жлеза и шийна лимфаденопатия. Ехографските данни за наличие на дифузно пръснати микрокалцификати на фона на дифузно увеличена щитовидна жлеза с хипоехогенна структура налага необходимостта от диференциална диагноза с ДСПК. Тънкоиглената биопсия под ехографски контрол с последващо цитологично изследване е високо специфичен метод за диагностициране на ПТК, което се потвърждава и от нашите резултати. В литературата са налице единични съобщения за ехографските и цитологични особености на ДСПК (7, 8, 9, 11). В скорошно проучване на 8 случая с ДСПК се отбелязва, че отличителни ехографски белези за този вариант са наличието на множеството микрокалцификати (като снежна буря – „snowstorm“ appearance) в щитовидната жлеза на фона на променена ехоструктура и увеличени лимфни възли (11). Наличието на папиларни структури с белези на клетките, характерни за ПТК и наличието на множество псамомни телца и лимфоидни елементи при цитологичното изследване на пунктати от щитовидната жлеза е насочваща за диагнозата на този рядък вариант на ПТК. Литературните данни, а също и нашият опит показва, че само в единични случаи с класически ПТК се наблюдават псамомни телца в изследваните цитонамазки от тумора (8).

В заключение познаването на ехографските, цитологични и морфологични особености на ДСПК позволяват неговото предоперативно диагностициране и провеждане на адекватно лечение и прогнозиране.

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Albareda M, Puig-Domingo M, Wengrowicz S, Soldevila J, Matias-Guiu X, Caballero A, et al. Clinical forms of presentation and evolution of diffuse sclerosing variant of papillary carcinoma and insular variant of follicular carcinoma of the thyroid. *Thyroid*, 8, 1998, 5, 385-91.
2. Busnardo B, De Vido D. The epidemiology and etiology of differentiated thyroid carcinoma. *Biomed Pharmacother.*, 2000, 54, 322-326.
3. Caplan RH, Wester S, Kiskan WA. Diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma: case report and review of the literature. *Endocrine Practice*, 3, 1997, 5, 287-292
4. Carangiu ML, Bianchi S. Diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma. Clinicopathologic study of 15 cases. *Am J Surg Pathol*, 13, 1989, 12, 41-9.
5. Chow SM, Chan JK, Law SC, et al. Diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma: clinical features and outcome. *Eur J Surg Oncol.*, 446-449, 2003, 29.
6. Falvo L, Giacomelli L, D'Andrea V, Marzullo A, Guerriero G, de Antoni E. Prognostic importance of sclerosing variant in papillary thyroid carcinoma. *Am Surg*, 2006, 72:438- 444.
7. Fujimoto Y et al. Diffuse Sclerosing Variant of Papillary Carcinoma of the the Thyroid: Clinical Importance, Surgical Treatment and Follow-Up Study. *Cancer*, 66, 1990, 2306-2312
8. Kumarasinghe MP. Cytomorphologic features of diffuse sclerosing variant of papillary carcinoma of the thyroid. A report of two cases in children. *Acta Cytol.*, 42, 1998, 4, 983-6.
9. Kwak JY, Kim EK, Hong SW, Oh KK, Kim MJ, Park CS, Cheong WY. Diffuse sclerosing variant of papillary carcinoma of the thyroid: ultrasound features with histopathological correlation. *Clin Radiol.*, 62, 2007, 4, 382-6
10. Lam AK, Lo CY. Diffuse sclerosing variant of papillary carcinoma of the thyroid: a 35-year comparative study at a single institution. *Ann Surg Oncol* 13, 2006, 176-181.
11. Lee JY, Shin JH, Han BK, Ko EY, et al. Diffuse sclerosing variant of papillary carcinoma of the thyroid: imaging and cytologic findings. *Thyroid*, 17, 2007, 567-73.
12. Rocha AS, Soares P, Seruca R, et al. Abnormalities of the E-cadherin/catenin adhesion complex in classical papillary thyroid carcinoma and in its diffuse sclerosing variant. *J Pathol.*, 194, 2001, 358-366.
13. Soares J, Limbert E, Sobrinho-Simoes M. Diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma. A clinicopathologic study of 10 cases. *Pathol Res Pract*, 185, 1989, 200-206.
14. Vickery AL Jr., Carangiu ML, Johannessen JV, Sobrinho- Simoes M. Papillary carcinoma. *Semin Diagn Pathol.*, 2, 1985, 90-100.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Д-р Радина Иванова

Клиничен център по ендокринология
УСБАЛЕ „Акад. Иван Пенчев“,
ул. „Д. Груев“ №6-8, София 1303,
radinaivanova@abv.bg

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Radina Ivanova, MD

Clinical Center of Endocrinology USHATE „Acad.
Ivan Penchev“, 6-8, Damian Gruev Str., 1303 Sofia
radinaivanova@abv.bg

Списание
ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ISSN 1310-8131
Българското дружество по
ендокринология (БДЕ)

Адрес на редакционната колегия:

Университетска специализирана болница
за активно лечение по ендокринология, „А-
кад. Иван Пенчев“ (УСБАЛЕ)
Проф. Б. Лозанов
ул. „Д. Груев“ 6, 1303 София
тел. (02) 987 7201; факс (02) 874 145
E-mail: bojann_lozanov@hotmail.com

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

Editorial Board Address for Correspondence:

University, Hospital of Endocrinology
Prof. B. Lozanov, Editor in Chief
6, D. Gruev Str., 1303 Sofia - Bulgaria
Tel (0359) (02) 987 7201; Fax (0359) (02) 874
145
E-mail: bojann_lozanov@hotmail.com

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

Материалите трябва да се предоставят в два еднакви екземпляра, напечатани на пишещата 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).

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

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

Структурата на статиите трябва да отговаря на следните изисквания:

Титулна страница

а) заглавие, имена на авторите (собствено име и фамилия), название на научната организация или лечебното заведение, в което те работят. При повече от едно 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 книгосписа.

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 с 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

the principal conclusions. The abstracts should not exceed one standard typewritten page of 200 words.

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

Title page

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

Text of the article

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

Illustrations

The figures, diagrams, schemes, photos should be submitted separately from the text (one original and two copies) in size 9 x 13 cm, all of them described on the back side with: consecutive number (in Arabic figures); titles of the article and name of the first author. These should be listed together with the corresponding and informative text in the legend (title, keys to symbols, etc.) on a separate sheet in consecutive order. The tables should be presented on separate sheets with Arabic numbers and informative text above each table. Please do not leave any empty space in the text for illustrations. Show with an arrow in the left margin of the respective page the recommended space for them.

References

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

разположени над тях; номерацията им е отделна (също с арабски цифри). Посочените в таблицата данни не трябва да се дублират с тези във фигуриите. 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 фамилията на първия автор, след това инициалите му; всички останали автори се посочват с инициалите, следва ни от фамилията 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.

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 of the chapter first, followed by "In:", full title of the book, editors, publisher, town, year, first and final page number of the cited chapter.

Examples

Reference to a journal article:

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

Reference to a book chapter:

2. Delange, F. Endemic 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:

Universit, Hospital of Endocrinology

6, D. Gruev Str.

1303 Sofia, BULGARIA

Prof. B. Lozanov (Editor-in chief)

Ликвидиране на йод-дефицитните заболявания в България

Elimination of Iodine Deficiency Disorders in Bulgaria



Мрежата за устойчиво елиминиране на йодния дефицит, Международният комитет за контрол на йоддефицитните заболявания, УНИЦЕФ и СЗО потвърждават получената молба от Министерството на здравеопазването на България за извършване на външна оценка на програмата за универсално йодиране на солта и елиминиране на йоддефицитните заболявания. В отговор на тази молба ние имаме честта да потвърдим постигнатото елиминиране на йодния дефицит в България чрез универсалното йодиране на солта.

Елиминирането на йодния дефицит е ясно описано в документа озаглавен „Преглед на напредъка по осигуряване на устойчив оптимален йоден прием в България“ (Ван дер Хаар, Ван Инген и Лауберг 2005) и ние подкрепяме направените заключения и препоръки в този доклад. Ние сме уверени, че Правителството на България ще подкрепя и в бъдеще елиминирането на йоддефицитните заболявания. Както е отбелязано в доклада, постоянният мониторинг и наблюдение са решаващ компонент за поддържане на това забележително постижение. Предлагаме в Националния Консултативен съвет за елиминиране на йоддефицитните заболявания да бъде включен като член и представител на солната индустрия.

Ние поздравяваме Правителството на България за успеха постигнат в универсалното йодиране на солта и елиминирането на йоддефицитните заболявания като проблем на общественото здраве. Чрез достигнатия успех в елиминирането на йодния дефицит и поддържането на устойчивостта му, Правителството на България осигурява здравето и благополучието на децата, цялото население и бъдещите поколения.

май, 2007

Алан Корт
Председател

Мрежа за устойчиво елиминиране на йодния дефицит

Джерард Бъроу
Председател

Международен комитет за контрол на йоддефицитните заболявания

Мария Каливис
Рег. директор

УНИЦЕФ

Марк Данзон
Рег. директор

ЕБ на СЗО

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. Р. КОВАЧЕВА

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. R. KOVATCEVA

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

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

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

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

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