



ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ENDOCRINOLOGIA

Списанието се индексира от/The journal is indexed by:

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

Editorial Board/Редакционна колегия и съвет

Editor-in-Chief: Maria ORBETZOVA

Гл. редактор: Мария ОРБЕЦОВА

Honorary Editor-in-chief Bojan LOZANOV

Почетен главен редактор Боян ЛОЗАНОВ

Anna-Maria Borissova/

Анна-Мария Борисова

Vladimir Christov/Владимир Христов

Georgi Kirilov/Георги Кирилов

Dragomir Koev/Драгомир Коев

Julieta Gerenova/Жулиета Геренова

Zdravko Kamenov/Здравко Каменов

Ivan Tzinlikov/Иван Цинликов

Iliana Atanassova/Илиана Атанасова

Kalinka Koprivarova/Калинка Коприварова

Kiril Hristozov/Кирил Христозов

Lidia Koeva/Лидия Коева

Malina Petkova/Малина Петкова

Mihail Boyanov/Михаил Боянов

Rusanka Kovacheva/Русанка Ковачева

Sabina Zacharieva/Сабина Захариева

Philip Kumanov/Филип Куманов

Tzvetalina Tankova/Цветалина Танкова

International Scientific Board/ Международен научен съвет

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

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

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

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

A. Isidori (Rome) / А. Изидори (Рим)

B. Karanfilski (Scopie) / Б. Каранфилски (Скопие)

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

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

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

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

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

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

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

Съдържание**Обзори**

- *Петров, Сава П., Орбецова, Мария М., Илиев, Янко Т.*
Влияние на опиоидните аналгетици върху репродуктивната функция 133

Оригинални статии

- *Раянова, Гинка Х., Ганева, Силвия С., Тодорова, Катя Н., Луканов, Цветан Х., Гечева, Светла П.*
Нарушения във въглехидратната обмяна при пациенти с метаболитен синдром 139
- *Колева, Даниела Ив., Орбецова, Мария М., Денева, Тая И.*
Асиметричен диметил-аргинин при жени с метаболитен синдром и синдром на поликистозни яйчници 149
- *Терзиева Дора, Д., Орбецова Мария, М., Матева, Нонка Г.*
Влияние на фотопериода върху дневно-нощните концентрации на мелатонина 160
- *Андреева-Гатева, Павлина А., Симеонов, Васил Д., Георгиева-Николова, Радка Т., Тафраджийска-Хаджиолова, Радка К.*
Клъстерен анализ на компоненти на метаболитен синдром при лица с повишен риск от захарен диабет тип 2 168

**Casus pro diagnosi**

- *Нончев, Боян Ив., Аргатска, Антоанета В., Орбецова, Мария М.* 186

Указания за авторите

188

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

- *Petrov, Sava P., Orbetzova, Maria M., Iliev, Yanko T.*
Effects of the Opioid Analgesics on the Reproductive Function 133

Originale articles

- *Rayanova, Ginka H., Ganeva, Silvia S., Todorova, Katya N., Lukanov, Tsvetan H., Gecheva, Svetla P.*
Disorders of the Carbohydrate Metabolism in Patients with Metabolic Syndrome 144
- *Koleva, Daniela Iv., Orbetzova, Maria M., Deneva, Tanya I.*
Asymmetric Dimethylarginine in Women with Meta- bolic Syndrome and Polycystic Ovary Syndrome 154
- *Terzieva Dora, D., Orbetzova Maria, M., Mateva Nonka, G.*
Influence of Photoperiod on Melatonin Day-Night Concentrations 164
- *Andreeva-Gateva, Pavlina A., Simeonov, Vasil D, Georrgieva-Nikolova, Radka T., Tafradjiiska-Hadjiolova, Radka K.*
Cluster Analysis of the Components of the Metabolic Syndrome in Subjects With an Increased Risk for Diabetes Mellitus Type 2 177

**Casus pro diagnosi**

- *Нончев, Боян Ив., Аргатска, Антоанета В., Орбецова, Мария М.* 186

Instructions to authors

188



Влияние на опиоидните аналгетици върху репродуктивната функция

Петров, Сава П.¹, Орбецова, Мария М.¹, Илиев, Янко Т.²

Клиника по Ендокринология и болести на обмяната¹

Клиника по Токсикология², УМБАЛ „Св. Георги“, МУ – Пловдив

Effects of the Opioid Analgesics on the Reproductive Function

Petrov, Sava P.¹, Orbetzova, Maria M.¹, Iliev, Yanko T.²

Clinic of Endocrinology and metabolic diseases¹

Clinic of Toxicology², „Sv. Georgy“ University Hospital, Medical University, Plovdiv

Резюме

Ефектите от дълготрайната употреба на опиоидни аналгетици върху ендокринната система не са добре проучени поради факта, че повечето изследвания са фокусирани върху острият им страничен ефект. Краткотрайните и продължителните терапевтични схеми могат да окажат различни въздействия върху хипоталамо-хипофизо-гонадна ос по отношение както на степента на увреда, така и на естеството на патологичните ефекти. Ендогенните опиоиди оказват първостепенен ефект върху регулацията и освобождаването на гонадотропините, променяйки пулсативната секреция на гонадотропин рилийзинг хормона (ГнРХ). Те водят до снижаване на ЛХ, ФСХ, естрадиол и прогестерон (при жени) и на тестостерон (при мъже). Появата на андрогенен дефицит е свързан директно с хроничната експозиция към опиати и се демонстрира едновременно при двата пола. Хроничната употреба на опиоиди при мъже за хроничен контрол на болката или пристрастени към хероин, морфин или метадон, води до разнообразни симптоми като забавена еякулация, еректилна дисфункция и сигнификантно редуциране на сексуалното либидо. Опиоидните антагонисти могат да подобрят сексуалното поведение. Необходимо е провеждане на повече целенасочени проучвания, за да се хвърли светлина върху ендокринните и в частност репродуктивните нарушения, свързани с използването на опиоиди и пристрастяването към тях.

Ключови думи:

опиоиди, репродуктивна функция, хипогонадизъм

Abstract

The effects of the short-term use of opioid analgesics on the endocrine system are not investigated very well because most of the studies are focused on their acute adverse effects. The short-term and prolonged therapeutic regimens might exert different influences on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in regard to both the degree of the impairment and the nature of the pathological effects. Endogenous opioids have a primary effect on the control and release of the gonadotropins, modifying the pulsatile secretion of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH). They cause a decrease in the LH and FSH secretion, the oestradiol and progesterone secretion in females and the testosterone secretion in males. Androgene deficiency is related directly to the chronic exposition to opioids and is observed in both genders. The chronic use of opioid analgesics for a long-term pain control or in heroine, morphine, and methadone abuse results in various symptoms such as delayed ejaculation, erectile dysfunction and significant reduction of the libido in the males. Opioid antagonists could ameliorate sexual behaviour. More detailed studies are needed to elucidate the endocrine and, in particular, the reproductive disturbances associated with the chronic use and addiction to opioid analgesics.

Key words:

opioids, reproductive function, hypogonadism

Въведение

Опиоидите са основно средство за обезболяване и постигане на удоволствие още от ранната история на човечеството (1). Те съществуват като ендогенни пептиди в организма на човека с доказано наличие в мозък, черва и имунна система. Доказани са 3 основни типа ендогенни опиоиди: енкефалини, с прекурсори проенкефалини, ендорфини, получени от проопиомеланокортин (ПОМС), *динорфини*, получени от продинорфини и един допълнителен вид ендогенни опиоиди, наречени *ендоморфини*. Отделните опиоиди осъществяват своето биологично действие посредством свързване с различни рецептори. Наличие на опиоидни пептиди е установено както в периферната, така и в централната нервна система – базални ганглии, мозъчен ствол, хипоталамус и гръбначен мозък (2). Съществуват 4 основни типа опиоидни рецептори – μ (мю), κ (капа), δ (делта) и ноцептивен FQ рецептор. Те принадлежат към G-протеиновите рецептори, изградени от 7 трансмембрални единици (3, 4). Съществуват и други рецептори като ζ (зета), λ (лямбда), ϵ (епсилон), които не са добре проучени и за тях липсва генетична идентификация (3).

Употребата на опиоиди под различна форма показва трайна тенденция към повишаване през последното десетилетие. Броят на наркозависимите, използващи хероин и други синтетични опиоиди (викодин, фентанил, метагон) се увеличава. Така, броят на зависимите от хероин в България понастоящем е около 90 000 души. Хероинът е полусинтетичен опиат, получен при преработка на опиум (морфин) с оцетен анхидрид. Представлява кафяв прах с цвят на какао, който се приема инхалаторно, чрез смъркане („на нос“), чрез пушене на дима от горящ хероин („на фолио“), или венозно („на помпа“). Попаднал в организма, хероинът измества ендогенните опиатни пептиди и се свързва с опиоидните рецептори в главния мозък – капа, делта, сигма и мю. Непрекъснато се увеличава и броят на пациентите, подложени на заместителна терапия с метагон – за периода 1997-2005 г. се отчита почти десетократно нарастване предписването на този опиоид (4).

Повишеното използване на опиоидни аналгетици през последните години се дължи на факта, че все по-често биват изписвани при немалки хронични болки и т.нар. *хроничен немалигнен болков синдром* (5). Хроничната немалигнена болка се описва, като болка персистираща повече от 3 месеца или като болка, не преминава-

ща за периода, в който трябва да настъпи оздравяване за съответното заболяване. Световната асоциация за изучаване на болката дефинира това състояние като „неприятно сетивно и емоционално изживяване, свързано с актуално или вероятно тъканно увреждане“ (6). Последни проучвания сочат, че броят на страдащите от хронична болка в САЩ са около 100 милиона души (7), като повечето от тях използват опиоидни аналгетици за справяне с хроничния болков синдром. Опиоидните аналгетици ефективно повлияват болките в гърба, главоболието, болката при остеоартрит, спортни травми и други скелетно-мускулни увреди, ревматологични заболявания, имат дълготраен ефект и са достъпни като цена (8).

В последните години се отчита и една друга тревожна тенденция – не се спазват строго и индикациите за използване на опиати, нарастват злоупотребите с този вид препарати и привикването към тях. Много често пациентите, на които е изписан подобен медикамент, злоупотребяват не само с показанията за употреба, но превишават и дозата му.

Ендокринни нарушения под влияние на опиоиди

Ефектите от дълготрайната употреба на опиоиди върху ендокринната система не са добре проучени поради факта, че повечето изследвания са фокусирани върху остри странични ефекти. Интересен подход за анализ е сравняване и паралелно проследяване на остри и хронични нежелани реакции, като се акцентира върху факта, че хроничните нежелани реакции не могат да се разглеждат като пролонгирани остри такива. Краткотрайните (спешни) и продължителните (хронични) терапевтични схеми могат да окажат различни въздействия върху ендокринната система по отношение както на степента на увреда, така и на естеството на патологичните ефекти. С повишената употреба на опиоиди и метагон се разпознават все повече странични ефекти върху ендокринната система. При хронична експозиция се засяга функцията на всички ендокринни оси – хипоталамус-хипофиза-гонади, хипоталамус-хипофиза-щитовидна жлеза, хипоталамус-хипофиза-надбъбречна жлеза, както и развитие на метаболитен синдром, затлъстяване, захарен диабет (7, 9, 10).

Ендогенните опиоиди оказват първостепенен ефект върху регулацията и секрецията на *гонадотропините* и *адреналокортикотропния хормон* (АКТХ). Съществуват доказателства, че бе-

та-ендорфините променят пулсативната секреция на гонадотропин рилийзинг хормона (ГнРХ), чрез пресинапична инхибиция в *eminentia mediana* и повлияване на адренергичната невротрансмисия (2, 9). Опиоидите потискат секрецията на АКТХ и кортикотропин рилийзинг хормона (КРХ), осъществявайки своя ефект върху хипоталамуса и хипофизата, чрез δ - и κ -рецепторите (2). Завишената опиоидна активност по време на стрес може да доведе до стрес-индуцирана аменорея, чрез занижени нива на лутеинизиращ хормон (ЛХ) и нарушена пулсативна секреция (9). Опиоидите завишават серумната концентрация на пролактин, чрез потискане секрецията на гонадина от еминенция медиана (10). Множество изследвания показват негативното влияние на дериватите на опиума върху функцията на хипоталамо-хипофизната ос (13). Pfeiffer и сътр. доказват, че ендогенните опиоиди, включително β -ендорфини, енкефалини и динорфини оказват важна роля в регулацията на редица ендокринни функции (14). Морфинът повишава нивото на някои хормони – адреналин, норадреналин, кортикостерон и глюкозон и довежда до потискане активността на оста хипоталамус-хипофиза (15).

Нарушения на хипоталамо-хипофизогонадната ос

Литературните данни дават информация за хипогонадизъм и нарушение в сексуалната функция по време на интратекална опиоидна терапия, орална опиоидна терапия и заместителната терапия с метагон при хора, пристрастени към опиати (11-23). В тези случаи се изяснява типичната констелация за централен хипогонадизъм, включваща ниски нива на тестостерон без адекватно завишаване на ЛХ и ФСХ (12, 20, 21). Хипогонадизмът може да доведе до симптоми като намалено сексуално либидо, еректилна дисфункция и остеопороза.

Почти не съществуват литературни данни относно преките ефекти от опиоидна терапия върху продукцията на половите хормони. Към момента има само едно проучване, включващо малка популация от пациенти, получаващи интратекално опиоиди (24). В това проучване, една седмица след започване на терапията се изяснява супресия на хипоталамо-хипофизогонадната ос при 10 от наблюдаваните пациенти. Отбелязано е, че много от пациентите, започвайки това проучване, показват различна степен на сексуална дисфункция и средната концентрация на тестостерон в таргетната група е занижена леко под долната референтна стойност. Изглежда, че повечето от пациентите са използвали за из-

вестно време преди започване на проучването орални опиодни аналгетици, което обяснява пониската средна концентрация на тестостерона при изследваната група. До 15-та седмица от започване на лечението с интратекални опиоиди всички пациенти са манифестирали нарушение в сексуалната функция и сигнификантно редуциране на средното тестостероново ниво в сравнение с изходните стойности (24).

При пациенти с хронична болка, получаващи интратекално морфин, хипогонадизъм се открива както при мъже, така и при пре- и постменопаузални жени (11). Разпределението в изясняването на хипогонадизъм, като последици от оралните опиоиди, може да не е еднакво за двата пола. Fraser и сътр (19) изучават пациенти с хронична немалигнена болка, получаващи орални/трансдермални опиати и откриват хипогонадизъм при 75% от мъжете и 21% от жените, въпреки че групите са имали идентична доза на опиатите и оценка на болката. Този факт води до мисълта, че опиатите се свързват с по-висок риск от хипогонадизъм при мъжете от колкото при жените.

Появата на андрогенен дефицит е свързан директно с хроничната експозиция към опиати и се демонстрира едновременно при мъже и жени (25). Жените, които изясняват вторичен хипогонадизъм, имат изключително редуцирани нива на тотален тестостерон, свободен тестостерон, андростендион и дехидроепандростерон сулфат (ДХЕА-С), сравнени с клинично здрави контроли (26). Данните за супресия на адреналната андрогенна продукция – занижени нива на ДХЕА и ДХЕА-С при жени, употребяващи хронични опиоиди, може да съпътства индукцията на хипогонадотропен хипогонадизъм. Андрогенният дефицит остава много често неразпознат при жените, въпреки факта, че при тях може да се манифестират сходни симптоми на андрогенен дефицит, както при мъжете (26).

Екзогенните опиоиди имат драстичен ефект върху менструалния цикъл при жените. След дълготрайно интратекално приложение на опиоиди, 14 от 21 пременопаузални жени развиват аменорея, а останалите 7 изясняват нарушения в менструалния цикъл по типа на олигоменорея. Опиоидите водят до снижаване на ЛХ, ФСХ, естрадиол и прогестерон, което засяга менструалната цикличност (13). Аменореята и нередовният менструален цикъл в резултат на ниските естрогенови нива са клинична изясня на хипогонадизма при жени. Хроничната употреба на опиоиди е първостепенна причина за това нарушение.

Проучване на Daniell и сътр. предоставя подобни данни при употреба на орални и трансдер-

мални опиати; менструацията прекъсва скоро след започване на лечение с дълго-действащи опиоиди. Авторът отбелязва сигнификантно понижение на адrenalната андрогенна продукция, което предполага, че опиоидите може да играят роля и за регулация на сексуалното либидо, като оказват влияние върху синтеза и на надбъбречните андрогени. Употребяващите хероин вероятно имат намалено сексуално желание и занижени сексуални възможности, но като цяло, ефектите на хроничното опиоидно лечение върху либидото и/или фертилитета при жени не са документирани в добре контролираните проучвания (27).

От няколко проучвания става ясно, че жени на 40-годишна възраст, или по-млади, изявяват остеопения и остеопороза като последствие от ранната менопауза, причинена от хроничната употреба на опиоиди. Проучване, базирано върху клиничен случай на Reddy и сътр., разглежда 37-годишна жена с анамнеза за остеопения и множествени фрактури. Пациентката е в аменорея със 7-годишна давност, настъпила след като започнала прием на високи дози морфин сулфат (над 220 мг/дневно) (28). Това, което прави впечатление от лабораторните резултати е концентрацията на ЛХ-0,1 IU/L (референтни стойности 2-10 IU/L), нивото на ФСХ 2,4 IU/L (референтни стойности 1,5-33 IU/L) и нивото на естрадиола <37 pmol/L (референтни стойности 40-1930 pmol/L). Това проучване отново доказва, че използването на морфин сулфат е основен фактор за развитието на хипогонадо-ропен хипогонадизъм. В този случай морфинът е продължен да се употребява поради тежката болка, но е назначена заместителна терапия с естроген и прогестерон, за да се превентира прогресията на остеопороза и за възстановяване на месечен цикъл (28).

При мъжете ефектите от приложението на дълго действащи опиоиди върху гонадният статус са проучени много по-задълбочено. Пристрастените към хероин показват сигнификантно понижаване на тестостероновите нива. Данните за нивата на тестостерона в различните проучвания са противоречиви. Освен намалена серумна концентрация на тестостерона, едно проучване документира промени в анализа на семенната течност при мъже, които са използвали хероин или метагон (29). Базирайки се на референтните стойности на тестостероновото ниво за съответната здрава популация, 86% от мъжете, получаващи интратекално опиати за хронични болки, са с хипогонадизъм (13). Оралните опиоиди, включително метагонът, са асоциирани с хипогонадизъм при 89% от мъжете и

също така водят до занижени нива на естрадиол, дихидротестостерон, ЛХ и ФСХ (20, 21). Подобна честота на хипогонадизъм се открива при мъже, приемащи орални и/или трансдермални опиоиди (19). Тези проучвания доказват, че опиоидите, независимо от пътя на прием, водят до хипогонадизъм при мъжете в значителен процент.

Секс-свързващият протеин (SHBG) е повишен над референтните стойности при пристрастените към хероин, което води до ниски нива на свободен тестостерон, ефект който не е открит при мъже, приемащи дълго-действащи опиоиди (17). Имайки в предвид това, трябва да се проследяват SHBG и/или свободният тестостерон, в допълнение към нивото на общия тестостерон, за да се оцени правилно наличието на хипогонадизъм при мъжете, приемащи опиоиди. Този подход ще ограничи възможността случаите с долногранични или малко над долната референтна граница за нормално ниво на тестостерон да бъдат класифицирани като еугонадни, а те реално да са с хипогонадизъм.

Хроничната употреба на опиоиди при мъже за хроничен контрол на болката или пристрастени към хероин, морфин или метагон, води до симптоми, като забавена еякулация, еректилна дисфункция и сигнификантно редуциране на сексуалното либидо (30). Поставянето на опиоидни антагонисти, като например налтрексон, могат да подобрят симптомите на хипогонадизъм. Налтрексон подобрява еректилната функция за период от 7 до 15 дни, но при по-голяма част от изследваните ефектът не се задържа след прекратяване на приложението му. В относителни стойности, антагонистите не повишават тестостероновото ниво или нивото на ЛХ, което говори, че регулацията е на централно, а не на периферно ниво (31). Съществуват данни, че лечението с екзогенен тестостерон подобрява сексуалната функция при мъжете, изявили хипогонадизъм вследствие употреба на опиоиди (32). По-късни открития предполагат, че тестостероновото заместване може да бъде полезно за лечение на хипогонадизъм при пациенти от мъжки пол, използващи опиоиди, въпреки че е необходима допълнителна информация (33).

При мъжете тестостероновите нива спадат с възрастта, което се свързва и с преустройството на анатомичната структура на тялото, включвайки повишаване на телесната мазнина. Съществуват данни, че снижаването на тестостероновите нива вероятно се асоциира и със занижаване на когнитивните възможности. Необходими са допълнителни проучвания, за да се потвърдят тази връзка, както и потенци-

алните ползи от тестостеронова терапия. Към момента не е напълно ясно дали опиод-индуцираният хипогонадизъм е асоцииран с регрес в когницията и други общоизвестни клинични усложнения на хипогонадизма.

В допълнение, трябва да се отбележи, че видът на използваното опиодно лекарство влияе в различна степен върху изявата на хипогонадизъм. Изследвания за бупренорфин – частичен μ -опиоиден агонист, използван при лечение на опиоидни зависимости и като опиоиден аналгетик, доказват че този продукт се асоциира със значително по-високи тестостеронов нива и по-ниска честота на сексуална дисфункция в сравнение с метагона (33).

Предполага се, че опиоидите причиняват снижаване на тестостероновите нива и сексуална дисфункция по два механизма. Изследователите de la Rosa и Hennessey (34) предлагат теорията, че опиоидите водят до нарушения в пулсовата гонадотропинова секреция или оказват влияние върху отговора на предния дял на хипофизата към ГнРХ, като и двата механизма водят до понижение на тестостероновите нива. Морфинът потиска експресията на естрогеновите бета-рецептори – ефект, частично блокиран от налоксон или селективен μ -опиоиден антагонист – D-Pen-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂, показвайки замесването на μ -опиоидните рецептори в това действие на морфина (35). По-задълбоченото осъзнаване на хипогонадните ефекти на опиоидите може да доведе до преоценка на зависимостта към опиати от страна на употребяващите.

Опиоидите оказват различни ефекти при затлъстели лица и такива с нормална телесна маса. В проучвания на тежко затлъстели пациенти страдащи от хипогонадизъм, лечението с налоксон има за ефект по-чувствителен отговор към (ЛХ) при затлъстели мъже, което предполага, че ендогенните опиоиди може да играят потискаща роля върху секрецията на ГнРХ при обезитет (36).

Заклучение

Ефектите от приложението на екзогенните опиоиди, опиоидните аналози, ендогенните опиоидни пептиди върху ендокринната система са множествени. Специфичната рецепторна стимулация и времето на приложение играят съществена роля в способността опиоидите да повлияват хормоналните нива. Хроничното приложение на опиоиди има за резултат супресия на

половите стероиди, медирано главно чрез супресия на хипофизно (ЛХ и ФСХ) и хипоталамично ниво (ГнРХ). Установено е директен негативен ефект на гонадно ниво. Опиоидите имат изразен супресивен ефект върху сексуалното поведение, което изглежда се осъществява чрез активация на μ - и делта-рецепторите в медиалната преоптична зона и вентромедиалния хипоталамус. Опиоидните антагонисти могат да подобрат сексуалното поведение. Сензитивността към ефектите на опиоидите изглежда, че е по-изразена при мъжете, отколкото при жените.

Употребяващите опиати трябва да вземат в предвид не само основните последствия на това нарушения, а именно сексуалната дисфункция, но също така и ефектите на опиоидите върху останалата ендокриина система, които могат да имат късно изявен негативен ефект. Опиоидите могат да причинят и други ендокринни нарушения, като например хиперпролактинемия и хипертиреозидизъм. Необходимо е извършване на целенасочени проучвания, за да се хвърли светлина върху ендокринните и в частност репродуктивните нарушения, свързани с използването на опиоиди и пристрастяването към тях.

References

1. Baraka A. Historical aspects of opium. *MEJ Anaesthesiol* 2000; 15: 423–436.
2. Grossman A. Brain opiates and neuroendocrine function. *Clin Endocrinol Metab* 1983; 12: 725–746.
3. Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. Opioid receptors. *Annu Rev Biochem* 2004; 73: 953–990.
4. Manchikanti L. National drug control policy and prescription drug abuse: facts and fallacies. *Pain Physician* 2007; 10: 399–424.
5. Silberstein SD, McCrory DC. Opioids. *Cephalalgia* 2000; 20: 854–864.
6. International Society for the Study of Pain: Pain definition Derived from Bonica JJ. The need of a taxonomy. *Pain* 1979; 6(3): 247–248.
7. Institute of Medicine. Relieving Pain in America: A Blueprint for Transforming Prevention, Care, Education, and Research. Washington, DC: National Academies Press; 2011.
8. Hoffmann NG, Olofsson O, Salen B, Wickstrom L. Prevalence of abuse and dependency in chronic pain patients. *Int J Addict* 1995; 30: 919–927.
9. Genazzani AR, Genazzani AD, Volpogni C, Pianazzi F, Li GA, Surico N, Petraglia F. Opioid control of gonadotrophin secretion in humans. *Hum Reprod* 1993; 8 (Suppl 2): 151–153.
10. Howlett TA, Rees LH. Endogenous opioid peptides and hypothalamo pituitary function. *Annu Rev Physiol* 1986; 48: 527–536.
11. Finch PM, Roberts LJ, Price LS, Hadlow NC, Pullan PT. Hypogonadism in patients treated with intrathecal morphine. *Clin J Pain* 2000; 16(3): 251–4.

12. Paice JA, Penn RD, Ryan WG. Altered sexual function and decreased testosterone in patients receiving intraspinal opioids. *J Pain Symptom Manage* 1994; 9(2): 126-31.
13. Abs R, J Verhelst, J Maeyaert, Van Buyten JP, Opsomer F, Adriaensens H., et al. Endocrine consequences of long-term intrathecal administration of opioids. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(6): 2215-22.
14. Pfeiffer DG, Pefeiffer A. Opiate suppression of LH secretion involves central receptors different from those that mediating opiate effects on prolactin secretion. *J Endocrinol* 1987;13:469-476
15. Ipp E, Schusdzarra V, Harris V, Unger RH. Morphine induced hyperglycemia:role of insulin and glucagon. *Endocrinology* 1980;13:461-463
16. Roberts LJ, PM Finch, CR Goucke, Price LM. Outcome of intrathecal opioids in chronic non-cancer pain. *Eur J Pain* 2001; 5: 353-61.
17. Bolelli G, Lafisca S, Flamigni C, Lodi S, Franceschetti F, Filicori M., Mosca M. Heroin addiction: Relationship between the plasma levels of testosterone, dihydrotestosterone, androstenedione, LH, FSH, and the plasma concentration of heroin. *Toxicology* 1979; 15: 19-29.
18. Daniell HW. Narcotic-induced hypogonadism during therapy for heroin addiction. *J Addict Dis* 2002; 21(4): 47-53.
19. Fraser L-A, Morrison D, Morley-Forster P, Paul TL, Tokmakejian S, Larry Nicholson R, et al. Oral opioids for chronic non-cancer pain: Higher prevalence of hypogonadism in men than in women. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2009; 117: 38 - 43.
20. Rajogopal A, Vassilopoulou-Sellin R, JL Palmer, Kaur G, Bruera E. Hypogonadism and sexual dysfunction in male cancer survivors receiving chronic opioid therapy *J Pain Symptom Manage* 2003; 26(5): 1055-1061.
21. Rajogopal A, Vassilopoulou-Sellin R, JL Palmer, Kaur G, Bruera E. Symptomatic hypogonadism in male survivors of cancer with chronic exposure to opioids. *Cancer* 2004; 100(4): 851-858.
22. Daniell HW. Hypogonadism in men consuming sustained-action oral opioids. *J Pain* 2002; 3(5): 377-384.
23. Daniell HW. Opioid endocrinopathy in women consuming prescribed sustained-action opioids for control of nonmalignant pain. *J Pain* 2008; 9(1): 28-36
24. Roberts LJ, Finch PM, Pullan PT, Bhagat CI, Price LM. Sex hormone suppression by intrathecal opioids: A prospective study. *Clin J Pain* 2002; 18: 144-148.
25. Miller KK, Sesimo G, Schiller A, Schoenfeld D, Burton S, Klibanski A. Androgen deficiency in women with hypopituitarism. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(2):561-567.
26. Bachmann G, Oza D. Female androgen insufficiency. *Obstet Gynecol North Am* 2006; 33: 589-598.
27. Daniell HW. DHEAS deficiency during consumption of sustained action prescribed opioids: Evidence for opioid-induced inhibition of adrenal androgen production. *J Pain* 2006; 7(12): 901-907.
28. Reddy RG, Aung T, Karavitaki N, Wass JA. Opioid induced hypogonadism. *BMJ* 2010; 341: 605-6
29. Ragni G, De Lauretis L, Bestetti O, Sghedoni D, Gambaro V. Gonadal function in male heroin and methadone addicts. *Int J Androl* 1988; 11:93-100.
30. Cicero TJ. Opiate and opioid modulation of reproductive endocrinology in the male and female: development and pregestational aspects. *NIDA Res Monogr* 1984; 55:14-23.
31. Fabbri A, Jannini EA, Gnassi L, Moretti C, Ulisse S, Franzese A, et al. Endorphins in male impotence: evidence for naltrexone stimulation of erectile activity in patient therapy. *Psychoneuroendocrinology* 1989; 14:103-111.
32. Daniell HW, Lentz R, Mazer NA. Open-label pilot study of testosterone patch therapy in men with opioidinduced androgen deficiency. *J Pain* 2006; 7:200-210.
33. Hallinan R, Byrne A,AghoK,McMahonC, Tynan P, Attia J. Erectile dysfunction in men receiving methadone and buprenorphine maintenance treatment. *J Sex Med* 2008; 5:684-692.
34. de la Rosa RE, Hennessey JV. Hypogonadism and methadone: hypothalamic hypogonadism after long-term use of high-dose methadone. *Endocr Pract* 1996; 2:4-7.
35. Cadet P, Mantione K, Bilfinger TV, Stefano GB. Morphine down regulates human vascular tissue estrogen receptor expression determined by real-time RT-PCR. *Neuro Endocrinol Lett* 2002; 23:95-100.
36. Blank DM, Clark RV, Heymsfield SB, Rudman DR, Blank MS. Endogenous opioids and hypogonadism in human obesity. *Brain Res Bull* 1994; 34:571-574.

Address for correspondence:

Д-р Сава Петров

Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ – „Св. Георги“,
Ул. „Васил Априлов“ №15А, Пловдив – 4000,
e-mail: sava86@abv.bg

Dr. Sava Petrov,

Clinic of Endocrinology and metabolic diseases,
„Sv. Georgy“ University Hospital,
15A „Vassil Aprilov“ Str., 4000 Plovdiv
e-mail: sava86@abv.bg

Нарушения във въглехидратната обмяна при пациенти с метаболитен синдром

Раянова, Гинка Х.¹, Ганева, Силвия С.¹, Тодорова, Катя Н.¹, Луканов, Цветан Х.,² Гечева, Светла П.²

¹ Клиника по Ендокринология

² Медико-диагностична лаборатория по имунология

УМБАЛ „Д-р Георги Странски“, Медицински Университет, Плевен

Адрес за кореспонденция

Д-р Гинка Раянова

Клиника по Ендокринология, УМБАЛ „Д-р Георги Странски“

гр. Плевен 5800

ул. „Ген. Владимир Вазов“ №91

E-mail: grayanova@abv.bg

Резюме

Метаболитният синдром (МС) е съчетание от няколко различни клинични симптоми, които взаимно си влияят и при които се установява общ патогенетичен механизъм - инсулинова резистентност.

Цел на настоящето проучване е проследяване на въглехидратната обмяна и оценка на инсулиновата резистентност и бета-клетъчната функция при пациенти с МС.

Материал и методи: Изследвани са 153 лица с МС, лекувани в Клиниката по ендокринология гр. Плевен за период от 1 година. Според глюкозния толеранс пациентите са разпределени в две групи: първа група - лица с нормален глюкозен толеранс (нормален ГТ; $n_1=40$), втора група - лица с патологичен глюкозен толеранс (патологичен ГТ; $n_2=113$). Пациентите от втората група са разделени в три подгрупи: подгрупа 1 ($n_{2\text{ subgr.1}}=40$) лица с нарушена гликемия на гладно (НГГ), подгрупа 2 ($n_{2\text{ subgr.2}}=28$) лица с нарушен глюкозен толеранс (НГТ) и подгрупа 3 ($n_{2\text{ subgr.3}}=45$) лица с новооткрит захарен диабет тип 2 (НЗДт2). Два хомеостазни модела са използвани: за оценка на инсулиновата резистентност - НОМА-IR и за оценка на бета-клетъчната функция - НОМА-%В.

Резултати: От 153 изследвани лица нормален ГТ се установи при 40 (26,2%) и патологичен при 113 (73,8%) лица, от които с НГГ - 40 (26,1%), НГТ - 28 (18,3%) и НЗДт2 - 45 (29,4%). Пациентите с патологичен ГТ са по-възрастни от пациентите с нормален ГТ, като възрастта на тези с НЗДт2 ($49,2\pm 12,3$ г.) е сигнификантно по-висока от тази на пациентите с нормален ГТ, НГГ и НГТ. НОМА-IR на пациентите с НЗДт2 е сигнификантно по-висок от този на лицата с нормален ГТ, НГГ и НГТ. НОМА-%В на лицата с патологичен ГТ е по-нисък от този на лицата с нормален ГТ. При пациентите с НЗДт2 се установи значимо по-нисък НОМА-%В ($88,67\pm 34,96$) спрямо нормален ГТ, НГГ и НГТ.

Заключение: При пациентите с МС и патологичен ГТ се установяват паралелни промени в бета-клетъчната функция и инсулиновата резистентност, които най-рано се развиват при лица с НГГ.

Ключови думи: метаболитен синдром, въглехидратна обмяна, инсулинова резистентност, бета-клетъчна функция.

Развиващата се в последните години пандемия от захарен диабет тип 2 (ЗДт2) се свързва с нарастващата честота на метаболитния синдром (МС), наднорменото телесно тегло и затлъстяването. В САЩ и западно-европейските страни 35-40% от лицата отговарят на критериите за МС, като най-висока честота се наблюдава във възрастта над 60 години – до 58,4% за жените и до 44,5% за мъжете (1, 2). Данните за България показват честота на МС 30,8%, при мъжете в млада възраст (20-44г.) е установено най-високо разпространение, при жените най-често МС е диагностициран след 60-годишна възраст. Проучването е проведено през 2006г., диагнозата на МС е поставена по критериите на IDF, 2005 г. (3).

Метаболитният синдром е многофакторно заболяване, което включва в своята патогенеза висцерално затлъстяване и развиваща се инсулинова резистентност, водещи до хиперинсулинемия, дислипидемия, адипоцитна и ендотелна дисфункция, хронично съдово и тъканно възпаление, протромботично състояние (4).

Висцералното затлъстяване и инсулиновата резистентност при МС се последват от повишена честота на нарушения във въглеродния обмен. Пациентите с МС имат повишен риск за изява на захарен диабет тип 2. При пре-диабетните състояния – нарушена гликемия на гладно (НГГ) и нарушен глюкозен толеранс (НГТ) се установява 5-7 пъти по-висока честота на новооткрит захарен диабет тип 2 (НЗДт2) отколкото при нормален глюкозен толеранс (5, 6).

Цел на настоящето проучване е оценка на въглеродния обмен, инсулиновата резистентност и бета-клетъчната функция при пациенти с метаболитен синдром.

Материал и методи

В проучването са включени 153 лица (103 жени и 50 мъже) с МС, на средна възраст 42,65 ± 13,0 години, лекувани в Клиниката по ендокринология гр. Плевен през периода януари 2012г. - март 2013г. Диагнозата МС е поставена при наличието на 3 от посочените 5 критерии на Международната диабетна федерация (диагностични критерии за МС, IDF, 2010) (7) (Табл.1). Приложени са антропометрични методи- измерване на ръст и телесно тегло, определяне на индекс на телесна маса (ИТМ). Обиколката на талията (см) е измервана в хоризонталната равнина, намираща се по средата между долния ръб на 12-то ребро и горния ръб на илиачната кост, с точност до 0,5 см, като е приета средна стой-

Таблица 1.

Диагностични критерии за оценка на метаболитния синдром

Критерии за диагноза	Мъже	Жени
Обиколка на талията (см)	>94	> 80
Триглицериди (ммол/л)	≥1,7	≥1,7
HDL-холестерол (ммол/л)	<1,03	<1,29
Артериално налягане (mmHg)	≥130/85	≥130/85
Кръвна глюкоза на гладно (ммол/л)	≥ 5,6	≥ 5,6

ност от две измервания. Артериалното налягане (mmHg) е измервано в седящо положение при стандартни условия, след 5-минутна почивка, с интервал 5 минути между отделните измервания, приета е средна стойност от две последователни измервания. Наличието на артериална хипертония се прие при стойности ≥ 130 mm Hg за систолно и/или ≥ 85 mm Hg за диастолно артериално налягане, или прием на антихипертензивни медикаменти при пациенти с анамнеза за артериална хипертония. Въглеродният обмен е оценен чрез провеждане на орален глюкозотолерансен тест (ОГТТ) със 75g глюкоза. Кръвната глюкоза е проследена във венозна плазма на 0,60 и 120-та минута, като е използван глюкозооксидазен метод (Glucose Analyzer Beckman). Нивото на инсулина е измерено на 0,60 и 120-та минута в хода на ОГТТ по имуно-радио-метричен метод (IRMA) при референтни стойности 4,0-16,0 mIU/l. Изследван е липиден профил (общ холестерол, HDL – холестерол, LDL – холестерол, триглицериди) на гладно. Общият холестерол, HDL – холестерол и триглицеридите са изследвани по ензимно-колориметричен метод (GPO-PAP; Bioson® Diagnostik), LDL-холестеролът е изчислен по формулата на Friedewald (LDL-холестерол = общ холестерол – HDL-холестерол-триглицериди/2,2). Два хомеостазни модела (homeostasis model assessment methods) са използвани за оценка на инсулиновата резистентност – HOMA-IR и за оценка на бета-клетъчната функция- HOMA-%B. HOMA-IR = плазмена глюкоза на гладно (mmol/l) x серумен инсулин на гладно (mIU/l) / 22,5; HOMA-%B = 20 x серумен инсулин на гладно (mIU/l) / плазмена глюкоза на гладно (mmol/l) – 3,5 (8).

Обработката и анализът на данните са извършени с помощта на компютърна програма - статистически пакет за биостатистически анализ SPSS версия 17,0 (SPSS Chicago, USA). Изследваните показатели са представени като средна стойност ± SD или като пропорции, при всички анализи за ниво на статистическа значимост е прието P<0,05.

Резултати

Клиничната характеристика на изследваните пациенти е показана на Таблица 2. Всички лица, включени в проучването отговарят най-малко на 3 от посочените критерии на Международната диабетна федерация (IDF) от 2010 г. Според глюкозния толеранс пациентите са разпределени в следните две групи: първа група- лица с нормален глюкозен толеранс (нормален ГТ; $n_1=40$) при кръвна глюкоза на гладно $< 5,6$ mmol/l и втора група – лица с патологичен глюкозен толеранс

Таблица 2.

Клинична характеристика на изследваните пациенти

Показател	Пациенти с МС
Брой пациенти	153
Средна възраст (години)	42,65 ± 13,0
Индекс на телесна маса (кг/м ²)	35,52 ± 7,2
Обиколка на талията (см)	112,42 ± 15,02
Систолично артериално налягане (mmHg)	132,32 ± 17,62
Диастолично артериално налягане (mmHg)	85,01 ± 9,41
Кръвна захар на гладно (ммол/л)	6,47 ± 1,85
Общ холестерол (ммол/л)	5,21 ± 1,09
HDL-холестерол (ммол/л)	1,97 ± 0,2
LDL-холестерол (ммол/л)	3,83 ± 1,39
Триглицериди (ммол/л)	3,31 ± 0,16

(патологичен ГТ; $n_2=113$). Пациентите от втората група са разделени в три подгрупи: подгрупа 1 ($n_{2\text{ subgr.1}}=40$) лица с нарушена гликемия на гладно (НГГ), подгрупа 2 ($n_{2\text{ subgr.2}}=28$) лица с нарушен глюкозен толеранс (НГТ) и подгрупа 3 ($n_{2\text{ subgr.3}}=45$) лица с новооткрит захарен диабет тип 2 (НЗДт2). Лицата с кръвна глюкоза на гладно $\geq 5,6$ mmol/l и $< 7,0$ mmol/l са включени към групата на НГТ. В Таблица 3 е показана клиничната характеристика на изследваните лица в отделните групи- нормален ГТ, НГГ, НГТ и НЗДт2. Резултатите показват нормален ГТ при 26,2%; при значително по-голям брой от изследваните - 73,8% се установяват отклонения във въглеродния обмен ($P<0,05$). Най-голяма е групата на НЗДт2 - 45 (29,4%), следвана от групата с НГГ- 40 (26,1%), най-малък е броят на пациентите с НГТ - 28 (24,78%). Средната възраст на включените в проучването лица е 42,65 ± 13,0 години. Пациентите с патологичен ГТ са по-възрастни от тези с нормален глюкозен толеранс, като

възрастта на лицата с НЗДт2 е сигнификантно по-висока от тази на пациентите с нормален ГТ, НГГ и НГТ. Средният индекс на телесна маса (ИТМ) на наблюдаваните пациенти е 35,52±7,2 кг/м². Лицата с патологичен глюкозен толеранс имат сходен ИТМ с тези с нормален глюкозен толеранс. Не се доказва сигнификантно значима разлика в обиколката на талията между отделните групи, но и при трите групи с отклонения в глюкозния толеранс се установи по-голяма обиколка на талията. В групата с нормален ГТ се установи ниво на базален инсулин в референтни граници- 12,79±2,74 mIU/l. При всички изследвани лица с патологичен глюкозен толеранс базалната инсулинемия е по-висока в сравнение с тези с нормален ГТ. Най-високо ниво на базален инсулин имат пациентите с НЗДт2. При съпоставяне на инсулиновата секреция при двете предиабетни състояния нивото на базален инсулин е по-високо при тези с НГГ, отколкото при НГТ (Табл. 4). Лицата с патологичен ГТ имат сигнификантно по-изразена инсулинова резистентност от тези с нормален ГТ ($P<0,05$). Установи се статистически значима разлика при сравняване стойностите на HOMA-IR НЗДт2 и при тези с нормален ГТ, НГГ и НГТ (Табл. 4). Показателят за β -клетъчна функция (HOMA-%В) при лицата с патологичен ГТ е сигнификантно по-нисък от този при лицата с нормален ГТ ($P<0,05$). При пациентите с НЗДт2 се установи значително по-нисък HOMA-%В спрямо двете предиабетни състояния- НГГ и НГТ ($P<0,05$). Участниците в проучването от групата с НГГ имат по-нисък показател на HOMA-%В от тези с НГТ (Табл. 4).

Обсъждане

Резултатите от настоящето изследване, проведено при пациенти с метаболитен синдром показват висока честота на патологичен глюкозен толеранс - 73,80%. Установи се в най-висок процент НЗДт2 - 29,4%, НГГ се наблюдава при 26,1%, а по-малка група имат НГТ - 24,78%, което е в подкрепа на литературните данни за петкратно по-висок риск на изява на захарен диабет тип 2 при лица с метаболитен синдром (9, 10). През 2011г. честотата на захарния диабет в различните части на света достига 3-10%, в България е установена честота на заболяването 8,37% (9, 11). Нашите резултати потвърждават данните от проучване, проведено сред неподбрана българска популация през 2006 г. с участие на лица с МС, при които са диагностирани нарушения във въглеродния обмен при 73,88 % от

Таблица 3.

Клинична характеристика на пациентите в групите според глюкозния толеранс

Показател	Нормален ГТ (n=40)	НГТ (n=40)	НГТ (n=28)	НЗДм2 (n=45)	P
Средна възраст (години)	32,83 ± 8,74	44,93 ± 13,34	43,11 ± 10,91	49,22 ± 12,32	P<0,05*#v
Индекс на телесна маса (кг/м ²)	33,33 ± 6,73	34,03 ± 5,92	37,10 ± 9,00	34,83 ± 5,92	NS
Обиколка на талията (см)	109,65 ± 14,89	112,95 ± 19,28	113,39 ± 19,28	112,64 ± 12,92	NS
Систолично артериално налягане (mmHg)	126,88 ± 16,71	137,13 ± 19,58	135,0 ± 8,05	131,22 ± 15,23	NS
Диастолично артериално налягане (mmHg)	84,0 ± 9,62	85,62 ± 7,94	87,86 ± 9,07	83,56 ± 10,42	NS
Кръвна захар на гладно (ммол/л)	4,80 ± 0,49	6,18 ± 0,40	5,50 ± 0,73	8,82 ± 1,50	P<0,05*v
Общ холестерол (ммол/л)	4,90 ± 0,93	5,30 ± 1,09	5,25 ± 1,06	5,40 ± 1,21	NS
HDL-холестерол (ммол/л)	1,02 ± 0,17	1,03 ± 0,40	1,36 ± 0,66	1,06 ± 0,35	NS
LDL-холестерол (ммол/л)	3,32 ± 0,79	3,44 ± 0,99	3,26 ± 1,01	3,21 ± 1,01	NS
Триглицериди (ммол/л)	1,44 ± 0,30	1,76 ± 0,4	2,12 ± 0,40	2,52 ± 0,40	P<0,05*

* сигнификантна разлика между нормален ГТ и НЗДм2

сигнификантна разлика между НГТ и НЗДм2

v сигнификантна разлика между НГТ и НЗДм2

Таблица 4.

Базален инсулин, HOMA-IR, HOMA-%B

Показател	Нормален ГТ (n=40)	НГТ (n=40)	НГТ (n=28)	НЗДм ² (n=45)	P
Базален инсулин (mIU/l)	12,79±2,74	17,94±7,87	16,79±2,82	19,22±5,87	NS
HOMA-IR	2,63±0,55	3,84±0,53	4,16±0,81	7,01±1,86	P<0,05*#v
HOMA-%B	249,3±105,3	112,79±53,0	204,15±68,80	88,67±34,96	P<0,05*#v

* сигнификантна разлика между нормален ГТ и НЗДм2

сигнификантна разлика между НГТ и НЗДм2

v сигнификантна разлика между НГТ и НЗДм2

участниците, НЗДм2 – при 22,8%, НГТ при 22,7%. Диагнозата МС е поставена по критериите на IDF от 2005 г. (3). Мета-анализ на 4 големи епидемиологични проучвания, включващи пациенти с МС (the Framingham Offspring, San Antonio Heart, Mexico City Diabetes, Insulin Resistance Atherosclerosis) установява по-висока честота на НГТ – при 37-41% от изследваните лица, отколкото НГТ – при 16-26% от случаите (12). Тези разнородни данни за честотата на НГТ могат да се обяснят с различните критерии, използвани за определяне на долна граница за нарушена гликемия на гладно, съответно 5,6 или 6,1 mmol/l. С напредване на възрастта нараства честотата

на патологичния ГТ, като лицата с НЗДм2 са значимо по-възрастни от тези с нормален ГТ, НГТ и НГТ (Табл. 3). Подобни данни са наблюдавани и в други проучвания при пациенти с МС (3, 13, 14). Най-вероятно причините за това са намаляване на инсулиновата секреция и повишаване на инсулиновата резистентност с покачване на възрастта.

При МС и нормален ГТ нивото на серумния инсулин е в референтни граници. При сравняване на двете предиабетни състояния имунореактивният инсулин е по-висок при НГТ спрямо нивото на серумен инсулин при НГТ, но не се доказва сигнификантна разлика (Табл. 4). Представа-

ните резултати не са в подкрепа на тезата за значимата роля на хиперинсулинемията в патогенезата на нарушенията във въглехидратния толеранс при МС (4, 14).

Наблюдава се нарастване на инсулиновата резистентност, оценена чрез индекса HOMA-IR при всички групи- нормален и патологичен глюкозен толеранс – НГТ, НГТ, НЗДт2 (Табл. 4). В групата с НЗДт2 инсулиновата резистентност е значимо по-изразена спрямо лицата с нормален ГТ, НГТ и НГТ. Предиабетните състояния показват по-висока инсулинова резистентност спрямо групата с нормален ГТ, както и значимо по-добра инсулинова чувствителност спрямо групата с НЗДт2. При сравняване на двете предиабетни състояния нашите изследвания не показват значима разлика в стойностите на HOMA-IR. Други изследователи също съобщават за еднаква степен на инсулинова резистентност при двете предиабетни състояния (12, 15). В някои проучвания са установени съществени различия в HOMA-IR при НГТ и НГТ, като се посочва значимо по-висок индекс при НГТ в сравнение с НГТ (4, 5).

При анализиране на базалната инсулинова секреция с помощта на HOMA-%В се установи сигнификантно ниска стойност при НЗДт2 спрямо нормален глюкозен толеранс и спрямо двете предиабетни състояния- НГТ и НГТ. Стойността на HOMA-%В при НГТ е сходна с тази при нормален глюкозен толеранс и е по-висока от тази при НГТ. Подобно на наблюдаваните от нас данни за намаление на базалната инсулинова секреция при НГТ е наблюдавано и в други проучвания, които съобщават за значимо снижение на HOMA-%В с около 40% при НГТ в сравнение с НГТ (16, 17). Получените резултати са в съответствие с публикуваните до момента данни за различни патофизиологични механизми, които са в основата на НГТ и НГТ, при НГТ се наблюдава предимно бета-клетъчна дисфункция, докато НГТ е предимно състояние, свързано с инсулинова резистентност (13, 18).

Резултатите от проведеното изследване показват изявата на захарен диабет тип 2 при МС като резултат от нарастваща инсулинова резистентност, следвана от базална хиперинсулинемия и прогресиращо намаление на бета-клетъчна функция. Данните от проучването сочат повишена инсулинова резистентност при МС без нарушения във въглехидратната обмяна. При МС и предиабет прогресиращата инсулинова резистентност се съпътства от покачване на базалната инсулинова секреция при съхранена бета-клетъчна функция. На този етап включването на медикаменти за намаляване на инсулиновата резистентност, както и промяната в на-

чина на живот могат да доведат до ранна профилактика на захарен диабет тип 2.

Инсулиновата резистентност и хиперинсулинемията при МС са състояния, не само свързани с наднормено телесно тегло, затлъстяване и повишена честота на нарушения във въглехидратната обмяна. Съчетанието на компонентите на МС водят до двукратно по-висок риск за изява на сърдечно-съдови заболявания, асоциират се с ранна атеросклероза, нарушена фибринолиза, дислипидемия, микроалбуминурия и заболявания като- синдром на поликистозни яйчници, неалкохолна стеатозен хепатит и неалкохолна стеатозна болест (NAFLD), ХОББ, канцерогенеза, acanthosis nigricans и psoriasis vulgaris (19, 20).

Заклучение

Метаболитният синдром е значим рисков фактор за изява на нарушения във въглехидратната обмяна – нарушена гликемия на гладно, нарушен глюкозен толеранс и захарен диабет тип 2. Промените в нивото на базалния инсулин, инсулиновата резистентност и бета-клетъчната функция се изявяват паралелно и най-рано се наблюдават при лица с метаболитен синдром и нарушена гликемия на гладно.

Научен проект №7/2012, финансиран от МУ-Плевен.

Disorders of the Carbohydrate Metabolism in Patients with Metabolic Syndrome

Rayanova, Ginka H.¹, Ganeva, Silvia S.¹, Todorova, Katya N.¹, Lukanov, Tsvetan H.², Gecheva, Svetla P.²

¹Clinic of Endocrinology

²Medico-diagnostic laboratory of immunology

„Dr. Georgi Stransky“ University Hospital, Medical University, Pleven

Address for correspondence:

Dr Ginka Rayanova

Clinic of Endocrinology

„Dr Georgi Stansky“ University Hospital

91 Gen.Vladimir Vazov str., 5800 Pleven

E-mail: grayanova@abv.bg

Abstract

The metabolic syndrome (MS) is a combination of some different interrelated clinical symptoms with a common pathogenesis - insulin resistance.

The aim of the present study was to investigate the carbohydrate metabolism and assess the insulin resistance and β -cells function in patients with metabolic syndrome.

Material and methods: A group of 153 subjects with MS were included in this prospective study. They were treated in Clinic of Endocrinology in Pleven for a period of 1 year. According to their glycaemic control the patients were divided into two groups: the first group - subjects with normal glycaemic tolerance (normal GT; $n_1=40$), the second group - subjects with pathological glycaemic tolerance (pathological GT; $n_2=113$). The second group was divided into three subgroups: subgroup 1 ($n_{2\text{ subgr.}n_1}=40$) - subjects with impaired fasting glycaemia (IFG), subgroup 2 ($n_{2\text{ subgr.}n_2}=28$) - subjects with impaired glucose tolerance (IGT) and subgroup 3 ($n_{2\text{ subgr.}n_3}=45$) - subjects with a newly-diagnosed diabetes mellitus (NDDM2). Two homeostatic models were used: the first to estimate insulin resistance-HOMA-IR and the second - to assess the β -cells function - HOMA-%B.

Results: Normal GT was found in 40 (26,2%) of all examined subjects and pathological GT - in 113 (73,8%), of whom IFG was found in 40 (26,1%), IGT - in 28 (18,3%) and NDDM2 - in 45 (29,4%). The subjects with pathological GT were older than those with normal GT. The age of the patients with NDDM2 ($49,2\pm 12,3$ ys) was significantly higher than that of the subjects with normal GT, IFG and IGT. The HOMA-IR was significantly higher in the subjects with NDDM2 than in those with normal GT, IFG and IGT. The HOMA-%B was significantly lower in the subjects with pathological GT than in those with a normal GT. ($n_{2\text{ subgr}1}=112,79\pm 53,0$, $n_{2\text{ subgr}2}=204,15\pm 68,8$; $n_{2\text{ subgr}3}=88,67\pm 34,96$ vs. $n_1=244,31\pm 105,32$; $P<0,05$). The subjects with NDDM2 had a significantly lower HOMA-%B ($88,67\pm 34,96$) in comparison to the subjects with normal GT, IFG and IGT.

Conclusion: A β -cells function decrease and an insulin resistance increase were observed in the metabolic syndrome with a pathological glycaemic control. Impaired fasting glycaemia is the earliest impairment of carbohydrate metabolism in the patients with the MS.

Key words: metabolic syndrome, carbohydrate metabolism, insulin resistance, β -cells function.

The pandemic of type 2 diabetes mellitus (Type 2 DM) developing in the recent years is associated with the increasing incidence of the metabolic syndrome (MS), overweight and obesity. In the USA and the West-European countries 35-40% of individuals meet the criteria for MS and the highest prevalence is reported among people at the age over 60 - up to 58,4% of women and up to 44,5% of men (1, 2). Recently reported data showed an MS prevalence in Bulgaria of 30,8%. The most affected groups were the young men (20-44 years old) and the women after the age of 60. The research was conducted in 2006 and the MS was diagnosed according to the criteria of IDF 2005 (3).

The metabolic syndrome is a multifactor condition, the pathogenesis of which includes visceral obesity and increasing insulin resistance resulting in hyperinsulinemia, dyslipidemia, adipocyte and endothelial dysfunction, a chronic vascular and tissue inflammation, a prothrombotic state (4).

MS-related visceral obesity and insulin resistance are followed by an increased prevalence of impaired carbohydrate tolerance. The patients with the MS are exposed to an increased risk of type 2 diabetes mellitus. A 5-7 times higher incidence of newly diagnosed type 2 diabetes mellitus is reported in subjects with the prediabetes conditions - impaired fasting glycaemia (IFG) and impaired glucose tolerance (IGT), as compared to subjects with a normal glucose tolerance (5, 6).

The purpose of this study was to assess the carbohydrate metabolism, the insulin resistance and the B-cell function in subjects with metabolic syndrome.

Material and methods

The study included 153 individuals (103 women and 50 men) with MS, at the mean age of $42,65 \pm 13,0$ years that were treated in the Clinic of Endocrinology, Pleven in the period January 2012 - March 2013. A MS was diagnosed if at least 3 of the specified 5 diagnostic criteria for MS of the International Diabetic Federation (IDF 2010) were met (7) (Table 1). Anthropometric measurements were taken - body height and body weight were measured and the body mass index (BMI) was calculated. The waist circumference (cm) was measured on the horizontal plain located in the middle between the lower edge of the 12-th rib and the iliac crest, with an accuracy of 0,5 cm; the average value of two measurements was taken. The arterial blood pressure (mmHg) was measured in a sitting position under standard conditions, after a 5-minute rest, at an interval of 5 minutes between two successive measurements. It was assumed that arterial hypertension was available at values ≥ 130 mmHg for the systolic and/ or ≥ 85 mmHg for the diastolic arterial pressure or if the subjects had a medical history of arterial hypertension or were taking anti-hypertensive

Table 1.

Diagnostic criteria for the metabolic syndrome

Diagnostic criteria	Men	Women
Waist circumference (cm)	>94	> 80
Triglycerides (mmol/l)	$\geq 1,7$	$\geq 1,7$
HDL-cholesterol (mmol/l)	<1,03	<1,29
Blood pressure (mm Hg)	$\geq 130/85$	$\geq 130/85$
Fasting blood glucose (mmol/l)	$\geq 5,6$	$\geq 5,6$

drugs. The carbohydrate metabolism was assessed by a standard oral glucose tolerance test (OGTT) with 75 g glucose. The blood glucose was measured in venous plasma at the 0, 60 and 120 minute by a glucose-oxidase method (Glucose Analyzer Beckman). The insulin level was measured at 0, 60 and 120 minute of the OGTT by the immuno-radio-metric method (IRMA) based on reference values 4,0-16,0 mIU/l. The lipid profile was assessed (total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides) in the fasting state. The total cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides were assessed by an enzyme-colorimetric method (GPO- PAP; Biocon® Diagnostik), LDL-cholesterol was calculated by the Friedewald formula ($\text{LDL-cholesterol} = \text{total cholesterol} - \text{HDL-cholesterol} - \text{triglycerides}/2,2$). Two homeostatic models (homeostasis model assessment methods) were used: HOMA-IR to assess the insulin resistance and HOMA-%B to assess the B-cell function. $\text{HOMA-IR} = \text{fasting plasma glucose (mmol/l)} \times \text{fasting serum insulin (mIU/l)} / 22,5$; $\text{HOMA-}\% \text{ B} = 20 \times \text{fasting serum insulin (mIU/l)} / \text{fasting plasma glucose (mmol/l)} - 3,5$ (8).

Data analysis and processing was done by SPSS version 17,0 (SPSS Chicago, USA). The studied indices were presented as a mean value \pm SD or as ratios, $P < 0,05$ was taken as level of statistical significance for all analyses.

Results

The clinical characteristics of the patients are presented in Table 2. All individuals included in the study meet at least 3 of the specified criteria of the International Diabetes Federation (IDF) of 2010.

According to the glucose tolerance, the patients were divided into the following two groups: Group 1 - individuals with a normal glucose tolerance (normal GT; $n_1=40$) with fasting blood glucose $<5,6$ mmol/l and Group 2 - individuals with a pathological glucose tolerance (pathological GT; $n_2=113$). The subjects in the second group were divided into three sub-groups: Subgroup 1 ($n_{2 \text{ subgr.1}}=40$) individuals with impaired fasting glycaemia (IFG), Subgroup 2 ($n_{2 \text{ subgr.2}}=28$) individuals with impaired glucose tolerance (IGT) and

Subgroup 3 ($n_{2 \text{ subgr.3}}=45$) individuals with a newly diagnosed type 2 diabetes mellitus (NDDM2). The individuals with fasting blood glucose $\geq 5,6$ mmol/l and $< 7,0$ mmol/l were included in the group of IFG. Table 3 shows the clinical characteristics of the individuals in the groups with normal GT, IFG, IGT and NDDM2. The glucose tolerance was normal in 26,2% of the patients. Disorders of the carbohydrate metabolism were identified in 73,8% of the patients ($P<0,05$). The largest group consisted of individuals with NDDM2 - 45 (29,4%), followed by the individuals with IFG - 40 (26,1%) and of the subjects with IGT - 28 (24,78%).

Table 2.

Clinical characteristics of the studied patients

Parameter	Patients with MS
Number of patients	153
Average age (years)	42,65 ± 13,0
Body mass index (kg/m ²)	35,52 ± 7,2
Waist circumference (cm)	112,42 ± 15,02
Systolic blood pressure (mmHg)	132,32 ± 17,62
Diastolic blood pressure (mmHg)	85,01 ± 9,41
Fasting blood glucose (mmol/l)	6,47 ± 1,85
Total cholesterol (mmol/l)	5,21 ± 1,09
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,97 ± 0,2
LDL-cholesterol (mmol/l)	3,83 ± 1,39
Triglycerides (mmol/l)	3,31 ± 0,16

The mean age of the individuals included in the study was 42,65±13,0 years. The patients with a pathological GT were older than those with a normal GT, and the age of the individuals with a NDDM2 was much higher than that of the patients with a normal GT, IFG and IGT. The mean body mass index (BMI) of the studied patients was 35,52±7,2 kg/m². The individuals with a pathological GT had similar BMI to those with normal GT. No significant difference in the waist circumference was found between the separate groups but for the three groups with disorders of the glucose tolerance higher waist circumference as compared to the group with normal GT was identified.

The basal (fasting) insulin levels were within the reference values - 12,79±2,74 mIU/l in the group with normal GT. All patients with pathological GT had fasting insulinemia higher than patients with a normal GT. Patients with a NDDM2 had the highest levels of basal insulin. When comparing the insulin secretion in the two prediabetic conditions, the fasting insulin level in the patients with IFG was higher than that in the patients

with IGT (Table 4). The patients with a pathological GT had significantly more pronounced insulin resistance than those with a normal GT ($P<0,05$). Statistically significant differences were found when comparing the HOMA-IR between the NDDM2 and the normal GT, IFG and IGT ($P<0,05$), (Table 4). The index of the β -cell function (HOMA-%B) in the patients with pathological GT was significantly lower than that in the individuals with a normal GT ($P<0,05$). We found a significantly lower HOMA-%B in the patients with a NDDM2 compared to the patients with the two prediabetic conditions - IFG and IGT ($P<0,05$). The subjects with IFG had lower index of HOMA-%B than those with IGT (Table 4).

Results

The results from this study conducted in patients with metabolic syndrome showed high prevalence of pathological glucose tolerance - 73,80%. The prevalence of the NDDM2 in the studied group was 29,4%, that of IFG - 26.1% and that of IGT - 24,78%, which is in conformity with the literature data demonstrating a five-fold higher risk of type 2 diabetes mellitus in individuals with the metabolic syndrome (9, 10). In 2011 the worldwide reported prevalence of diabetes mellitus all was 3-10%, while a recent study in Bulgaria showed a prevalence of 8,4% (9, 11). Our results confirm the data from the study conducted among a random Bulgarian population in 2006. The authors found disorders of the carbohydrate metabolism in 73,9% of the participants who complied with the criteria for an MS. A NDDM2 was present in 22,8% of these subjects and IGT- in 22,7%. The IDF 2005 criteria were applied for diagnosis of the MS (3). A meta-analysis of 4 big epidemiological trials including patients with MS (the Framingham Offspring Study, San Antonio Heart Study, Mexico City Diabetes Study, Insulin Resistance Atherosclerosis Study) reported higher incidence of IGT - in 37-41% of the tested individuals compared to IFG - in 16-26% of the cases (12). These diverse data on the IFG prevalence may be explained by the different criteria applied for the determination of the lower limit for impaired fasting glycaemia, respectively 5,6 or 6,1 mmol/l.

The prevalence of pathological glucose tolerance increases with advancing age, and the individuals with NDDM2 are considerably older than those with normal GT, IFG and IGT (Table 3). Similar data are observed in other studies including patients with MS (3, 13, 14). The most probable reasons are the reduction of the insulin secretion and increasing of the insulin resistance with the advancing age.

Increased immunoreactive fasting insulin level was identified in prediabetes and NDDM2. The serum insulin level was within the reference limits in MS with

Table 3.

Clinical characteristics of the groups according to the glucose tolerance

Parameter	Normal GT (n=40)	IFG (n=40)	IGT (n=28)	NDDM2 (n=45)	P
Mean age (years)	32,83 ± 8,74	44,93 ± 13,34	43,11 ± 10,91	49,22 ± 12,32	P<0,05*#v
Body mass index (kg/m ²)	33,33 ± 6,73	34,03 ± 5,92	37,10 ± 9,00	34,83 ± 5,92	NS
West circumference (cm)	109,65 ± 14,89	112,95 ± 19,28	113,39 ± 19,28	112,64 ± 12,92	NS
Systolic blood pressure (mmHg)	126,88 ± 16,71	137,13 ± 19,58	135,0 ± 8,05	131,22 ± 15,23	NS
Diastolic blood pressure (mmHg)	84,0 ± 9,62	85,62 ± 7,94	87,86 ± 9,07	83,56 ± 10,42	NS
Fasting blood glucose (mmol/l)	4,80 ± 0,49	6,18 ± 0,40	5,50 ± 0,73	8,82 ± 1,50	P<0,05*v
Total cholesterol (mmol/l)	4,90 ± 0,93	5,30 ± 1,09	5,25 ± 1,06	5,40 ± 1,21	NS
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,02 ± 0,17	1,03 ± 0,40	1,36 ± 0,66	1,06 ± 0,35	NS
LDL-cholesterol (mmol/l)	3,32 ± 0,79	3,44 ± 0,99	3,26 ± 1,01	3,21 ± 1,01	NS
Triglycerides (mmol/l)	1,44 ± 0,30	1,76 ± 0,4	2,12 ± 0,40	2,52 ± 0,40	P<0,05*

* indicates significant difference between Normal GT and NDDM2

indicates significant difference between IFG and NDDM2

v indicates significant difference between IGT and NDDM2

Table 4.

Basal insulin, HOMA-IR, HOMA-%B

Parameter	Normal GT (n=40)	IFG (n=40)	IGT (n=28)	H3Δm2 (n=45)	NDDM2
Basal insulin (mIU/l)	12,79±2,74	17,94±7,87	16,79±2,82	19,22±5,87	NS
HOMA-IR	2,63±0,55	3,84±0,53	4,16±0,81	7,01±1,86	P<0,05*#v
HOMA-%B	249,3±105,3	112,79±53,0	204,15±68,80	88,67±34,96	P<0,05*#v

* indicates significant difference between Normal GT and NDDM2

indicates significant difference between IFG and NDDM2

v indicates significant difference between IGT and NDDM2

normal GT. The hyperinsulinemia was most pronounced in the patients with MS and NDDM2. As comparing the two prediabetic conditions, the level of the serum insulin was higher in IFG than in IGT, however the difference did not reach significance (Table 4). Our results support the thesis for the significant role of hyperinsulinemia in the pathogenesis of the carbohydrate disorders in MS (4, 14).

Insulin resistance, assessed by the HOMA-IR, was observed in all groups with normal and pathological GT (IFG, IGT, NDDM2) (Table 4). In the patients with NDDM2, the insulin resistance was significantly more pronounced compared to the individuals with normal GT, IFG and IGT. The groups with prediabetic conditions showed higher insulin resistance than the group with normal GT and significantly better insulin sensitivity than the group with NDDM2. Our study did not show significant difference between HOMA-IR of the two prediabetes groups. Other researchers also report similar degree of insulin resistance in patients with the

two prediabetic conditions (12, 15). Some authors report significantly higher HOMA-IR in IGT than in IFG subjects (4, 5).

The analysis of the basal insulin secretion with the help of the HOMA-%B showed significantly lower value in the NDDM2 compared to both the normal GT and the two prediabetic conditions - IFG and IGT. The value of HOMA-%B in the IGT cases was similar to that in the cases with normal GT and was higher than that in the cases with IFG. Data for a reduction in the basal insulin secretion in IFG, similar to ours, were observed in other studies, that report a reduction of HOMA-%B by about 40% in IFG cases as compared to IGT cases (16, 17). The obtained results correspond to the data published so far on different pathophysiological mechanisms, that might contribute to IFG and IGT. IFG is related to a predominantly B-cell dysfunction, while IGT is a condition associated basically with insulin resistance (13, 18).

The results from our study point to an occurrence of type 2 diabetes mellitus in patients with MS as a result of increasing insulin resistance followed by basal hyperinsulinemia and progressive reduction in the B-cell function. The data indicate also to insulin resistance in the patients with MS without carbohydrate disorders. The progressive insulin resistance in MS and prediabetes is accompanied by an increasing basal insulin secretion with a preserved B-cell function. In this phase the inclusion of drugs for reduction of the insulin resistance, as well as certain lifestyle changes might result in an early prophylaxis of type 2 diabetes mellitus.

The overweight, obesity and increased incidence of carbohydrate disorders are not the only conditions associated with the insulin resistance and the hyperinsulinemia in the MS patients. The combination of the components of the MS result in a two-fold increase in the risk of cardiovascular diseases. They are associated

with an early atherosclerosis, impaired fibrinolysis, dyslipidemia, microalbuminuria and disorders such as the polycystic ovary syndrome, the non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), chronic obstructive lung disease, carcinogenesis, acanthosis nigricans and psoriasis vulgaris (19,20).

Conclusion

The metabolic syndrome is a major risk factor for disorders of the carbohydrate metabolism - impaired fasting glycaemia, impaired glucose tolerance and type 2 diabetes mellitus. The changes in the basal insulin levels, the insulin sensitivity and the B-cell function occur in parallel and are observed earliest in individuals with the metabolic syndrome and impaired fasting glycaemia.

Research project №7/2012, financed by the Medical University, Pleven.

References

1. Cowie C, Rust K, Ford E, Eberhardt M, Holt D, Li C et al. Full accounting of diabetes and prediabetes in the U.S. population in 1988-1994 and 2005-2006. *Diabetes Care*. 2009; 32(2): 287-294.
2. Ford E, Gilesand W, Mokdad A. Increased prevalence of metabolic syndrome among US adults. *Diabetes Care*. 2004; 27(10): 2444-2449.
3. Borissova A-M, Kovatcheva R, Shinkov A, Atanassova I, Vukov M, Aslanova N et al. Prevalence and features of the metabolic syndrome in unselected Bulgarian population. *Endocrinologia*. 2007; 2: 68-77 (in Bulgarian).
4. Pudata V, Konduru J. Metabolic syndrome and endocrine system. *Journal of Diabetes and Metabolism*. 2011; 9: 2-9.
5. Grundy M. Prediabetes, metabolic syndrome and cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol*. 2012; 59(7): 635-643.
6. Lee J, Ma S, Heng D, Tan C-E, Chew S-K, Hughes K et al. Should central obesity be an optional or essential component of the metabolic syndrome? *Diabetes Care*. 2007; 30(2): 343-347.
7. International Diabetes Federation: The IDF Consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. 2010.
8. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cells function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia*. 1985; 28: 412-419.
9. International Diabetes Federation: IDF Diabetes Atlas, 5th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation. 2011.
10. Rajesh T-M, Defilippis A, Blumenthal R, Blaha M. A practical approach to the metabolic syndrome: review of current concept and management. *Current Opinion in Cardiology*. 2010; 25: 502-512.
11. Borissova A-M, Shinkov A, Vlahov J, Dakovska L, Blajeva E, Todorov T. Prevalence of diabetes mellitus and prediabetes in Bulgaria today. *Endocrinologia*. 2012; 4: 182-193 (in Bulgarian).
12. Meigs J, Rutter M, Sullivan L, Fox C, Agosino R, Wilson P. Impact of insulin resistance on risk of diabetes and cardiovascular disease in people with metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2007; 30(5): 1219-1225.
13. Gayoso-Diz P, Garcia F, Francisco A, Gonzalez A, Alvarez M. Insulin Resistance (HOMA-IR) cut-off values and the metabolic syndrome in a general adult population: effect of gender and age: EPIRCE cross-sectional study. *BMC Endocrine Disorders*. 2013, 1(6): 531-536.
14. Song Y, Manson J, Tinker L, Howard B, Kuller L, Nathan L et al. Insulin sensitivity and insulin determined by homeostasis model assessment (HOMA) and risk of diabetes in a multiethnic cohort of women. *Diabetes Care*. 2007; 30(7): 1747-1752.
15. Esteghamati A, Ashraf H, Khalilzadeh O, Zandieh A, Nakhjavani M, Rashidi A et al. Optimal cut-off of homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) for the diagnose of metabolic syndrome: third national surveillance of risk factors of noncommunicable diseases in Iran (Su-RENC-2007). *Nutrition and Metabolism* 2010; 7: 26-34.
16. Garg MK, Dutta MK, Mahalle N. Study of beta-cells function (by HOMA model) in metabolic syndrome. *Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2011; 15 (Suppl.1): S44-S49.
17. Geloneze B, Vasques A, Stable C, Pareja J, Rosado L, Queiroz E et al. HOMA 1-IR and HOMA 2-IR indexes in identifying insulin resistance and metabolic syndrome- Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS). *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009; 53(2): 281-287.
18. Margina D, Vladica M, Danculescu R, Gradinaru D, Mitrea N. Comparison of different assessment models of insulin resistance in Romanian obese patients. *Farmacologia*. 2009; 57(6): 771-720.
19. Shoelson E, Lee S, Goldfine B. Inflammation and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*. 2006; 116(7): 1793-1801.
20. Souza C, Dalzochio M, Oliveira F, Neumann S, Gross J, Leitao C. Glucose tolerance status is a better predictor of diabetes and cardiovascular outcomes than metabolic syndrome: a prospective cohort study. *Dialectology and Metabolic Syndrome* 2012; 4(1): 25-32.

Асиметричен диметил-аргинин при жени с метаболитен синдром и синдром на поликистозни яйчници

Колева, Даниела Ив.¹, Орбецова, Мария М.¹, Денева, Таня И.²

¹ Клиника по Ендокринология и болести на обмяната,

² Катедра по Клинична лаборатория, УМБАЛ „Св. Георги“, МУ – Пловдив

Address for correspondence:

Д-р Даниела Колева,

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

Ул. „Васил Априлов“ №15А, Пловдив – 4000,

e-mail: nelka_medicine@abv.bg

Abstract

Цел на проучването: да се сравнят плазмените нива на асиметричен диметил-аргинин (ADMA) при жени с метаболитен синдром (МС), жени със синдром на поликистозни яйчници (PCOS) и съответни по възраст клинично здрави жени и да се анализира наличието на взаимовръзка между нивата на ADMA и метаболитните отклонения, включително инсулиновата резистентност (ИР) при носителките на двата синдрома.

Материал и методи: Проучването обхваща 24 жени с метаболитен синдром (МС) на възраст 16-39 години, 38 жени с PCOS на възраст 16-35 години и 24 съответни по възраст клинично здрави жени. На всички участнички в проучването са проведени следните клинични измервания и лабораторни изследвания: тегло, ръст, обиколка на талия, систолно и диастолно артериално налягане (АН), плазмена глюкоза, имунореактивен инсулин (ИРИ), ADMA, общ холестерол, HDL-холестерол, триглицериди. Изчислявани са индекс на телесна маса (ИТМ) и индекс на инсулинова резистентност (НОМА-IR).

Резултати: При жените с МС и с PCOS се установяват съпоставими плазмени нива на ADMA ($0,91 \pm 0,32 \mu\text{mol/l}$, респ. $0,82 \pm 0,37 \mu\text{mol/l}$, $P > 0,05$), сигнификантно по-високи в сравнение с тези при здравите контроли ($0,65 \pm 0,35 \mu\text{mol/l}$, $P < 0,05$). Не се открива сигнификантна корелация между ADMA и съответно възраст, ИТМ, обиколка на талия, плазмена глюкоза и ИРИ, НОМА-IR, липидни показатели и систолно АН както при жените с МС, така и при тези с PCOS. При жените с МС, за разлика от тези с PCOS, диастолното АН показва отрицателна сигнификантна корелация с ADMA.

Заключение: По-високите стойности на ADMA при изследваните пременопаузални жени с МС и PCOS са индикатор за повишен сърдечно-съдов риск при носителките на тези две заболявания в сравнително млада възраст. Липсата на корелация на ADMA с показателите на ИР и метаболитните отклонения в настоящото проучване потвърждава необходимостта от целенасочени изследвания в търсене на взаимовръзка между отделните маркери на атерогенен риск.

Ключови думи: асиметричен диметил-аргинин – метаболитен синдром – синдром на поликистозни яйчници – инсулинова резистентност – липидни показатели

Въведение:

Метаболитният синдром (МС) се характеризира с наличието на абдоминално затлъстяване, въглехидратни нарушения, вкл. захарен диабет (ЗД) тип 2, дислипидемия, артериална хипертония, хиперурикемия, хиперхомоцистеинемия. Има убедителни доказателства, че ендотелната дисфункция също е компонент на МС и се наблюдава често при пациенти със ЗД тип 2 (1). Синдромът на поликистозни яйчници (PCOS) от своя страна се асоциира в значителен процент от случаите със затлъстяване, инсулинова резистентност (ИР), дислипидемия и хипертония, като рискът от развитие на ЗД тип 2 и сърдечно-съдови заболявания с напредване на възрастта

е повишен (2, 3). Предполага се, че освен ИР за сърдечно-съдовите при младите жени с PCOS допринася и хиперандрогенията (4, 5).

Произлизаният от ендотела азотен окис (NO), който се синтезира от L-аргинина с помощта на NO-синтетаза (eNOs), представлява важен регулатор на съдовата хомеостаза. Освен че е силен вазодилатор, NO играе ролята и на инхибитор за адхезията на редица инфламаторни клетки към съдовата стена. Той потиска процесите на агрегация на тромбоцитите и на пролиферацията на гладкомускулните клетки (6). Инактивирането и/или нарушената синтеза на NO се среща често при пациенти с налични рискови фактори за сърдечно-съдови заболявания (ССЗ) и може да доведе до развитие на ендотелна дисфункция, хипертония, тромбоза и атерогенеза.

Асиметричният диметил-аргинин (ADMA), вторичен продукт на клетъчния протеинов търновър, представлява компетативен ендоген инхибитор на eNOS. Счита се, че повишените серумни нива на ADMA иницират процеса на атеросклероза, водят до поява на ендотелна дисфункция и ССЗ (7, 8). Повишени плазмени нива на ADMA са доказани при пациенти със ЗД, хиперхолестеролемиа, хипертриглицеридемиа, хипертония, прееклампсия, периферна съдова болест, конгестивна сърдечна недостатъчност, остър коронарен синдром (3, 9-11).

Целта на настоящото проучване е да се сравнят плазмените нива на асиметричен диметил-аргинин (ADMA) при жени с метаболитен синдром (МС), жени със синдром на поликистозни яйчници (PCOS) и съответни по възраст клинично здрави жени и да се анализира наличието на взаимовръзка между нивата на ADMA и метаболитните отклонения, включително инсулиновата резистентност (ИР) при носителките на двата синдрома.

Материал и методи:

Настоящото сравнително проучване е проведено в Клиника по Ендокринология и болести на обмяната при УМБАЛ „Св. Георги“ – Пловдив. То обхваща 24 жени с доказан МС на възраст 16-39 г., ср. възраст 28,63±6,62 г., 38 жени с доказан PCOS на възраст 16-35 години, ср. възраст 24,18±5,01 г. и 24 съответни по възраст клинично здрави жени, ср. възраст 27,63±5,44 г., оформящи контролна група.

За целите на проучването на всички жени са извършени следните измервания: тегло, ръст, обиколка на талия, систолно и диастолно артериално налягане (АН). Обиколката на талията е определяна в хоризонталната равнина по средата между долния ръб на 12-то ребро и горния ръб

на илиачните гребени. Систолното и диастолното АН са измервани в седнало положение след минимум 5 минути покой. Кръвните проби за изследване базални нива на плазмена глюкоза, имунореактивен инсулин (ИРИ), ADMA, общ холестерол, HDL-холестерол, триглицериди са вземани след 12 часа нощно гладуване след подписване на информирано съгласие от участничките в проучването и са изработвани в стандартни условия в Централна клинична лаборатория при УМБАЛ „Св. Георги“, Пловдив.

Диагнозата МС е поставяна съгласно критериите на Международната Диабетна Федерация, а именно наличието на задължителен компонент централно затлъстяване (обиколка на талията ≥80 см за жени от Европейската раса) в съчетание с 2 от следните нарушения: *повишени триглицериди >1,7 ммол/л; понижен HDL-C <1,29 ммол/л за жени или специфично лечение; повишено артериално налягане ≥130/85 mmHg или лечение на диагностицирана хипертония; повишена плазмена глюкоза на гладно ≥5,6 ммол/л или диагностициран ЗД тип 2/НГТ.* Диагнозата PCOS е поставяна съгласно Ротердамските критерии (2), според които трябва да са налице 2 от следните 3 характеристики: *олиго- и/или ановулация; клинична и/или биохимична хиперандрогения; установени чрез УЗД поликистозни яйчници (наличие на ≥12 фоликули с диаметър 2-9 mm и/или обем >10 cm³).*

Проведени са изследвания на редица хормони (андрогени, гонадотропини, естрадиол, пролактин, ТСХ, св.Т4, серумен кортизол в 8 ч. и 22 ч.) с диагностична цел, както и с цел изключване на бременност и налична друга ендокринна патология: синдром на Cushing, ВНКХ, пролактином, хипопитуитаризъм, хипо-/хипертиреозидизъм, хипогонадизъм, андрогенсекретиращи тумори и пр. Венозни проби за отчитане на хормоналните показатели са вземани рано сутрин след 12-часов период на нощно гладуване в ранна фоликуларна фаза (1-5 ден) от менструалния цикъл.

Плазмените нива на ADMA са отчитани по ELISA метод (DLD Diagnostica GmbH, Germany) със следните характеристики: *intra-assay imprecision – CV < 8,2%, interassay imprecision – CV < 11,2%; accuracy – d% < 8,0%; recovery – 92,7%.* Инсулинът е изследван чрез комерсиален кит за количествено определяне на имунореактивен инсулин на базата на микрочастичен имуноензимен анализ (MEIA) с помощта на AxSYM system (ABBOTT, USA) със следните характеристики: *sensitivity ≤ 0,8 μIU/ml; inter assay variation, CV% < 2,9; intra assay variation, CV% < 5,3.* Серумното ниво на общия холестерол е определяно чрез ChOD, PAP, на триглицеридите – чрез GPO, PAP, на HDL-холестерола

- чрез MgSO₄-dextran SO₄ преципитация (Schneiders Analysers; Netherlands test; Delta Kone Auto-analyser). Серумните нива на кръвната захар са измервани с помощта на стандартен GOD-POD метод. Хормоналните тестове са извършени с комерсиални китове AxSYM™ System (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA).

При всички пациенти са изчислявани ИТМ = $\text{тегло (кг)} / \text{р\ddot{о}ст (м)}^2$ и хомеостазен модел на инсулинова резистентност *HOMA-IR индекс* = $\text{кр\ddot{ъ}вна захар на гладно (ммол/л)} \times \text{ИРИ (}\mu\text{U/ml)} / 22,5$. Стойности на HOMA-IR индекс над 2 са определяни като показателни за наличие на ИР.

Статистическият анализ на резултатите е извършен с помощта на SPSS, версия 21,0 за Windows. За определяне нормалността на разпределение на величините е използван тестът на Колмогоров-Смирнов. Корелационният анализ е извършен с помощта на коефициента на Пирсън. Резултатите са представени като средна аритметична \pm стандартно отклонение. За всички сравнения е избрано ниво на значимост $P < 0,05$.

Резултати:

В Таблица 1 са представени клиничните и метаболитни характеристики на трите групи изследвани жени – 24 жени с МС, 38 жени с PCOS и 24 клинично здрави жени. Не се установява статистически значима разлика между групите по отношение на възраст, общ холестерол, HDL-холестерол, систолно и диастолно АН ($P > 0,05$). Обиколката на талията, ИТМ и серумните нива на триглицеридите са сигнификантно по-високи в групата с МС в сравнение с групата с PCOS и контролната група ($P < 0,05$). Не се открива сигнификантна разлика в обиколката на талията и ИТМ между жените с PCOS и клинично здравите жени. Откриваме сигнификантни разлики между жените от двете патологични групи и клинично здравите жени по отношение на плазмена глюкоза, ИРИ и HOMA-индекс, които при контролите са очаквано по-ниски (Табл.1).

Най-високи са плазмените нива на ADMA при жените с PCOS ($0,91 \pm 0,32 \mu\text{mol/l}$), като разликите по отношение на жените с МС са несигнификантни ($0,82 \pm 0,37 \mu\text{mol/l}$, $P > 0,05$). ADMA при носителките на МС и PCOS са сигнификантно по-високи спрямо тези при контролната група ($0,65 \pm 0,35 \mu\text{mol/l}$, $P < 0,05$) (Табл. 1).

Не се установява сигнификантна корелация между ADMA и съответно възраст, ИТМ, обиколка на талия, плазмена глюкоза и ИРИ, HOMA-IR, липидни показатели и систолно АН както при жените с МС, така и при тези с PCOS. При жените с МС, за разлика от тези с PCOS, диастолно-

то АН показва отрицателна сигнификантна корелация с ADMA (Табл. 2, Табл. 3).

Обсъждане:

През последните години значително нараства интересът към ADMA, явяващ се физиологичен регулатор на биосинтезата на NO – критичен фактор в патогенезата и прогресията на атеросклерозата. Високите нива на ADMA се свързват с патофизиологията на хиперхолестеролемията, хипертонията, ЗД, сърдечната, бъбречната и чернодробната недостатъчност (11-13). Връзката на ADMA със сърдечно-съдовата заболяемост и смъртност се потвърждава в няколко съвременни епидемиологични и проспективни клинични проучвания (14). ADMA се налага все повече като маркер за ендотелна дисфункция, кандидат за нов сърдечно-съдов рисков фактор или независим рисков фактор за сърдечно-съдовата заболяемост и смъртност. При метаболически синдром и PCOS се регистрират повишени нива на инфламаторните маркери и наличие на ендотелна дисфункция като ранен белег за сърдечно-съдово нарушение (15).

В тази връзка сме заложили като цел на настоящото проучване да се съпоставят плазмените нива на ADMA при жени в репродуктивна възраст, носителки на МС и PCOS, с тези при съответни по възраст клинично здрави жени, и да се потърси взаимовръзка връзка между ADMA и някои метаболитни показатели.

Нашите изследвания показват сигнификантно по-високи плазмени нива на ADMA при жените с МС и PCOS в сравнение с тези при жените от контролната група, като при PCOS е налице тенденция към по-високи стойности в сравнение с МС.

Данните ни са в подкрепа на резултатите от проучване на Dennis Heutling и сътр. (15), които изследват нивата на ADMA заедно с други сърдечно-съдови, метаболитни и хормонални параметри при жени с доказан PCOS и ефектите от лечение с метформин върху тези параметри. Включени са 87 жени с PCOS и 39 клинично здрави жени. Проучен е ефектът на метформин след 6-месечно лечение при 21 от жените с PCOS.

Установено е, че серумните нива на ADMA са значително по-високи при жените с PCOS в сравнение с тези от контролната група. HOMA-IR индекс, инсулин на гладно, гликиран хемоглобин, общ холестерол, LDL-холестерол, триглицериди и дебелина на интима-медиа слой са сигнификантно по-високи при жените с PCOS. Лечението с метформин намалява серумните нива на ADMA. При жените с PCOS ADMA корелира позитивно

Таблица 1.

Клинични и метаболитни характеристики на изследваните групи жени

Показатели	Групи жени		
	МС n=24	PCOS n=38	Контроли n=24
Възраст (год.)	28,63 ±6,62	24,18 ±5,01	27,63 ±5,44
Обиколка талия (см)	105,29a ±6,26	88,33b ±16,35	83,27b ±15,80
ИТМ (кг/м ²)	35,94a ±4,70	28,13b ±5,76	27,81b ±8,33
ADMA (μmol/l)	0,82a ±0,37	0,91a ±0,32	0,65b ±0,35
Кръвна захар (ммол/л)	5,13a ±0,69	5,14a ±0,73	4,74b ±0,55
IRI (μIU/ml)	12,99a ±5,08	11,75a ±6,18	5,79b ±1,85
НОМА-IR-индекс	3,02a ±1,39	2,78a ±1,75	1,24b ±0,46
Общ холестерол (ммол/л)	4,76 ±0,96	4,44 ±0,80	4,62 ±0,77
HDL-холестерол (ммол/л)	1,18 ±0,33	1,23 ±0,39	1,23 ±0,27
Триглицериди (ммол/л)	1,47a ±0,70	1,10b ±0,57	0,91b ±0,60
Систолно АН (mm Hg)	118,26 ±13,95	116,18 ±11,94	114,58 ±10,93
Диастолно АН (mm Hg)	73,91 ±11,58	73,55 ±10,78	74,58 ±6,42

Всички данни са представени като ср. аритм. ± станд. отклонение.

Обозначението с еднакви букви означава липса на сигнификантна разлика, P>0,05.

Обозначението с различни букви означава наличие на сигнификантна разлика, P<0,05.

с ИТМ, съотношението талия/ханш, параметрите за инсулинова чувствителност и дебелината на интима-медиа слой. Не се установява връзка между маркерите на възпаление – CRP и интерлевкин-6 (IL-6) и нивата на ADMA (15).

Противоречиви са резултатите от проучвания, насочени към изследване на връзката между плазмените нива на ADMA и степенята на ИР. Доста автори описват съществуването на позитивна корелация между НОМА-IR индекса и стойностите на ADMA при пациенти със синдром на ИР (6,16-18). Така, плазмените нива на ADMA са по-високи при жени със затлъстяване и ИР в сравнение с жени със затлъстяване и без налична ИР. Концентрациите на ADMA спадат в отговор на редукция на телесно тегло, съпрово-

Таблица 2.

Корелационни коефициенти между плазмени нива на ADMA и някои клинични и метаболитни показатели при жени с МС

Показатели	ADMA (r)	P
Възраст (год.)	0,046	> 0,05
Обиколка талия (см)	0,106	> 0,05
ИТМ (кг/м ²)	0,007	> 0,05
Кръвна захар (ммол/л)	0,068	> 0,05
IRI (μIU/ml)	-0,053	> 0,05
НОМА-IR индекс	-0,028	> 0,05
Общ холестерол (ммол/л)	0,170	> 0,05
HDL-холестерол (ммол/л)	0,264	> 0,05
Триглицериди (ммол/л)	-0,022	> 0,05
Систолно АН (mm Hg)	-0,350	> 0,05
Диастолно АН (mm Hg)	-0,464*	<0,05

Таблица 3.

Корелационни коефициенти между плазмени нива на ADMA и някои клинични и метаболитни показатели при жени с PCOS

Показатели	ADMA (r)	P
Възраст (год.)	-0,215	> 0,05
Обиколка талия (см)	-0,037	> 0,05
ИТМ (кг/м ²)	-0,074	> 0,05
Кръвна захар (ммол/л)	-0,184	> 0,05
IRI (μIU/ml)	-0,045	> 0,05
НОМА-IR индекс	-0,025	> 0,05
Общ холестерол (ммол/л)	0,080	> 0,05
HDL-холестерол (ммол/л)	0,036	> 0,05
Триглицериди (ммол/л)	0,051	> 0,05
Систолно АН (mm Hg)	0,100	> 0,05
Диастолно АН (mm Hg)	-0,072	> 0,05

дено с подобрене на инсулиновата чувствителност (16). Установена е строга зависимост между наличието на ендотелна дисфункция, серумните нива на андрогените и степенята на ИР при жени с PCOS (19).

При 3Д тип 1 и тип 2, както и при МС, освобождаването и биоактивността на NO са намалени (20). Въпреки хетерогенността в патогенезата на тези заболявания, всички те се характеризират с повишени плазмени нива на глюкоза – причина за нарушения в метаболизма на L-аргинин и NO. Биоактивността на NO може да се потисне поради наличие на оксидативен стрес - ре-

зултат от повишена продукция на супероксидни аниони в резултат на глюкозна автооксидация. Индуцираното от хипергликемията активиране на протеинкиназа C, последвано от активирането на фосфолипаза A2, води до повишена продукция на метаболити на арахидоновата киселина, притежаващи потенциални оксидативни ефекти. Счита се, че повишените плазмени нива на ADMA са свързани със състояния, представляващи компоненти на МС. Такива са хипертриглицеридемия, хипергликемия, хиперхомоцистеинемия и есенциална хипертония. Stuhlinger и сътр. в свое проучване установяват наличието на положителна връзка между нивата на ADMA и степента на ИР при група от 64 пациенти с МС без ЗД (21). Има доказателства, че лечението с инсулинов очувствител от групата на тиазолидиндионите (розиглитазон) подобрява инсулиновата чувствителност и води до намаление концентрациите на ADMA в плазмата (22).

В нашето проучване не се открива статистически значима корелация между плазмените нива на ADMA и възрастта, ИТМ, обиколката на талията, плазмената глюкоза, ИРИ и НОМА-индекса, изследваните липидни показатели, систолното АН и в двете патологични групи. Липсата на връзка между ADMA и степента на ИР се съобщава и от други автори (21, 23, 24). Неочаквано е наличието на отрицателна значима корелация между ADMA и диастолното АН при жените с МС, за разлика от тези с PCOS. Не винаги наличието на корелация, обаче, означава наличие на причинно-следствена връзка, както и обратно.

Високите плазмени нива на ADMA могат да бъдат второстепенно явление (епифеномен), придружаващо някои от нарушенията при налично предиабетно състояние. Към тези нарушения спадат по-високите кръвноразхарни нива – една добре позната причина за повишаване нивата на ADMA посредством увеличаване на вътреклетъчния оксидативен стрес и намаляване на активността на диметиларгинин диметиламинохидролаза (DDAH) (25). DDAH играе централна роля в процеса на деградация на ADMA, което означава, че всяко заболяване, водещо до намалена DDAH активност, би повишило концентрациите на ADMA в кръвта. Освен това индуцираните от хипергликемията процес на потискане активността на DDAH може да противодейства на стимулирания от хиперинсулинемията процес на „uptake“ на ADMA в клетките посредством свръхекспресия на катионни аминокиселинни транспортери (CAT) (26). Тази сложна взаимовръзка между двата противоположни ефекта на глюкозата и инсулина върху ADMA може да се

приеме като причина за описаните до момента противоречиви данни относно връзката между ADMA и ИР. Установено е, че индивидите с ИР са склонни както към състояние на хиперинсулинемия, така и към хипергликемия, като Eid и сътр. (27) описват появата на спад в нивата на ADMA по време на остра еугликемична хиперинсулинемия. Тези два явно противоположни ефекта на инсулина и глюкозата по отношение на екстрацелуларния ADMA вероятно водят до повишаване на интрацелуларните нива на ADMA (11).

Martin Carlsson и сътр. (28) също като нас не намират корелация между серумните нива на ADMA и инсулиновата чувствителност. Те предполагат, че ADMA изпълнява една по-сложна роля в развитието на ЗД, отколкото в това на атеросклеротична болест. Лечението с тиазолидиндионов препарат (розиглитазон) води до намаляване на плазмените нива на глюкоза и неестерифицирани мастни киселини (НЕМК) – индиректен, но ясен белег за увеличаване на инсулиновата чувствителност, което от своя страна не се съчетава с понижаване нивата на ADMA. Не е открита връзка между нивата на НЕМК и ADMA. Основното откритие в проучването са вариациите в серумните концентрации на ADMA през деня и повлияването им от приема на храна. Постпрандиалните нива на ADMA са с 10% по-високи в сравнение с тези преди прием на храна (28). В проучване на Paloto и сътр., включващо 48 пациента с установен МС и 37 клинично здрави лица, се установява, че плазмените нива на ADMA са статистически по-високи при пациентите с МС ($0,71 \pm 0,38$ vs. $0,48 \pm 0,28$ $\mu\text{mol/L}$, $P=0,0009$). В същото проучване, обаче, не се открива корелация между ADMA и следните компоненти на МС: артериално кръвно налягане, кръвна захар, триглицериди и HDL-холестерол (29).

Заклучение

В резултат на нашите изследвания се установиха по-високи стойности на ADMA при жените със състояния на ИР – МС и PCOS в сравнение с тези при клинично здрави жени на същата възраст. Дали това е показател за повишен риск от развитие на ендотелна дисфункция при жени с ИР или е само епифеномен, придружаващ предиабетното състояние, е въпрос от изключително голям интерес, чийто отговор изисква по-задълбочени бъдещи изследвания.

Asymmetric Dimethylarginine in Women with Metabolic Syndrome and Polycystic Ovary Syndrome

Koleva, Daniela Iv.¹, Orbetzova, Maria M.¹, Deneva, Tanya I.²

¹ Clinic of Endocrinology and metabolic diseases,

² Department of Clinical laboratory,
„Sv. Georgy“ University Hospital, Plovdiv, Medical University, Plovdiv

Адрес за кореспонденция

Dr Daniela Koleva,
Clinic of Endocrinology and metabolic diseases, „Sv. Georgy“ University Hospital,
15A „Vassil Aprilov“ Str., 4000 Plovdiv
e-mail: nelka_medicine@abv.bg

Резюме

Aim of the study was to compare the plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels in women with metabolic syndrome (MS), in women with polycystic ovary syndrome (PCOS), and in age-matched healthy women as well as to assess the relationship between ADMA levels and metabolic alterations including insulin resistance (IR) in the carriers of both syndromes.

Materials and methods: The study comprised of 24 women with MS, aged 16-39 years, 38 women with PCOS, aged 16-35 years, and 24 age-matched clinically healthy women. The following clinical measurements and laboratory tests were done in all participants in the study: weight, height, waist circumference, systolic and diastolic blood pressure, fasting plasma glucose, fasting immunoreactive insulin (IRI), ADMA, total cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides. Body mass index (BMI) and homeostasis model assessment insulin resistance index (HOMA-IR) were calculated.

Results: Comparable plasma levels of ADMA were found in the women with PCOS and MS ($0,91 \pm 0,32 \mu\text{mol/l}$ and $0,82 \pm 0,37 \mu\text{mol/l}$, respectively, $P > 0,05$). These levels were significantly higher than those in the healthy controls ($0,65 \pm 0,35 \mu\text{mol/l}$, $P < 0,05$). No significant correlations between ADMA and age, BMI, waist circumference, plasma glucose, IRI, HOMA-IR, lipid parameters and systolic blood pressure in the women with both MS and PCOS were found. In women with MS unlike those with PCOS the diastolic blood pressure showed a significant negative correlation with ADMA.

Conclusion: The higher levels of ADMA in the premenopausal women with MS and PCOS in our study indicate an increased cardiovascular risk in the carriers of these two syndromes at a relatively young age. The lack of a correlation of ADMA with the parameters of IR and the metabolic alterations in our study confirms the need for more studies to elucidate the relationship between the diverse markers of atherogenic risk.

Key words: asymmetric dimethylarginine - metabolic syndrome - polycystic ovary syndrome - insulin resistance - lipid parameters

Introduction:

The metabolic syndrome (MS) is characterized by the presence of abdominal obesity, carbohydrate disorders including diabetes mellitus (DM) type 2, dyslipidemia, hypertension, hyperuricemia, hyperhomocysteinemia. There is a strong evidence that endothelial dysfunction is also a component of MS and is frequent-

ly observed in patients with type 2 DM (1). The polycystic ovary syndrome (PCOS), on the other hand, is associated with obesity, insulin resistance (IR), dyslipidemia and hypertension in a significant percentage of cases, and the risk of developing type 2 DM and cardiovascular disease is increasing with age (2, 3). It is

Isuggested that beside the insulin resistance, the hyperandrogenemia contributes to the vascular damage in the women as well (4,5).

The nitric oxide (NO), which is synthesized in the endothelium by the NO-synthase (eNOs) from L-arginine, is an important regulator of vascular homeostasis. NO is a strong vasodilator and, furthermore, acts as an inhibitor of the adhesion of a number of inflammatory cells to the vascular wall. It inhibits the platelet aggregation and the smooth muscle cell proliferation (6). Inactivated and/or impaired NO synthesis is common in the carriers of risk factors for cardiovascular disease (CVD) and may lead to the development of an endothelial dysfunction, hypertension, thrombosis and atherogenesis.

The asymmetric dimethylarginine (ADMA), a byproduct of cellular protein turnover, is an endogenous competitive inhibitor of eNOS. It is believed that increased serum levels of ADMA promote the process of atherosclerosis, leading to the occurrence of endothelial dysfunction and CVD (7, 8). Elevated plasma levels of ADMA were demonstrated in patients with DM, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, hypertension, preeclampsia, peripheral vascular disease, congestive heart failure, acute coronary syndrome (3, 9-11).

The aim of this study was to compare the plasma levels of ADMA in women with MS, in women with PCOS and in age-matched clinically healthy women, as well as to search for a relationship between ADMA levels and some parameters of metabolic alterations, including insulin resistance (IR) in the carriers of both disorders.

Materials and methods:

The present study was conducted in the Clinic of Endocrinology and metabolic diseases at „Sv. Georgy“ University Hospital, Plovdiv. It comprised of 24 women with a diagnosed MS, aged 16-39 ys, mean age 28,63±6,62 ys, 38 women with proven PCOS, aged 16-35 ys, mean age 24,18±5,01 ys, and 24 age-matched clinically healthy women, mean age 27,63±5,44 ys, forming a control group.

In all study participants the following measurements were performed: body weight and height, waist circumference, systolic and diastolic blood pressure. Waist circumference was defined in the horizontal plane midway between the lower edge of the 12th rib and the top of the iliac crests. Systolic and diastolic blood pressures were measured in a sitting position after at least 5 minutes' rest. Blood samples for basal levels of plasma glucose, immunoreactive insulin (IRI), ADMA, total cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides were taken after an overnight 12-hour fast when an informed consent was signed. All the tests were performed in standard conditions in the central Clinical laboratory at „Sv. Georgy“ University Hospital, Plovdiv.

The diagnosis of MS was made according to the criteria of the International Diabetes Federation, when central obesity as a mandatory component was present (waist circumference ≥ 80 cm for Caucasian women) in combination with at least two of the following abnormalities: elevated triglycerides $>1,7$ mmol/l; decreased HDL-C $<1,29$ mmol/l or specific treatment; elevated blood pressure $\geq 130/85$ mmHg or treatment of already diagnosed hypertension; increased fasting plasma glucose $\geq 5,6$ mmol/l or diagnosed type 2 DM/IFG. The diagnosis of PCOS was made according to the Rotterdam criteria (2), when 2 of the following 3 features were present: oligo- and/or anovulation, clinical and/or biochemical signs of hyperandrogenism, and polycystic ovaries on ultrasound examination (the presence of ≥ 12 follicles measuring 2-9 mm in diameter and/or ovarian volume >10 cm³).

A comprehensive set of hormonal tests was done in all study participants (androgens, gonadotropins, estradiol, prolactin, TSH, free T₄, serum cortisol at 8 h and 22 h) for diagnostic purposes and in order to exclude pregnancy and/or other endocrine pathology: Cushing's syndrome, inherited adrenal hyperplasia, prolactinoma, hypo-/hyperthyroidism, hypopituitarism, hypogonadism, androgen secreting tumors, etc. Venous blood samples for the determination of the hormonal parameters were collected in the early morning hours after a 12-hour fast in the early follicular phase (days 1-5 of spontaneous bleeding). ADMA plasma concentrations were determined using ELISA assay (DLD Diagnostica GMBH, Germany) with the following major characteristics of analytic reliability: intra-assay imprecision - CV $<8,2\%$, inter-assay imprecision - CV $<11,2\%$; accuracy - d% $<8,0\%$; and recovery - 92,7%. Insulin was tested using a commercial kit for quantitative determination of immunoreactive insulin on the basis of microparticulate immunoenzyme analysis (MEIA) on an AxSYM system (ABBOTT, USA) with the following characteristics: sensitivity $\leq 0,8$ mIU/ml; inter-assay variation, CV% $< 2,9$; intra-assay variation CV% $<5,3$. Total cholesterol was determined by ChOD, PAP, triglycerides by GPO, PAP, and HDL-cholesterol by MgSO₄-dextran SO₄ precipitation, Schneiders Analysers; Netherlands test; Delta Kone Autoanalyser. Serum glucose levels were determined by a standard GOD-POD method. The hormonal tests were performed on an Ax-SYMTM System (Abbott Diagnostics, Abbott Park, USA) using commercial kits.

In all study participants BMI (= weight (kg)/height (m)²) and the homeostasis model of insulin resistance index (HOMA-IR) (= fasting blood glucose (mmol/l) x IRI (μ IU/ml)/22,5) were calculated. A cut-off of 2 for HOMA-IR was used for determining the presence of IR.

The statistical analysis was performed by SPSS version 21,0 for Windows. The distribution of the data was tested using the Kolmogorov-Smirnov test for nor-

mality. Correlation analyses were made using Pearson correlation coefficients. The results are presented as mean \pm standard deviation (SD). Statistical significance was taken at the level of $P < 0,05$.

Table 1.

Clinical and metabolic characteristics of the studied groups.

Characteristic	Groups of women		
	MS n=24	PCOS n=38	Controls n=24
Age (years)	28,63 $\pm 6,62$	24,18 $\pm 5,01$	27,63 $\pm 5,44$
Waist circumference (cm)	105,29a $\pm 6,26$	88,33b $\pm 16,35$	83,27b $\pm 15,80$
BMI (kg/m ²)	35,94a $\pm 4,70$	28,13b $\pm 5,76$	27,81b $\pm 8,33$
ADMA ($\mu\text{mol/l}$)	0,82a $\pm 0,37$	0,91a $\pm 0,32$	0,65b $\pm 0,35$
Fasting blood glucose (mmol/l)	5,13a $\pm 0,69$	5,14a $\pm 0,73$	4,74b $\pm 0,55$
Fasting IRI ($\mu\text{IU/ml}$)	12,99a $\pm 5,08$	11,75a $\pm 6,18$	5,79b $\pm 1,85$
HOMA-IR-index	3,02a $\pm 1,39$	2,78a $\pm 1,75$	1,24b $\pm 0,46$
Total cholesterol (mmol/l)	4,76 $\pm 0,96$	4,44 $\pm 0,80$	4,62 $\pm 0,77$
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,18 $\pm 0,33$	1,23 $\pm 0,39$	1,23 $\pm 0,27$
Triglycerides (mmol/l)	1,47a $\pm 0,70$	1,10b $\pm 0,57$	0,91b $\pm 0,60$
Systolic BP (mm Hg)	118,26 $\pm 13,95$	116,18 $\pm 11,94$	114,58 $\pm 10,93$
Diastolic BP (mm Hg)	73,91 $\pm 11,58$	73,55 $\pm 10,78$	74,58 $\pm 6,42$

The results are presented as mean \pm standard deviation (SD)

The designation with equal letters means absence of statistically significant differences, $P > 0,05$

The designation with unequal letters signify the presence of such differences, $P < 0,05$.

Results:

Table 1 presents the clinical and metabolic characteristics in the 3 groups of the study participants (namely 24 women with MS, 38 women with PCOS and 24 clinically healthy women). There were no statistically significant differences between the groups in terms of age, total cholesterol, HDL-cholesterol, systolic and diastolic blood pressure ($P > 0,05$). The waist circumference, BMI and serum triglyceride levels were significantly higher in the group with MS as compared to the group with PCOS and the control group

Table 2.

Correlation coefficients (r) between plasma levels of ADMA and some clinical and metabolic parameters in women with MS

Parameters	ADMA (r)	P
Age (years)	0,046	$> 0,05$
Waist circumference (cm)	0,106	$> 0,05$
BMI (kg/m ²)	0,007	$> 0,05$
Fasting blood glucose (mmol/l)	0,068	$> 0,05$
Fasting IRI ($\mu\text{IU/ml}$)	-0,053	$> 0,05$
HOMA-IR index	-0,028	$> 0,05$
Total cholesterol (mmol/l)	0,170	$> 0,05$
HDL-cholesterol (mmol/l)	0,264	$> 0,05$
Triglycerides (mmol/l)	-0,022	$> 0,05$
Systolic BP (mm Hg)	-0,350	$> 0,05$
Diastolic BP (mm Hg)	-0,464*	$< 0,05$

Table 3.

Correlation coefficients (r) between plasma levels of ADMA and certain clinical and metabolic parameters in women with PCOS

Parameters	ADMA (r)	P
Age (years)	-0,215	$> 0,05$
BMI (kg/m ²)	-0,037	$> 0,05$
Waist circumference (cm)	-0,074	$> 0,05$
Fasting blood glucose (mmol/l)	-0,184	$> 0,05$
Fasting IRI ($\mu\text{IU/ml}$)	-0,045	$> 0,05$
HOMA-IR index	-0,025	$> 0,05$
Total cholesterol (mmol/l)	0,080	$> 0,05$
HDL-cholesterol (mmol/l)	0,036	$> 0,05$
Triglycerides (mmol/l)	0,051	$> 0,05$
Systolic BP (mm Hg)	0,100	$> 0,05$
Diastolic BP (mm Hg)	-0,072	$> 0,05$

($P < 0,05$). We did not find a significant difference in the waist circumference and the BMI between the women with PCOS and the clinically healthy women. There were significant differences between the women of the two pathological groups and the clinically healthy women in terms of fasting blood glucose, fasting IRI, HOMA-index, which were consistently lower in the controls.

The highest plasma levels of ADMA were found in the PCOS women ($0,91 \pm 0,32 \mu\text{mol/l}$), but the differences in comparison with the MS women were not significant ($0,82 \pm 0,37 \mu\text{mol/l}$, $P > 0,05$). The ADMA levels in the subjects with MS and PCOS were significantly

higher than those in the healthy women ($0,65 \pm 0,35$ $\mu\text{mol/l}$, $P < 0,05$) (Table 1). We did not find a statistically significant correlation between the ADMA levels and the following parameters: age, BMI, waist circumference, plasma glucose, IRI, HOMA-IR, lipid parameters and systolic blood pressure neither in the women with MS nor in those with PCOS. In women with MS unlike in those with PCOS the diastolic blood pressure showed a significant negative correlation with ADMA (Table 2, Table 3).

Discussion:

In the recent years there has been a growing interest in determining the levels of ADMA, that serves as a physiological regulator of the biosynthesis of NO – a critical factor in the pathogenesis and progression of atherosclerosis. Elevated ADMA levels are associated with the pathophysiology of hypercholesterolemia, hypertension, DM, heart failure, kidney failure and liver failure (11-13). A relationship between ADMA and cardiovascular morbidity and mortality was confirmed in several recent epidemiological and prospective clinical studies (14). ADMA is perceived as a marker of endothelial dysfunction, a candidate for a new cardiovascular risk factor or an independent risk factor for cardiovascular morbidity and mortality. Increased levels of some inflammatory markers and the presence of endothelial dysfunction as an early sign of a cardiovascular disorder are registered in patients with MS and PCOS (15).

Therefore in our study we aimed at comparing the ADMA levels in women of reproductive age, carriers of MS and PCOS, with those of age-matched clinically healthy women and at searching a relationship between ADMA and some metabolic parameters.

Our data showed significantly higher plasma levels of ADMA in both the women with PCOS and MS as compared to those in the healthy women. The women with PCOS tended to have higher levels than the women with MS, but the differences did not reach significance.

Our data support the results of a study of Heutling D et al. (15) who investigated ADMA levels together with other cardiovascular, metabolic, and hormonal parameters in women with PCOS as well as the effects of metformin treatment on these parameters. Eighty seven women with PCOS and 39 clinically healthy women were included in the cited study, and the effect of metformin after 6 months of treatment in 21 women with PCOS was assessed. The authors found that the serum levels of ADMA were significantly higher in the women with PCOS as compared to those in the control women. HOMA-IR index, fasting insulin, glycated haemoglobin, total cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides and intima-media thickness (IMT)

were significantly higher in the women with PCOS. Treatment with metformin resulted in a decrease of ADMA levels. In the PCOS patients ADMA was found to correlate positively with BMI, waist-to-hip ratio, parameters of insulin sensitivity and IMT. No relationship was found between the markers of inflammation CRP and interleukin-6 (IL-6) and ADMA (15).

The results from studies designed to investigate the relationship between plasma levels of ADMA and the degree of IR are contradictory. Many authors have described a positive correlation between the HOMA-IR index and the ADMA levels in patients with IR syndrome (6, 16-18). Plasma levels of ADMA were found to be higher in women with obesity and IR as compared to those in obese women without IR. ADMA levels decreased in response to a reduction of body weight, associated with an improvement of insulin sensitivity (16). A strong correlation between the presence of endothelial dysfunction, serum androgen levels and the degree of IR in women with PCOS was detected (19). It has been proved that release and bioactivity of NO is reduced in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus as well as in those with MS (20). Despite the heterogeneity in the pathogenesis of these diseases, all of them are characterized by increased plasma glucose levels - the cause of the disturbances in the metabolism of L-arginine and NO. The bioactivity of NO may be suppressed by the oxidative stress as a consequence of the increased production of superoxide anions resulting from glucose auto-oxidation. The hyperglycemia-induced activation of protein kinase C, followed by the activation of phospholipase A2, leads to an increased production of arachidonic acid metabolites which possess potential oxidative effects. It is believed that the elevated plasma ADMA levels are associated with disorders that represent components of M like hypertriglyceridemia, hyperglycemia, hyperhomocysteinemia and essential hypertension. Stuhlinger et al. established a positive correlation between ADMA levels and the degree of IR in a group of 64 MS patients without DM (21). There is evidence that treatment with an insulin sensitizer from the group of thiazolidinediones – rosiglitazone, improves insulin sensitivity and reduces the plasma ADMA concentrations (22).

We found no statistically significant correlation between plasma levels of ADMA and age, BMI, waist circumference, plasma glucose, IRI, HOMA-IR, total cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides, and systolic blood pressure in the both pathological groups. The lack of association between ADMA and the degree of IR is also reported by other authors (21, 23, 24). Surprisingly, there was a negative significant correlation between ADMA and diastolic blood pressure in women with MS, unlike those with PCOS. However, the presence of a significant correlation does not always indicate causality, and vice versa.

Elevated plasma levels of ADMA might be only a secondary phenomenon (epiphenomenon) accompanying some abnormalities in the pre-diabetic states. These abnormalities can include higher glucose levels, a well-recognized cause of elevated ADMA via depressed dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) activity due to a higher intracellular oxidative stress (25). DDAH plays a central role in the degradation of ADMA, which means that any disease, leading to reduced DDAH activity would increase ADMA concentrations. In addition, the hyperglycemia-induced depression of DDAH activity might counteract the hyperinsulinemia-stimulated uptake of ADMA into the cells via an augmented expression of cationic amino acid transporters (CAT) (26). A complex interplay between these opposite effects of glucose and insulin on plasma ADMA might be responsible for the previously mentioned discordant reports on the relationship between IR and ADMA. It has been proved that insulin-resistant subjects are prone to hyperinsulinemia and hyperglycemia. Eid et al. (27) also reported a fall in ADMA during acute euglycemic hyperinsulinemia in humans. It is noteworthy that these two apparently contrary effects of insulin and glucose in terms of extracellular ADMA are likely to converge into increased intracellular ADMA levels (11).

Martin Carlsson et al. (28) did not find a correlation between serum levels of ADMA and insulin sensitivity, which is in accordance with our data. They suggested that ADMA performs a more complex role in the

development of DM than in that of atherosclerotic disease. Treatment with thiazolidinedione (rosiglitazone) led to a decrease in the plasma glucose and non-esterified fatty acid (NEFA) levels – an indirect but clear sign of increased insulin sensitivity, which in turn was not accompanied by a reduction in the levels of ADMA. No relationship was found between the levels of NEFA and ADMA. Variations of serum ADMA concentrations during the day as well as the effect of food intake on them were the main findings in the study. The post-prandial ADMA levels were 10% higher than those before the intake of food (28). In a study of Palomo et al. (29) comprising of 48 patients with established MS and 37 clinically healthy subjects, the plasma levels of ADMA were significantly higher in the MS patients ($0,71 \pm 0,38$ vs. $0,48 \pm 0,28$ $\mu\text{mol/l}$, $P = 0,0009$). In the same study, however, there was no significant correlation between ADMA and the components of the MS arterial blood pressure, glucose, triglycerides and HDL-cholesterol (29).

Conclusion

Our study demonstrated higher levels of ADMA in the women with syndromes of IR - MS and PCOS in comparison with those in the age-matched clinically healthy women. Whether it is an indicator of an increased risk of endothelial dysfunction in women with IR or only an epiphenomenon accompanying pre-diabetic state, is a matter of great interest and the answer to that question requires more detailed future research.

References

1. Zsuga J, Torok J, Magyar MT, Valikovics A, Gesztelyi R, Lenkei A, et al. Dimethylarginines at the crossroad of insulin resistance and atherosclerosis. *Metabolism* 2007; 56: 394–399.
2. Kolarov G, Orbetzova M. Polycystic ovary syndrome. Publisher PH „Viara“, Sofia, 2004, ISBN 954-9409-01-5; pp. 232. (in Bulgarian) (Коларов Г, Орбецова М. Поликистозен овариален синдром. Издател ИК „Вяра“; София, 2004, ISBN 954-9409-01-5; 232 стр.).
3. Vladimirova-Kitova L. Asymmetric dimethylarginine in hypercholesterolemic patients. *Journal of IMAB* 2008; 11:103-105.
4. Diamanti-Kandaraki E, Alexandraki K, Piperi C, Protogerou A, Katsikis I, Paterakis T, et al. Inflammatory and endothelial markers in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Clin Invest* 2006; 36:691–697.
5. Kravariti M, Naka KK, Kalantaridou SN, Kazakos N, Katsouras CS, Makrigiannakis A, et al. Predictors of endothelial dysfunction in young women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:5088–5095.
6. Paradisi G, Steinberg HO, Hempfling A, Cronin J, Hook G, Shepard MK, Baron AD. Polycystic ovary syndrome is associated with endothelial dysfunction. *Circulation* 2001; 103:1410–1415.
7. Davids M, Teerlink T. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and cardiovascular disease. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2012; 37: 10-14.
8. Koleva D, Orbetzova M, Deneva T. Asymmetric dimethylarginine – a mediator of endothelial dysfunction and its relationship with syndromes of insulin resistance. *Endocrinologia* 2013; 18(1): 33-40. (in Bulgarian). (Колева Д, Орбецова М, Денева Т. Асиметричен диметил-аргинин - медиатор на ендотелна дисфункция и връзката му със синдроми на инсулинова резистентност. *Ендокринология* 2013; 18(1): 33-40)
9. Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, et al. Asymmetric dimethylarginine [ADMA]: a novel risk factor for endothelial dysfunction. Its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 98:1842–1847.
10. Perticone F, Sciacqua A, Maio R, Perticone M, Galiano Leone G, Bruni R, et al. Endothelial dysfunction. ADMA and insulin resistance in essential hypertension. *Int J Cardiol* 2010; 142: 236–241.
11. Abbasi F, Asagami T, Cooke JP, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM, et al. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2001; 88:1201–1203.
12. Legro RS, Kusanman AR, Dodson WC, Dunaif A. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:165–169.

13. **Teerlink T, Luo Z, Palm F, Wilcox CS.** Cellular ADMA: regulation and action. *Pharmacol Res* 2009; 60:448-460.
14. **Lu TM, Ding YA, Lin SJ, Lee WS, Tai HC.** Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse cardiovascular events after percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 2003; 24:1912-19.
15. **Heutling D, Schulz H, Nickel I, Kleinstejn J, Kaltwasser P, Westphal S, et al.** Asymmetrical Dimethylarginine. Inflammatory and Metabolic Parameters in Women with Polycystic Ovary Syndrome before and after Metformin Treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(1):82-90.
16. **McLaughlin T, St?hlinger M, Lamendola C, Abbasi F, Bialek J, Reaven GM, Tsao PS.** Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations are elevated in obese insulin-resistant women and fall with weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:1896-1900.
17. **Marliss EB, Chevalier S, Gougeon R, Morais JA, Lamarche M, Adegoke OA, Wu G.** Elevations of plasma methylarginines in obesity and ageing are related to insulin sensitivity and rates of protein turnover. *Diabetologia* 2006; 49:351-359.
18. **Schutte AE, Schutte R, Huisman HW, van Rooyen JM, Fourie CM, Malan L, et al.** Dimethylarginines: their vascular and metabolic roles in Africans and Caucasians. *Eur J Endocrinol* 2010. 162:525-533.
19. **Patterson A, Hedner T, Milsom I.** Increased concentrations of asymmetric dimethylarginine [ADMA]: an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase. in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998; 77:808-813.
20. **Cooke JP.** Asymmetrical dimethylarginine: the uber marker? *Circulation*; 2004; 109: 1813-1818.
21. **St?hlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, et al.** Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA* 2002; 287:1420-1426.
22. **Surdacki A, Stochmal E, Szurkowska M, Bode-B?ger SM, Martens-Lobenhoffer J, Stochmal A, et al.** Nontraditional atherosclerotic risk factors and extent of coronary atherosclerosis in patients with combined impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance. *Metabolism* 2007; 56:77-86.
23. **Sydow K, Schwedhelm E, Arakawa N, Bode-B?ger SM, Tsikas D, Horning B, et al.** ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia. Effects of L-arginine and B vitamins. *Cardiovasc Res* 2003; 57: 244-52.
24. **Valkonen V-P, Palva H, Salonen JT, Lakka TA, Lehtimaki T, Laakso J, Laaksonen R.** Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001; 358: 2127-2128.
25. **Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, et al.** Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine-dimethylaminohydrolase. *Circulation* 2002; 106: 987-992.
26. **Gonzalez M, Flores C, Pearson JD, Casanello P, Sobrevia L.** Cell signalling mediating insulin increase of mRNA expression for cationic amino acid transporters-1 and -2 and membrane hyperpolarization in human umbilical vein endothelial cells. *Pflugers Arch* 2004; 448: 383-394.
27. **Eid HM, Reims H, Arnesen H, Kjeldsen SE, Lyberg T, Seljeflot I.** Decreased levels of asymmetric dimethylarginine during acute hyperinsulinemia. *Metabolism* 2007; 56: 464-469.
28. **Carlsson M, Lindstr?m T, Nystr?m F, Nilsson I, Brudin L, Wanby P.** Evidence of Daytime Variation of Asymmetric Dimethylarginine: An Intervention Study with Rosiglitazone in Type 2 Diabetes. *The Open Endocrinology Journal* 2011; 5: 14-18.
29. **Palomo I, Contreras A, Alarc?n LM, Leiva E, Guzm?n L, Mujica V, et al.** Elevated concentration of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in individuals with metabolic syndrome. *Nitric Oxide*; 2011; 24(4):224-228.

Влияние на фотопериода върху дневно-нощните концентрации на мелатонина

Терзиева, Дора¹, Д. Орбецова Мария², М. Матева, Нонка², Т.

¹ Катедра по Клинична лаборатория, Фармацевтичен факултет,

² Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Св. Георги“, МФ;

³ Катедра по Медицинска информатика, биостатистика и електронно обучение, Факултет по обществено здраве, Медицински Университет – Пловдив

Address for correspondence:

Д-р Дора Терзиева,

Катедра по Клинична лаборатория, Фармацевтичен факултет

бул. „В. Априлов“ 15А, 4002 Пловдив

e-mail: terzieva2006@yahoo.com

Abstract

Целта на изследването е да се изучи дали продължителността на фотопериода влияе върху дневно-нощните концентрации на мелатонина.

Материали и методи: Проучването е проведено в периода юни 2006г. - юли 2007 г. при 128 клинично здрави лица. Серумната концентрация на мелатонина в 3:00 ч. (при слабо осветление) и в 8:00 ч. (при обичайно дневно осветление) е определена с ELISA метод (IBL, Germany). Статистическата обработка на резултатите е извършена с програмния пакет SPSS v. 17.0.

Резултати: От включените в проучването лица 85 (66,67 %) са жени, а 43 (33,33 %) – мъже. Средната възраст на мъжете ($42,42 \pm 1,77$ г.) е сходна с тази на жените ($42,12 \pm 1,45$ г.) ($t=0,71$, $P>0,05$). За цялата група се установява сигнификантна разлика между средните концентрации на мелатонина в 3:00 и 8:00 часа – $77,73 \pm 3,90$ pg/ml спрямо $28,52 \pm 1,84$ pg/ml ($t=16,182$, $P<0,0001$). Здравите лица са разделени на 2 групи в зависимост от продължителността на деня при вземане на биологичния материал. В едната група са включени изследванията при къс фотопериод (от м. октомври до м. март, вкл.), а в другата – при дълъг фотопериод (от м. април до м. септември, вкл.). След изключване влиянието на възрастта се установява по-висок мелатонин в 8:00 ч. при къс фотопериод със статистически значима средна разлика ($14,85 \pm 5,01$ pg/ml; $t=2,97$, $P=0,005$) между двете групи.

Заключение: При клинично здравите лица от настоящото проучване се наблюдава запазен циркадианен ритъм на мелатонина. Данните ни са в подкрепа на значимо влияние на фотопериода върху ритъма на секреция на мелатонина. При по-продължителна светла част на генонощното дневно-нощните разлики са по-изразени, което е благоприятно от физиологична гледна точка.

Ключови думи: мелатонин, фотопериод, дневно-нощна разлика на мелатонина, здрави лица

Въведение:

Мелатонинът е индоламин, който се синтезира от пинеалната жлеза основно през нощта. Важно значение в регулацията на мелатониновия синтез има хипоталамичното супрахиазмално ядро. Знае се, че синтезата на мелатонин се повишава, когато активността на ядрото е ниска. Изследователите са единодушни, че светлината е най-важният екзогенен фактор, който повлиява концентрацията на мелатонина в кръвта (1).

От една страна, тя определя ритъма на секрецията му в резултат от смяната на деня с нощта, а от друга – потиска отделянето му в резултат от влиянието на кратки импулси с достатъчна интензивност и продължителност. Смяната на сезоните влияе върху секрецията на мелатонина, но това влияние е по-добре изучено при животните, отколкото при хората. При сезонно размножаващите се животни кратката нощ през лятото довежда до относително по-кратко отделяне на мелатонина и ниски мелатони-

нови нива (2, 3). Мелатонинът играе ролята на „предавател“ на информацията за продължителността на фотопериода към мозъка на животните и компонентите на репродуктивната им система (4, 5). Смята се, че при повечето хора мелатониновият ритъм е устойчив през цялата година (3). Според проучване с имунохистохимични техники при хора пинеалната жлеза има рецептори за гонадотропини и полови стероиди, като концентрацията на гонадотропните рецептори е сигнификантно по-висока през зимата, отколкото през лятото (6).

Целта на проучването е да се изучи дали продължителността на фотопериода влияе върху дневно-нощните концентрации на мелатонина при здрави индивиди.

Материал и методи:

В периода юни 2006 г. – юли 2007 г. са изследвани 128 клинично здрави лица. Те са приемани в определена за целта болнична стая в Клиника по Ендокринология и болести на обмяната при УМБАЛ „Св. Георги“, гр. Пловдив. През деня стаята е осветявана чрез обичайното дневно осветление, а през нощта прозорците са затъмнявани допълнително с оглед недопускане проникване на изкуствена светлина. Обичайният източник на осветление и други източници на светлина (телевизионни и др. апарати) се изгасявани в 22:00 часа. Участниците в проучването са подбрани по следните критерии за включване: доброволност, клинично здраве, хематологични, клинично-химични и уринни лабораторни показатели в съответните референтни интервали. Като критерии за изключване са приети: данни за остри или хронични заболявания – неврологични, чернодробни, бъбречни, сърдечно-съдови, ендокринни (захарен диабет, затлъстяване, хипо/хипертиреозидизъм), злокачествени или психични заболявания, прием на хормонални препарати в последните три месеца (вкл. орални контрацептивни средства) или медикаменти, за които се знае, че повлияват концентрацията на мелатонина (β -блокери, антиагреганти, бензодиазепини). Не са включвани и лица със системни заболявания, зависимост от алкохол, тежки физически натоварвания и/или работещи на нощни смени, жени в период на бременност и кърмене и такива с репродуктивни нарушения.

Кръвни проби за изследване на мелатонин са вземани в 3:00 ч. и 8:00 ч. Лицата са инструктирани да остават със затворени очи по време на пробата в 3:00 часа, която е вземана при слабо осветление, без да се осветява лицето на изследвания. Като източник на светлина е използвана

лампа, която излъчва червена светлина. В 8:00 ч. пробата е вземана при обичайното дневно осветление.

Серумният мелатонин е определен с ELISA метод, като е използван набор на фирмата IBL-Hamburg, Germany с каталожен № RE54021. Измерванията са извършвани с помощта на анализатор Sirio microplate reader, SEAC, Italy.

При статистическата обработка на резултатите за мелатонина са използвани вариационен анализ, *t*-тест при зависими (paired sample *t*-test) и при независими (independent sample *t*-test) извадки. За ниво на значимост е прието $P < 0,05$. Клиничното проучване е одобрено от Комисията по Научна Етика към МУ – Пловдив с протокол №1/25. 01.2006 г.

Резултати:

От включените 128 лица 85 (66,67%) са жени и 43 (33,33 %) са мъже. Възрастта на лицата варира от 21 до 70 г. Средната възраст на мъжете не се различава статистически значимо от тази на жените – съответно $42,42 \pm 1,77$ г. спрямо $42,12 \pm 1,45$ г. ($t=0,71$, $P > 0,05$). Средната концентрация на серумния мелатонин (ср. аритметична \pm SEM) в 3:00 ч. е $77,73 \pm 3,90$ pg/ml, а в 8:00 ч. – $28,52 \pm 1,84$ pg/ml (Фиг. 1). Съпоставката на средните концентрации с чифтния *t*-тест на Student-Fisher (paired-samples *t*-test) установява сигнификантна разлика между тях – $t=16,182$, $P < 0,0001$. Високата статистическа значимост на разликата отразява отчетливи дневно-нощни колебания на мелатониновите нива, включително и при лицата > 60 годишна възраст.

В хода на разработката е изследвано влиянието на продължителността на фотопериода (светлата част на денонощието) върху концентрацията на серумния мелатонин в 3:00 ч. и 8:00 ч. За целта здравите лица са разделени на 2 групи в зависимост от дължината на деня при вземане на биологичния материал. В едната група са включени изследванията при къс фотопериод – от м. октомври до м. март, вкл. ($n=33$, 25,6%), а в другата – при дълъг фотопериод – от м. април до м. септември, вкл. ($n=95$, 74,4%). Получените средни стойности на мелатонина в групите с къс и дълъг ден в 3:00 ч. и 8:00 ч. са представени в Таблица 1. При сравняване на средните стойности чрез нечифтния *t*-тест на Student-Fisher се установява разлика с уroveň на значимост, близък до $P=0,05$.

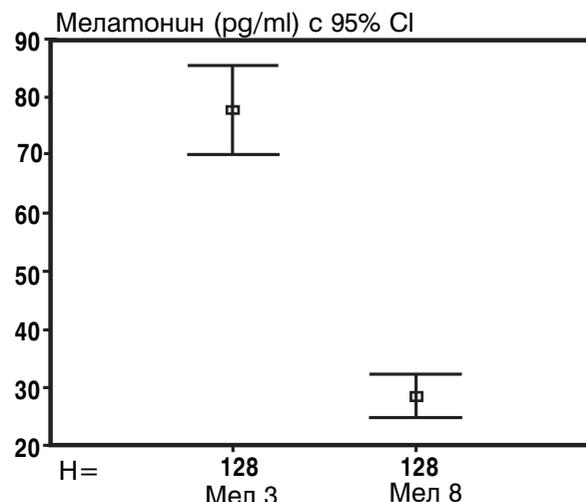
С оглед доказаното влияние на възрастта върху нивата на мелатонина, са изследвани възрастовото разпределение и средната възраст на лицата от групите с къс и дълъг ден. Не се

установява статистически значима разлика в разпределението по възраст в двете групи ($\chi^2 = 5,20, P=0,267$). Но, тъй като средната възраст на лицата от двете групи показва статистически значими разлики – $39,97 \pm 2,06$ г. за изследваните при къс фотопериод спрямо $44,82 \pm 1,32$ г. за изследваните при дълъг фотопериод, $t=1,98, P=0,05$, е селектирана 1 сходна по възраст извадка от групата с дълъг фотопериод ($n=33$) със средна възраст $41,73 \pm 2,27$ г. ($t=0,573, P=0,569$). Резултатите от съпоставката на средните стойности на мелатонина в 3:00 ч. и 8:00 ч. при сходните по възраст групи чрез t -теста на Student-Fisher (при независими извадки) са представени на Фигура 2. Граничното ниво на значимост, макар и по-високо, се запазва по отношение на средната разлика на мелатонина в 3:00 ч. ($24,02 \pm 12,34$ pg/ml; $t=1,95, P=0,057$). В 8:00 ч., обаче, разликата се оказва статистически значима ($14,85 \pm 5,01$ pg/ml; $t=2,97, P=0,005$).

Обсъждане:

Допуска се, че не само генонощните колебания, но и сезонът влияят върху концентрацията на мелатонина в кръвта. Продължителността на светлата част от генонощия (фотопериод) се мени според сезоните, което е свързано с промяна на часовете, през които е тъмно и се отделя мелатонин (4). Първоначално в нашето проучване 25,6% от здравите лица са изследвани при къс фотопериод, а 74,4% – при дълъг фотопериод. Проверката на нулевата хипотеза (т.е. че разликата в мелатониновата концентрация при къс и дълъг фотопериод се дължи на случайни фактори) показва маргинална статистическа значимост на средната разлика в мелатониновата концентрация при къс и дълъг фотопериод, както в 3:00 ч., така и в 8:00 ч. Дневно-нощните колебания на мелатонина са запазени: при къс фотопериод средната стойност на мелатонина в 3:00 часа е около 2,6 пъти по-висока в сравнение с тази в 8:00 часа, а при дълъг – около 2,8 пъти. След изключване влиянието на възрастта и едновременното уеднаквяване на групите по брой ($n=33$), при къс фотопериод в

Фигура 1. Концентрация на серумния мелатонин в 3:00 ч. и 8:00 ч. при клинично здрави лица



3:00 часа, средната концентрация на мелатонина е по-висока от тази при дълъг фотопериод, като разликата запазва предходната маргинална статистическа значимост ($P=0,057$). В 8:00 часа при къс фотопериод средната концентрация на мелатонина е статистически значимо по-висока от тази при дълъг фотопериод ($P=0,005$). Лицата изследвани при къс фотопериод отново имат около 2,6 пъти по-висока средна концентрация на мелатонина в 3:00 ч. в сравнение с тази в 8:00 ч. При дълъг фотопериод в 3:00 часа средната концентрация на мелатонина е около 3,4 пъти по-висока от тази в 8:00 часа.

Получените от нас данни показват по-висока средна концентрация на мелатонина в кръвта в 8:00 часа при къс фотопериод, като отношението между нощния и дневния мелатонин е по-високо при дълъг фотопериод. Резултатите от проучванията, посветени на сезонните колебания на мелатонина при хора са противоречиви, понякога изненадващи. Има данни за частично влияние на фотопериода върху концентрацията на мелатонина в пинеалната тъкан, според които нощният мелатонин при дълъг фотопериод е сигнификантно по-висок от този при къс фотопериод (7). Установена е значима нощно-дневна разлика на мелатонина в пинеалната тъкан само при дълъг фотопериод (април-септември).

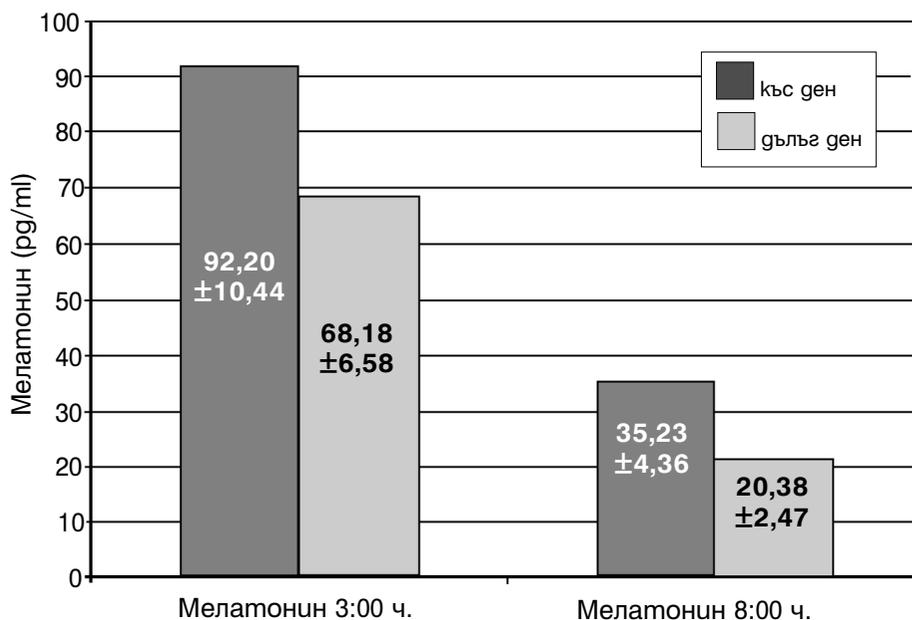
Таблица 1.

Средни стойности на мелатонина в зависимост от фотопериода

Показател	Фотопериод	Mean±SEM (pg/ml)	Ср. разлика±SE (pg/ml)	t	P
Мелатонин 3:00 ч.	Къс ген	92,20±10,44	19,49±11,08	1,76	0,086
	Дълъг ген	72,71±3,70			
Мелатонин 8:00 ч.	Къс ген	35,23±4,36	9,03±4,77	1,90	0,064
	Дълъг ген	26,19±1,93			

Фигура 2.

Средни стойности на мелатонина в зависимост от фотопериода след корекция за възраст (n=33)



Като едно възможно обяснение на частичното повлияване на мелатонина от фотопериода е ползването на изкуствени източници на светлина. Широкото използване на изкуствена светлина в съвременния живот ни „защитава“ от влиянието на сезонните промени на фотопериода, а пинеалната жлеза е запазила „известна способност да реагира“ на тези промени (8). Вероятно чрез мелатонина, пинеалната жлеза повлиява способността на организма за отговор спрямо продължителността на фотопериода.

В едногодишно мултинационално проучване на нощната мелатонинова екскреция при 261 здрави лица на възраст от 18 до 62 г. е установена сигнификантно по-висока средна екскреция при лицата от Северното полукълбо в сравнение с тази на лицата от Южното полукълбо (9). В друго проучване е установена сигнификантна взаимовръзка между нощната мелатонинова екскреция и географската ширина при лица, живеещи в Северното полукълбо (10). Влиянието на сезона върху концентрацията на мелатонина е изучавано при здрави новородени деца на 8 и на 16 седмици (11). При децата, родени през месеци с къс фотопериод, е установена сигнификантно по-ниска нощна концентрация на 6-сулфатоксимелатонин в сравнение с тази на децата, родени през месеци с дълъг фотопериод. Допуска се, че този „изненадващ“ резултат се дължи на изместването на нощната мелатонинова секре-

ция към дневните часове. Сезонната промяна на мелатониновата екскреция се отнася само за децата на 8 седмици, което се обяснява с промени в клетъчната структура на пинеалната жлеза скоро след раждането или с вътреутробно влияние на майчиния мелатонин върху развитието на жлезата. Други изследователи не установяват сезонна разлика в продължителността на мелатониновата секреция при здрави възрастни лица (12). Според тях използването на изкуствено осветление през нощта и/или предпазването от слънчевата светлина през деня вероятно довеждат до невъзможност циркадианният пейсмейкър да разпознае и

отговори на промяната във фотопериода.

При лица със „сезонно протичащи“ заболявания данните за влиянието на фотопериода върху концентрацията на мелатонина в кръвта не са еднозначни. Установена е по-продължителна нощна мелатонинова секреция (забавена фаза) през зимата в сравнение с тази през лятото при лица със сезонно афективно разстройство (12). При болни от системен лупус еритематозес, живеещи в субарктическият регион, е установен по-висок дневен мелатонин през м. декември, отколкото през м. юни, но това не се свързва със сезонно обусловено обостряне на клиничната картина (13).

Заклучение

При клинично здравите лица от настоящото проучване се наблюдава запазен циркадианен ритъм на мелатонина. Данните ни са в подкрепа на значимо влияние на фотопериода върху ритъма на секреция на мелатонина. При по-продължителна светла част на денонощието дневно-нощните разлики са по-изразени, което е благоприятно от физиологична гледна точка. Запазването на циркадният ритъм и нивата на секреция на мелатонин се смята важен фактор за поддържане на човешкото здраве.

Influence of Photoperiod on Melatonin Day-Night Concentrations

Terzieva, Dora¹, D. Orbetzova, Maria², M., Mateva, Nonka³, G.

¹ Department of Clinical Laboratory Medicine, Faculty of Pharmacy;

² Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases, „Sv. Georgy“ University Hospital, MF;

³ Department of Medical Informatics, Biostatistics and e-Learning, Faculty of Public Health, Medical University, Plovdiv, Bulgaria

Address for correspondence:

D. Terzieva, MD

Department of Clinical Laboratory Medicine

„Sv. Georgy“ University Hospital, Medical University, Plovdiv, 15 A Vassil Aprilov Blvd

4002 Plovdiv, Bulgaria

e-mail: terzieva2006@yahoo.com

Abstract

The aim of the study was to investigate the way in which photoperiod duration influences melatonin day-night concentrations.

Materials and methods: The study was carried out in the period June 2006 – July 2007 and involved 128 clinically healthy individuals. The serum melatonin concentration at 3 a.m. (under conditions of dim light) and at 8 a.m. (under conditions of normal day light) was determined by ELISA (IBL, Germany). The statistical processing of the results utilized the SPSS software v. 17,0.

Results: The study involved 85 (66,67%) women, and 43 (33,33 %) men. The mean age of the men ($42,42 \pm 1,77$ ys) was similar to that of the women ($42,12 \pm 1,45$ ys) ($t=0,71$, $P>0,05$). A significant difference was found in both men and women between the mean melatonin concentrations at 3 a.m. and 8 a.m. – $77,73 \pm 3,90$ pg/ml against $28,52 \pm 1,84$ pg/ml ($t=16,182$, $P<0,001$). The studied healthy individuals were divided into 2 groups depending on the duration of the day when the biological material was taken. The first group was studied under conditions of a short photoperiod (from October to the end of March), whereas the other group included those studied under conditions of a long photoperiod (from April to the end of September). After excluding the effect of age, a higher melatonin level was found at 8 a.m. under conditions of short photoperiod with a statistically significant mean difference ($14,85 \pm 5,01$ pg/ml; $t=2,97$, $P=0,005$) between the two groups.

Conclusion: A preserved melatonin circadian rhythm was observed in the clinically healthy individuals included in the present study. The results obtained are consistent with a significant influence of the photoperiod on melatonin secretion rhythm. Under the conditions of a longer light period, the day-night differences are more marked, which is favourable from a physiological point of view.

Key words: melatonin, photoperiod, day-night melatonin difference, healthy individuals

Introduction:

Melatonin is an indoleamine synthesized by the pineal gland mainly at night. The hypothalamic suprachiasmatic nucleus is of considerable importance to melatonin synthesis regulation. Melatonin synthesis is considered to increase whenever the activity of the nucleus is low. Researchers unanimously report light as the most important exogenous factor influencing plasma melatonin concentration (1). On the one hand, it determines the rhythm of melatonin secretion as a result of the day-

night change, and on the other, it suppresses its secretion as a result of the influence of short impulses of sufficient intensity and duration.

Seasonal changes influence melatonin secretion; however, this influence has been better studied in animals than in man. In seasonally breeding animals, the short night in the summer results in relatively shorter melatonin secretion and lower melatonin levels (2, 3). Melatonin „transmits“ information on photoperiod duration to the animal brain and the components of their reproductive system (4, 5). Melatonin rhythm is considered to be stable in most people all year round (3).

According to a study utilizing immunohistochemical techniques, the pineal gland in man has receptors for gonadotropins and sex steroids, with the gonadotropin receptor concentration being significantly higher in winter, than in summer (6).

The aim of the study was to investigate the way in which photoperiod duration influences melatonin day-night concentrations in healthy individuals.

Materials and Methods:

One hundred and twenty-eight clinically healthy individuals were studied in the period June 2006 – July 2007. They were admitted to a ward specially assigned for the purposes of the study at the Clinic of Endocrinology and Metabolic Disorders of „Sv. Georgy“ University Hospital – Plovdiv. In the daytime the ward was lit by normal daylight, whereas at night the windows were additionally darkened to prevent the penetration of any artificial light into the room. All lamps, as well as other sources of light, such as television sets, etc., were turned off at 10 p.m. The studied individuals were chosen according to the following inclusion criteria: voluntary enlisting in the study, good health from a clinical point of view, all haematological, clinical chemistry and urinary laboratory tests in the respective reference intervals. The exclusion criteria were as follows: evidence of acute or chronic diseases – neurological, hepatic, renal, cardiovascular, endocrine (diabetes mellitus, obesity, hypo/hyperthyroidism), malignant diseases, mental disorders, administration of hormonal preparations in the last three months (oral contraceptive agents included) or medications known to influence melatonin concentrations (β -blockers, antidepressants, benzodiazepines). People with systemic diseases, alcohol dependence, those involved in heavy physical labour and/or working night shifts, pregnant and breast-feeding women, as well as ones with reproductive impairment, were also excluded from the study.

Blood samples for melatonin levels were taken at 3 a.m. and 8 a.m. The study participants were instructed to stay with their eyes closed while the sample was taken at 3 a.m. – the room was dimly lit, no light was directed at the face of the person under study. The sole source of light was a lamp emitting red light. The sample at 8 a.m. was taken under conditions of normal day light.

Serum melatonin was determined by ELISA, with an IBL kit (Hamburg, Germany, catalogue № RE54021) at an analyzer Sirio microplate reader, SEAC, Italy.

The statistical processing of the melatonin results involved variation analysis, paired sample t-test and independent sample t-test. $P < 0,05$ was accepted as level of significance. The clinical study was approved by the Medical University Ethics Commission with Proceedings №1 of 25 January, 2006.

Results:

The individuals studied were 128 in number, 85 of which (66,67%) were women and 43 (33,33%) were men. Their age varied from 21 to 70 years. The mean age of the men ($42,42 \pm 1,77$ ys) did not differ significantly from that of the women ($42,12 \pm 1,45$ ys) ($t = 0,71$, $P > 0,05$). The mean serum melatonin concentration (mean \pm SEM) at 3 a.m. was $77,73 \pm 3,90$ pg/ml, whereas at 8 a.m. it was $28,52 \pm 1,84$ pg/ml (Fig. 1). Comparing the mean concentrations by a paired-sample t-test, we found a significant difference – $t = 16,182$, $P < 0,0001$. This high significance of the difference reflects marked day-night fluctuations in the melatonin levels, observed even in people over the age of 60.

The study investigated the influence of the photoperiod duration (day duration in the day-night cycle) on the serum melatonin concentration at 3 a.m. and 8 a.m. For that purpose, the studied healthy individuals were divided into 2 groups depending on the length of the day when the biological material was taken. One group included investigations performed under conditions of a short photoperiod – from October to the end of March ($n = 33$, 25,6%), whereas the other group included those studied under conditions of a long photoperiod – from April to the end of September ($n = 95$, 74,4%). The mean melatonin values obtained at 3 a.m. and 8 a.m. in the groups under conditions of a short and long day are presented in Table 1. Comparing the mean values by an independent sample t-test, we found a difference at a significance level close to $P = 0,05$.

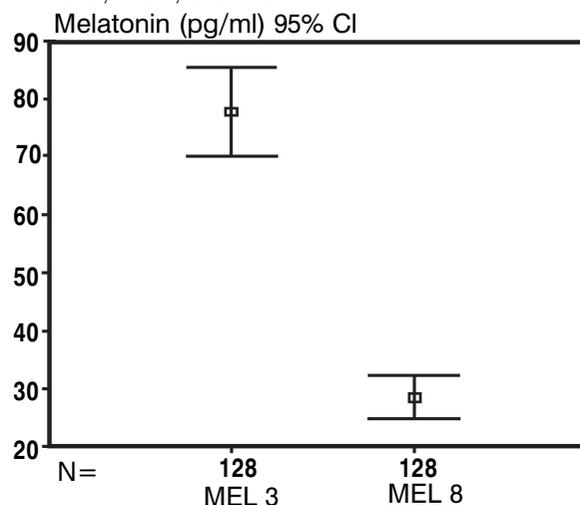
Considering the proven influence of age on melatonin levels, we studied the age distribution and the mean age of the individuals in the short-day and long-day groups. No significant difference was found in the age distribution in both groups ($\chi = 5,20$, $P = 0,267$). However, since the mean age of the individuals from both groups showed significant differences – $39,97 \pm 2,06$ years for the individuals studied under conditions of a short photoperiod vs. $44,82 \pm 1,32$ years for those studied under conditions of a long photoperiod, $t = 1,98$, $P = 0,05$. A sample similar in age was selected from the long photoperiod group ($n = 33$), of an average age $41,73 \pm 2,27$ years ($t = 0,573$, $P = 0,569$). The results obtained after comparing the mean melatonin values at 3 a.m. and 8 a.m. in the similar age groups by independent sample t-test are presented in Fig. 2. The borderline significance level, although higher, was preserved in the melatonin mean difference at 3 a.m. ($24,02 \pm 12,34$ pg/ml; $t = 1,95$, $P = 0,057$). At 8 a.m., however, the difference was significant ($14,85 \pm 5,01$ pg/ml; $t = 2,97$, $P = 0,005$).

Discussion:

Not only day-night fluctuations, but also the seasonal ones, are assumed to affect melatonin plasma concentration. Photoperiod duration alters with the seasons, which is related to the different number of hours of darkness when melatonin is secreted (4). At the beginning of our study 25,6% of the healthy individuals were investigated under conditions of short photoperiod, whereas 74,4% were investigated under conditions of long photoperiod. The testing of the null hypothesis (i.e. that the difference in melatonin concentration under conditions of short and long photoperiod is due to random factors) showed marginal statistical significance of the mean difference in the melatonin concentration under conditions of both short and long photoperiod at both 3 a.m. and 8 a.m. The day-night melatonin fluctuations were preserved: under the short-day conditions, the mean melatonin level at 3 a.m. was approximately 2,6 times higher than the one at 8 a.m., whereas under the long-day conditions it was about 2,8 times higher. After excluding the influence of age and simultaneously including one and the same number of people in the groups (n=33), the mean melatonin concentration at 3 a.m. was higher under the conditions of short photoperiod, as compared to the long one, with the difference preserving the previous marginal statistical significance ($P=0,057$). At 8 a.m. the mean melatonin concentration was significantly higher under the short-day conditions, as compared to the long-day ones ($P=0,005$). The individuals studied under the conditions of short photoperiod again had a mean melatonin concentration that was approximately 2.6 times higher at 3 a.m., as compared to that at 8 a.m. Under conditions of long photoperiod the mean melatonin concentration was approximately 3.4 times higher at 3 a.m., as compared to that at 8 a.m.

Our results showed higher mean melatonin concentration in the blood at 8 a.m. under conditions of short photoperiod, with the relationship between night and day melatonin being higher under conditions of a long photoperiod. The results from studies focusing on seasonal melatonin fluctuations in humans have been contradictory, occasionally surprising. There is evidence of a partial influence of the photoperiod on melatonin concentration in the pineal tissue, according to which night melatonin under long-day conditions is significantly high-

Figure 1. Serum melatonin concentration at 3 a.m. and 8 a.m. in clinically healthy individuals.



er than that under short-day conditions (7). A significant night-day difference in pineal tissue melatonin has only been found under long-day conditions (April-September). The observed partial influence of the photoperiod on melatonin is likely to be due to the use of artificial sources of light. The wide use of artificial lighting in modern life „protects“ us from the influence of the seasonal photoperiod changes, and the pineal gland has preserved „a certain capacity to react“ to these changes (8). Most likely through melatonin, the pineal gland influences the capacity of the body to respond to the photoperiod duration.

In a one-year multinational study of night melatonin excretion involving 261 healthy individuals aged from 18 to 62 years, a significantly higher mean excretion was found in individuals from the northern hemisphere, as compared to that of individuals from the southern hemisphere (9). Another study found a significant relationship between night melatonin excretion and the geographical latitude in people living in the northern hemisphere (10). Seasonal influences on melatonin concentration have been studied in 8 and 16 weeks old healthy newborns (11). A significantly lower night 6-sulfatoxymelatonin concentration was found in infants born in months with a short photoperiod, as compared to that of infants born in months with a long photoperiod. This „surprising“ result has been assumed to be due to the shift of night melatonin secretion to day time. Seasonal changes in melatonin excretion have only been observed in the 8-week-old infants – a fact that has been explained with the transformation in the pineal gland cell structure shortly following delivery, or with intrauterine influence of maternal melatonin on pineal gland development.

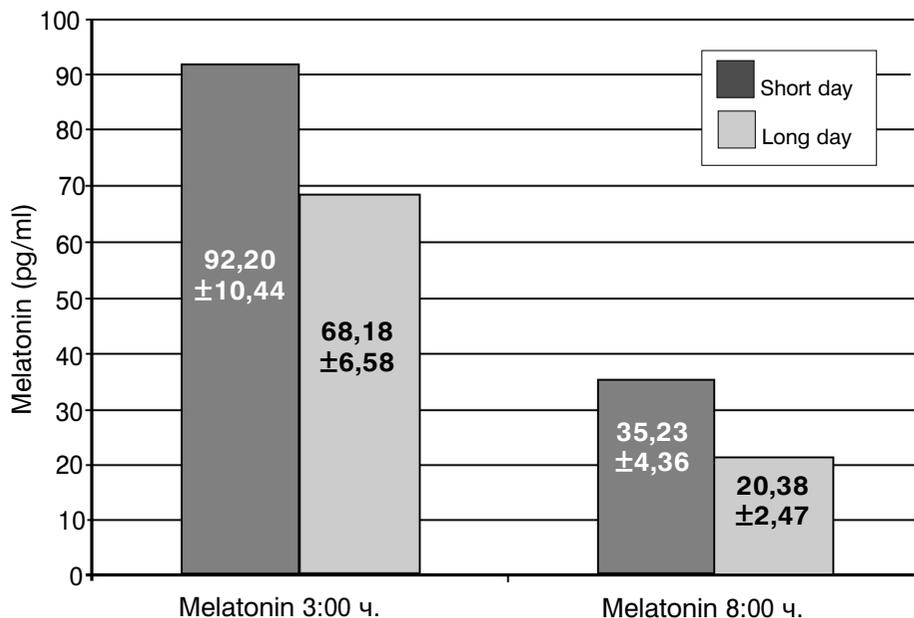
Table 1.

Mean melatonin values depending on the photoperiod

Index	Photoperiod	Mean±SEM (pg/ml)	Mean difference ±SE (pg/ml)	t	P
Melatonin at 3 a.m.	Short day	92,20±10,44	19,49±11,08	1,76	0,086
	Long day	72,71±3,70			
Melatonin at 8 a.m.	Short day	35,23±4,36	9,03±4,77	1,90	0,064
	Long day	26,19±1,93			

Figure 2.

Mean melatonin levels depending on the photoperiod after age correction (n=33)



Other researchers have not found a seasonal difference in the duration of the melatonin secretion in healthy adults (12). In their opinion, the use of artificial lighting at night and/or the protection from sunlight in the daytime are likely to make it impossible for the circadian pacemaker to recognize and respond to photoperiod alteration.

In people with „seasonal“ disorders the data regarding

photoperiod influence on melatonin concentration in the blood have a number of implications. A prolonged night melatonin secretion (a delayed phase) in people with seasonal affective disorder has been found in the winter, as compared to the summer (12). In patients with systemic lupus erythematosus living in the subarctic region, a higher daytime melatonin has been found in December, as compared to June, but this fact has not been associated with a seasonally determined exacerbation of the clinical symptoms (13).

Conclusion

In conclusion, the clinically healthy individuals included in the present study had a preserved circadian melatonin rhythm.

These results are consistent with a significant photoperiod influence on the rhythmicity of melatonin secretion. Under conditions of a longer photoperiod, the day-night differences are more pronounced, which is favourable from a physiological point of view. Preserving the circadian rhythm and the levels of the melatonin secretion are considered to be important factors maintaining human health.

References

1. **Brezinski A.** Melatonin in humans. *N Engl J Med* 1997; 336 (3):186-195.
2. **The Pineal Gland.** Part of „5-Neuroendocrinology“. In: *Clinical Gynecologic Endocrinology&Infertility*. Speroff L, Fritz M. eds. 7th Ed. Philadelphia. Lippincott Williams&Wilkins; 2005, pp. 176-183.
3. **Provencio I. 1.13: Chronobiology.** Part of „1-Neural Sciences. In: Kaplan&Sadock's Comprehensive Textbook of psychiatry. Sandoc B, Sandoc V. eds. 8th Ed. Philadelphia. Lippincott Williams&Wilkins; 2005. p 161-171.
4. **Kumanov Ph.** Physiology and pathophysiology of the pineal gland. In *Endocrinologia* (ed. B. Lozanov) (In Bulgarian) (**Куманов Ф.** Физиология и патология на пинеалната жлеза. В: *Ендокринология* (ред. Б. Лозанов). София, „Проф. Марин Дринов“, 2000: 250-258).
5. **Lam R, Song C, Yatham L.** Das neuroimmune dysfunction mediate seasonal mood changes in winter depression? *Med Hypotheses* 2004; 63: 567-573.
6. **Luboshitzky R, Dharan Y, Goldman D, Herer P, Hiss Y, Lavies P.** Seasonal variation of gonadotropins and gonadal steroids receptors in the human pineal gland. *Brain res bull* 1997; 44 (6):665-670.
7. **Luboshitzky R, Daphna Y, Shen-Orr Z, Israeli E, Herer P,**
8. **Lavie P.** Daily and seasonal variations in the concentration of melatonin in the human pineal gland. *Brain res bull* 1998; 47 (3):271-276.
9. **Macchi M, Bruce J.** Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol* 2004; 25:177-195.
10. **Wetterberg L, Bergiannaki J, Paparrigopoulos Th, Knorring L v, Eberhard G, Bratlid T, Yuwiler A.** Normative melatonin excretion: a multinational study. *Psychoneuroendocrinology* 1999; 24:209-226.
11. **Wetterberg L, Bratlid T, Knorring L v, Eberhard G, Yuwiler A.** A multinational study of the relationships between nighttime urinary melatonin production, age, gender, body size, and latitude. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1999; 249:256-262.
12. **Sivan Y, Laudon M, Tauman R, Zisapel N.** Melatonin production in healthy infants: evidence for seasonal variations. *Pediatr Res* 2001; 49 (1):63-68.
13. **Wehr Th, Duncan W, Sher L, Aeschbach D, Schwartz P, Turner E et al.** A circadian signal of change of season in patients with seasonal affective disorder. *Arch gen Psychiatry* 2001; 58:1108-1114.
14. **Haga H-J, Brun JG, Rekvig OP, Wetterberg L.** Seasonal variations in activity of systematic lupus erythematosus in a subarctic region. *Lupus* 1999; 8:269-273.

Клъстерен анализ на компоненти на метаболитен синдром при лица с повишен риск от захарен диабет тип 2

Андреева-Гатева, Павлина А.^{1,2}, Симеонов, Васил Д.³, Георгиева-Николова, Радка Т.⁴, Тафраджийска-Хаджиолова Радка К.⁵

¹ Медицински университет, София, Медицински факултет, Катедра по фармакология и токсикология;

² Софийски университет „Св. Климент Охридски“, Медицински факултет, Катедра по вътрешни болести, фармакология и клинична фармакология, педиатрия, епидемиология, инфекциозни болести и дерматология;

³ Софийски университет „Св. Климент Охридски“, Факултет по химия и фармация, Катедра аналитична химия;

⁴ МУ, София, Медицински факултет, Катедра по химия и биохимия;

⁵ МУ, София, Медицински факултет, Катедра по патофизиология

Address for correspondence:

Д-р Павлина Андреева-Гатева

Катедра по фармакология и токсикология,
Медицински факултет, Медицински университет, София,
ул. „Здраве“ 2, София
e-mail: pandreeva_gateva@yahoo.com

Резюме

Връзката между затлъстяването, захарния диабет (ЗД) тип 2 и сърдечно-съдовия риск е комплексна, преплитат се различни патогенетични механизми и е трудно да се прецизира ролята на всеки един от тях в определен момент. Цел на настоящото проучване е при пациенти с повишен риск от ЗД тип 2 да бъдат идентифицирани подгрупи с различно естество и степен на сърдечно-съдов риск на базата на съчетаване на наднормено тегло с други компоненти на метаболитния синдром.

Материали и методи. Проведено е напречносрезово проучване при 113 лица – 28 мъже на възраст от 27 г. до 67 г., средна възраст 47,54±11,74 г. и 85 жени на възраст от 21 г. до 70 г., средна възраст 48,53±13,30 г., активно потърсили медицинска помощ за редукция на тегло. Критерий за включване в проучването е установяване на най-малко умерен риск от ЗД тип 2 в следващите 10 години при оценка по скоровата система на Финландската диабетна асоциация – скор над 11 от максимално 26. Извършен е клъстерен анализ и анализ на главните компоненти по отношение на антропометричните измервания и изследванията на липидни и въглехидратни показатели, инсулин, С-пептид, креатинин, С-реактивен протеин, чернодробни ензими, както и на данните за бета-клетъчна функция, инсулинова чувствителност и инсулинова резистентност, определени чрез НОМА-калкулатор.

Резултати. Идентифицирани са два клъстера (рискови подгрупи лица), показващи ясно изразено влияние на факторите пол, степен на затлъстяване и степен на инсулинова резистентност. В Клъстер 1 (72,73% мъже) попадат лица с подчертано по-високостепенно затлъстяване, включително висцерално, и по-изразена степен на инсулинова резистентност в сравнение с лицата, попадащи в Клъстер 2 (95% жени). В Клъстер 1 честотата на пациентите с хипертриглицеридемия, захарен диабет и предиабет е статистически значимо ($P<0,05$) по-висока в сравнение с Клъстер 2.

Заключение. Нашето проучване потвърждава хетерогенния характер на метаболитните нарушения при лицата с повишен риск от развитие на ЗД тип 2, което подсказва наличие на различен по естество и степен сърдечно-съдов риск, като полът има определяща роля.

Ключови думи: затлъстяване, метаболитен синдром, клъстерен анализ, анализ на главните компоненти

Въведение:

Затлъстяването е обявено за пандемия от Световната Здравна Организация. Крос-секционно проучване (1), проведено през 2010 г. сред 16 европейски страни, между които и България, показва, че почти половината от лицата в зряла възраст (47,6% - 54,5% от мъжете и 40,8% от жените) са с наднормено тегло – индекс на телесна маса (BMI) >25 kg/m² или със затлъстяване - BMI>30 kg/m². Честотата на затлъстяване възлиза на 12,8% (14,0% при мъжете и 11,5% при жените) и нараства с възрастта. За периода от 1980 г. до 2013 г. в световен мащаб честотата на мъжете с наднормено тегло и затлъстяване е нараснала от 28,8% на 36,9%, а на жените – от 29,8% на 36,9% (2). Многочислените публикации показват, че затлъстяването и кардиометаболичните рискови фактори често се срещат в съчетание и вероятно са причинно-свързани, оформяйки т. нар. метаболитен синдром (3). Затлъстяването е свързано с повишен риск от артериална хипертония, дислипидемия, захарен диабет (ЗД) тип 2, исхемична болест на сърцето, инсулт, жлъчни заболявания, остеоартрит, сънна апнея и респираторни нарушения, както и някои ракови заболявания (4).

Подходът, при който се изследва значението на един единствен фактор, свързващ затлъстяването със ЗД тип 2 и сърдечно-съдовия риск, не отразява комплексния характер на връзката, тъй като се преплитат различни патогенетични механизми и е трудно да се прецизира ролята на всеки един от тях в определен момент (5). Наскоро публикувани проучвания за динамиката в плазмените нива на глюкозата, инсулиновата чувствителност, бета-клетъчната функция (6) и субклетъчното възпаление (7), предшествващи ЗД и сърдечно-съдовите усложнения, безспорно допринасят за познанията ни върху етиологията и патофизиологичните механизми, но съществуват риск от опростяване на взаимозависимостите между участващите комплексни и хетерогенни механизми.

Клъстерният анализ е мултивариантен метод за характеризиране на индивидите, посредством групирането им в относително хомоген-

ни подгрупи (клъстери) със сходни параметри. След като процедурата по клъстериране приключи, се провежда допълнителен анализ (напр. сравняване на параметрите между клъстерите, анализ на главните компоненти), за да се интерпретират получените резултати (8). Клъстерният анализ се отнася към експлораторните методи, анализиращи данните, получени в конкретно проучване (базира се на *a posteriori* информация) (9). Публикуваните проучвания с прилагане на клъстерен анализ при пациенти със затлъстяване и повишен риск от ЗД тип 2 са относително малко.

Цел на настоящото проучване е при пациенти с повишен риск от ЗД тип 2 да бъдат идентифицирани подгрупи с различно естество и степен на сърдечно-съдов риск на базата на съчетаване на наднормено тегло с други компоненти на метаболитния синдром.

Материал и методи

Проведено е напречносрезово проучване на лица, активно потърсили медицинска помощ за редукция на теглото в Кабинет за консултиране на пациенти със затлъстяване последователно за 1 година. Всички включени в проучването лица са подписали информирано съгласие данните им да бъдат статистически обработвани при спазване условия на конфиденциалност на информацията. Подходящите за участие в проучването лица са преценявани предварително въз основа на данни за физическа активност, консумация на плодове и зеленчуци, наличие на артериална хипертония и фамилна обремененост за ЗД. Критерий за включване е най-малко умерен риск (FINDRISK скор над 11 от максимално 26) от развитие на ЗД тип 2 в следващите 10 години според скоростата система на Финландската Диабетна Асоциация. Използваният критерий е съобразен с препоръчвания за българската популация по отношение на същия вариант на FINDRISK въпросника (10).

Анализирани са следните антропометрични и лабораторни показатели:

1. Параметри от биоимпедансното изследване, проведено с професионален анализатор на телесния състав (Tanita Body Composition Analyzer) – височина (height), тегло (weight), мазнини % (Fat%), мастна маса (Fat Mass), немасна маса (FFM), мускулна маса (muscle mass), общо количество вода (TBW), общо количество вода в % (TBW%), костна маса (bone mass), базална метаболитна скорост (BMR), метаболитна възраст (metabolic age), степен на натрупаната висцерална мастна тъкан (visceral fat rating), BMI, степен на затлъстяване (degree of obesity);

2. Лабораторни изследвания в серум – общ холестерол, холестерол във високотънностните липоротеини (HDL), холестерол в нискотънностните липопротеини (LDL), триглицериди, нива на глюкозата при орален глюкозотолерансен тест (OGTT) със 75 г глюкоза – на 0. минута (OGTT-0) и на 120. минута (OGTT-120), гликиран хемоглобин (HbA_{1c}), имунореактивен инсулин (IRI), С-пептид, С-реактивен протеин (CRP), аланин-аминотрансфераза (АЛАТ), аспартат-аминотрансфераза (АСАТ), креатинин. Всички лабораторни изследвания са извършени в една и съща сертифицирана за качество лаборатория по методици, рутинно използвани в лабораторната практика.

3. Допълнително с помощта на HOMA calculator (www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator) са изчислявани бета-клетъчна функция (%B) и инсулинова чувствителност (%S) като процент от нормална референтна популация и индекс на инсулинова резистентност HOMA IR, който е реципрочен на %S (100/%S).

Статистическият анализ е извършен с помощта на Statistica 12,0 software чрез клъстерен анализ и анализ на главни компоненти след преобразователно Z-трансформиране на данните, по следната формула: $Z_{ij} = (X_{ij} - \bar{X}_i) / S_i$, където Z_{ij} е Z-трансформираната стойност на параметъра, X_{ij} е реално измерената стойност на параметъра, \bar{X}_i е средната стойност на извадката, а S_i е стандартното отклонение. По този начин нормализирани безразмерни числа заместват истинските стойности на параметрите и това позволява, дори при значителни разлики в абсолютните стойности на параметрите, те да се представят чрез съотносими безразмерни величини. Използван е йерархичен клъстерен анализ (марка за подобие – квадрат на Евклидово разстояние; метод на свързване на обектите в клъстери – метод на Ward; критерий за значимост на клъстерите – критерий на Sneath или 2/3 Dmax; графично представяне – чрез дендрограма).

Приложен е анализ на главни компоненти с цел

оценяване структурата на набора от данни. За целта е използван Varimax нормализирана ротация, при която чрез линейни комбинации от изходните променливи се получават нови абстрактни променливи, наречени латентни фактори, при това оптимално ротирани един спрямо друг в новото координатно пространство, с цел най-добро разделяне на оригиналните променливи.

Резултати

Анализирани са медицинските записи от първото посещение на общо 113 лица – 28 мъже на възраст от 27 г. до 67 г., средна възраст – 47,54 ± 11,74 г. и 85 жени на възраст от 21 г. до 70 г., средна възраст 48,53 ± 13,30 г. (Таблица 1). Обедняващ признак за всички пациенти е това, че активно са потърсили съвет за редуция на тегло, ползвали са услугите на здравната система, включително на специалисти ендокринолози, добре са информирани за здравословното си състояние и за рисковете, свързани с наднорменото тегло и затлъстяването по отношение на развитието на сърдечно-съдови заболявания и ЗД.

Прави впечатление преобладаването на женския пол (72,22%) при активно търсене на съвети за намаляване на теглото, както и фенотипната хетерогенност на изследваните – срещат се лица с BMI <25 kg/m² и такива с много висок BMI – до 63,30 kg/m². Количеството на мастната маса като процент от теглото (Fat %) също варира в доста широки граници – от 10,3 до 55,7%. Това важи и за висцералната мастна тъкан (visceral fat rating), заемаща от 3 до 35%.

Дендрограмата от клъстерния анализ показва ясно разграничаване на два клъстера (Фигура 1). Разделянето на лицата в подгрупи на базата на клъстерния анализ има за резултат една по-малка група (*Клъстер 1*) от 33 лица (9 жени и 24 мъже) и една по-голяма, почти изцяло „женска“ група (*Клъстер 2*) от 80 лица (4 мъже и 76 жени). Клъстерният анализ потвърждава значението на фактора пол за фенотипната изява на метаболитния синдром.

Анализът на главните компоненти показва значението на *два абстрактни латентни фактора (Фактор 1 и Фактор 2)*, които могат да обяснят общо 50,75% от вариациите между подгрупите лица. Значението на отделните параметри за формирането на *латентен Фактор 1* са представени в Таблица 1 (маркирани с шрифт bold и italic) при ниво на значимост >0,7. Компоненти на *латентен Фактор 1* са параметри, характеризиращи затлъстяването (obesity

parameters) и инсулиновата резистентност – тегло, мастна маса (кг), висцерална мастна тъкан, BMI, степен на затлъстяване, инсулин, инсулинова чувствителност (с обратен знак) и инсулинова резистентност. Те обясняват общо 37,53% от вариациите между двата клъстера. Компоненти на *латентен Фактор 2* са антропометрични характеристики, несвързани със затлъстяването (non-obesity parameters) – височина, немасна маса, мускулна маса, общо количество вода в организма, костна маса, базална метаболитна скорост. Компонентите на *латентния Фактор 2* допълнително могат да обяснят 13,22% от вариациите между двата клъстера (Таблица 1).

След Z-трансформация на изследваните параметри са построени радари, визуализиращи характеристиките на двете подгрупи лица (двата клъстера) (Фигура 2 и Фигура 3. В *Клъстер 1* (72,73% мъже и 27,27% жени) попадат лица с по-високо тегло, дължащо се както на по-голямо количество на мастната маса, така и на немасната маса, с повече мускулна маса, по-голямо общо количество на вода в организма, висцерална мастна тъкан и костна маса, по-висока базална метаболитна скорост, по-висока степен на затлъстяване и с по-изразена инсулинова резистентност (НОМА-IR). В *Клъстер 2* (95% жени и 5% мъже) попадат лица с по-нискокостепенно затлъстяване, включително и висцерално.

Средните стойности на липидните показатели и за двете подгрупи са малко над референтните граници, но във всяка от тях се срещат и лица със значително повишени стойности. В *Клъстер 1* обаче честотата на хипертриглицеридемията е статистически значимо по-голяма, в сравнение с тази в *Клъстер 2* (63,63% спрямо 32,50%, $P < 0,05$) (Таблица 2). В *Клъстер 2* честотата на пациентите с хиперхолестеролемия (общ холестерол над 5,2 mmol/L) е 62,50% спрямо 39,33% в *Клъстер 1* ($P < 0,05$).

Резултатите от ОГТТ показват, че и в двата клъстера има лица с въглехидратни нарушения (нарушена гликемия на гладно – базална глюкоза от 5,6 до 6,9 mmol/L и/или намален глюкозен толеранс – глюкоза на 120-та мин. в хода на ОГТТ от 7,8 до 11,1 mmol/L. Честотата на повишена гликемия на гладно за *Клъстер 1* е значително по-висока, отколкото установената в *Клъстер 2* (51,51% спрямо 28,75%, $P < 0,05$).

В *Клъстер 2*, обаче, попада и един пациент със стойност на глюкозата на 120-та мин. над 11.1 mmol/L, характерна за ЗД. Същият има и ниво на HbA_{1c} от 7,0%.

Стойности на HbA_{1c} над 6,4% (критерий за ЗД) се установяват при 12,12% от пациентите в

Клъстер 1 и при 2,5% от пациентите в *Клъстер 2*. Тази разлика в честотите е статистически значима ($P < 0,05\%$) (Таблица 2). Ако за гранично (cut-off) ниво на HbA_{1c} се избере стойност 5,7% (критерий за предиабет на Американската диабетна асоциация, 2011), то честотата на пациентите с предиабет по този признак в *Клъстер 1* е 59,58%, спрямо 36,25% в *Клъстер 2* ($P < 0,05$). В *Клъстер 1* нивата на имунорективния инсулин по-често са повишени над референтната граница от 20,0 mU/L. Тези резултати безспорно корелират и с по-високата степен на инсулинова резистентност в тази група, потвърдени при изчисленията с НОМА-калкулатор.

С-реактивният протеин при една част от изследваните лица е значително повишен (достига до 30,90 при референтна стойност до 5 mg/L), но между подгрупите не се установява сигнификантна разлика в броя случаи с повишени нива. Не се установяват статистически значими разлики между двата клъстера по отношение на измерените активности на ASAT и ALAT. И в двата клъстера стойностите на серумния креатинин са в референтните граници за съответния пол и възраст.

Обсъждане

В резултат от прилагане на клъстерен анализ върху относително неголяма група пациенти ние идентифицираме две основни подгрупи лица със затлъстяване и повишен риск от развитие на ЗД тип 2, които активно търсят медицински съвети – такива, при които затлъстяването, макар и по-нискокостепенно, е основният проблем (*Клъстер 2*) и такива, при които освен затлъстяване е налице и инсулинова резистентност (*Клъстер 1*). И при двата типа, обаче, са налице и други компонентни на метаболитния синдром. Съотношението на половете в двата клъстера показва ясно изразено влияние на фактора пол – „мъжки“ клъстер (72,73% мъже) (*Клъстер 1*) и „женски“ клъстер (95,0% жени) (*Клъстер 2*).

Значението на пола и расата за фенотипните прояви на метаболитния синдром и затлъстяването са добре описани и от други автори (11). Нашите резултати при сходно проведения клъстерен анализ на жени във фертилна възраст, са еднопосочни и показват, че затлъстяването има най-голямо значение за кардиометаболитния риск при тази относително млада популация жени (12). Нашето проучване потвърждава наскоро публикувани данни на други български автори относително значително по-голямата активност на българските жени по отношение на търсене на меди-

Таблица 1. Характеристики на изследваните пациенти – общо и по подгрупи (кълъстери)

	Всички N = 113 Жени - 85 (75,22%) Мъже - 28 (24,78%)	Кълъстер 1 N= 33 Жени - 9 (27,27%) Мъже - 24 (72,73%)	Кълъстер 2 N = 80 Жени - 76 (95%) Мъже - 4 (5,00 %)	Факторно тегло (метод: нормализиран varimax) Извличане на главни- те компоненти. Зна- чително натоварване при >0,70	
				Фактор 1 37,53%	Фактор 2 13,22%
Променливи	Mean ± SD (Min ÷ Max)	Mean ± SD (Min ÷ Max)	Mean ± SD (Min ÷ Max)		
Възраст (год.)	48,28 ± 12,89 (21,00 ÷ 70,00)	46,30 ± 1,91 (26,00 ÷ 67,00)	49,10 ± 13,19 (21,00 ÷ 70,00)	0,23	-0,46
Ръст (см)	165,35 ± 9,90 (147,00 ÷ 192,00)	175,42 ± 9,63 (155,00 ÷ 192,00)	161,20 ± 6,35 (147,00 ÷ 177,00)	0,20	0,76
Тегло (кг)	99,99 ± 27,18 (55,80 ÷ 200,60)	131,18 ± 24,99 (80,20 ÷ 200,60)	87,13 ± 14,57 (55,80 ÷ 121,80)	0,71	0,65
Мазнини (%)	40,78 ± 7,60 (10,30 ÷ 55,70)	39,08 ± 9,65 (10,30 ÷ 55,70)	41,48 ± 6,43 (16,10 ÷ 54,70)	0,64	-0,42
Масна маса (кг)	41,41 ± 15,23 (8,30 ÷ 91,50)	52,57 ± 18,59 (8,30 ÷ 91,50)	36,81 ± 10,54 (9,00 ÷ 61,30)	0,81	0,25
Немасна маса (кг)	58,59 ± 15,87 (39,60 ÷ 138,40)	78,64 ± 14,49 (63,20 ÷ 138,40)	50,31 ± 5,67 (39,60 ÷ 63,80)	0,42	0,87
Мускулна маса (кг)	55,67 ± 15,12 (37,60 ÷ 131,80)	74,76 ± 13,83 (60,00 ÷ 131,80)	47,80 ± 5,41 (37,60 ÷ 60,60)	0,42	0,88
Общо количество вода (кг)	42,27 ± 12,73 (3,20 ÷ 98,30)	57,33 ± 11,35 (33,50 ÷ 98,30)	36,06 ± 6,48 (3,20 ÷ 55,00)	0,36	0,86
Общо количество вода (%)	42,98 ± 5,32 (33,10 ÷ 63,10)	44,94 ± 6,22 (33,60 ÷ 63,10)	42,17 ± 4,66 (33,10 ÷ 60,00)	-0,53	0,56
Костна маса (кг)	2,94 ± 0,74 (2,00 ÷ 6,60)	3,88 ± 0,66 (3,20 ÷ 6,60)	2,55 ± 0,28 (2,00 ÷ 3,20)	0,44	0,87
Базална метаболическа скорост (kJ)	7383,55 ± 2483,95 (68,58 ÷ 19414,00)	10242,45 ± 2148,08 (8276,00 ÷ 19414,00)	6204,25 ± 1413,27 (68,588 ÷ 067,00)	0,37	0,80
Базална метаболитна скорост (kcal)	1812,25 ± 518,59 (1226,00 ÷ 4640,00)	2448,00 ± 513,39 (1978,00 ÷ 4640,00)	1550,00 ± 180,84 (1226,00 ÷ 1943,00)	0,47	0,85
Метаболическа възраст (год.)	60,14 ± 13,44 (25,00 ÷ 84,00)	59,03 ± 13,50 (25,00 ÷ 82,00)	60,60 ± 13,39 (31,00 ÷ 84,00)	0,43	-0,49
Нагрупана вис- церална мастна тъкан	13,44 ± 6,31 (3,00 ÷ 35,00)	19,64 ± 5,97 (5,00 ÷ 35,00)	10,89 ± 4,35 (3,00 ÷ 29,00)	0,70	0,38
Индекс на телесна маса (kg/m ²)	36,18 ± 7,56 (23,20 ÷ 63,30)	42,77 ± 8,35 (30,90 ÷ 63,30)	33,46 ± 5,12 (23,20 ÷ 47,60)	0,80	0,36
Идеално телесно тегло (кг)	60,41 ± 7,31 (47,50 ÷ 81,10)	67,91 ± 7,33 (52,90 ÷ 81,10)	57,32 ± 4,50 (47,50 ÷ 68,90)	0,19	0,76
Степен на затлъстяване	64,52 ± 34,29 (5,50 ÷ 187,80)	94,46 ± 37,91 (40,40 ÷ 187,80)	52,17 ± 23,19 (5,50 ÷ 116,30)	0,80	0,36
АЛАТ (U/L)	22,56 ± 12,16 (5,00 ÷ 93,00)	26,27 ± 10,02 (10,00 ÷ 52,00)	21,03 ± 12,63 (5,00 ÷ 93,00)	0,18	0,29
АСАТ (U/L)	20,37 ± 8,42 (10,00 ÷ 81,00)	20,48 ± 5,29 (14,00 ÷ 37,00)	20,33 ± 9,43 (10,00 ÷ 81,00)	0,08	0,12

	Всички N = 113 Жени - 85 (75,22%) Мъже - 28 (24,78%)	Клъстер 1 N= 33 Жени - 9 (27,27%) Мъже - 24 (72,73%)	Клъстер 2 N = 80 Жени - 76 (95%) Мъже - 4 (5,00 %)	Факторно тегло (метод: нормализиран waistax) Извличане на главните компоненти. Значимо натоварване при >0,70	
				Фактор 1 37,53%	Фактор 2 13,22%
Променливи	Mean ± SD (Min ÷ Max)	Mean ± SD (Min ÷ Max)	Mean ± SD (Min ÷ Max)		
Креатинин (mcmol/L)	69,82 ± 5,01 (42,00 ÷ 122,00)	75,59 ± 6,98 (52,00 ÷ 117,70)	67,43 ± 13,38 (42,00 ÷ 122,00)	0,22	0,09
Общ холестерол (mmol/L)	5,50 ± 1,18 (2,00 ÷ 8,99)	5,29 ± 1,32 (2,00 ÷ 8,15)	5,58 ± 1,11 (3,08 ÷ 8,99)	0,01	-0,28
HDL-холестерол (mmol/L)	1,41 ± 0,37 (0,72 ÷ 2,21)	1,28 ± 0,32 (0,87 ÷ 2,21)	1,46 ± 0,37 (0,72 ÷ 2,21)	-0,51	-0,08
LDL-холестерол (mmol/L)	3,38 ± 1,05 (0,51 ÷ 6,22)	3,17 ± 1,15 (0,51 ÷ 5,48)	3,46 ± 0,99 (1,45 ÷ 6,22)	0,05	-0,27
Триглицериди (mmol/L)	1,61 ± 0,65 (0,39 ÷ 3,67)	1,90 ± 0,75 (0,44 ÷ 3,67)	1,49 ± 0,55 (0,39 ÷ 3,10)	0,5	-0,02
С-реактивен протеин (mg/L)	6,03 ± 5,04 (0,18 ÷ 30,90)	7,48 ± 5,27 (0,95 ÷ 18,50)	5,43 ± 4,82 (0,18 ÷ 30,90)	0,57	0,01
Глюкоза-0 (mmol/L)	5,44 ± 0,65 (3,60 ÷ 7,10)	5,83 ± 0,59 (5,00 ÷ 7,10)	5,29 ± 0,61 (3,60 ÷ 6,90)	0,43	0,20
Глюкоза-120 (mmol/L)	6,15 ± 1,77 (3,00 ÷ 11,40)	6,44 ± 1,72 (3,40 ÷ 10,90)	6,03 ± 1,78 (3,00 ÷ 11,40)	0,35	-0,09
HbA _{1c} (%)	5,73 ± 0,41 (4,80 ÷ 7,00)	5,85 ± 0,43 (5,10 ÷ 6,90)	5,67 ± 0,39 (4,80 ÷ 7,00)	0,32	0,06
Имунореактивен инсулин (mU/L)	16,70 ± 10,91 (3,67 ÷ 69,70)	23,88 ± 14,46 (4,85 ÷ 69,70)	13,73 ± 7,15 (3,67 ÷ 37,37)	0,74	0,28
С-пептиг (ng/mL)	4,12 ± 1,70 (1,74 ÷ 12,29)	5,16 ± 2,07 (2,76 ÷ 12,29)	3,69 ± 1,29 (1,74 ÷ 7,00)	0,69	0,26
НОМА-%В	132,01 ± 48,44 (56,20 ÷ 280,40)	148,77 ± 54,70 (56,20 ÷ 273,40)	125,10 ± 43,71 (58,30 ÷ 280,40)	0,57	0,16
НОМА-% S	64,50 ± 37,89 (12,20 ÷ 211,60)	45,27 ± 29,74 (12,20 ÷ 155,50)	72,43 ± 38,05 (20,90 ÷ 211,60)	-0,74	-0,1
НОМА-IR	2,17 ± 1,37 (0,47 ÷ 103,00)	3,08 ± 1,76 (0,64 ÷ 8,20)	1,79 ± 0,94 (0,47 ÷ 4,78)	0,75	0,28

цински съвети, свързани с проблемите на наднорменото тегло и сърдечно-съдовия риск (13).

През последното десетилетие метаболитният синдром е дефиниран по различни критерии, предлагани от различни организации, в повечето случаи - от Международната Диабетна Федерация и Американската Сърдечна Асоциация. През 2009 г. критериите за метаболитен синдром са уеднаквени по следния начин (14):

1. Увеличена обиколка на талията - популяционно дефинирана (за Европейската популация - за мъже ≥ 94 см (повишен риск); ≥ 102 см (силно повишен риск), за жени - ≥ 80 см (повишен риск); ≥ 88 см (силно повишен риск).

2. Повишени нива на триглицеридите ≥ 150 mg/dL (1,7 mmol/L) или лекарствена терапия по повод на повишени триглицериди.

3. Понижени нива на HDL-холестерола < 40

Таблица 2. Брой (честота в проценти) на лицата с метаболитни нарушения

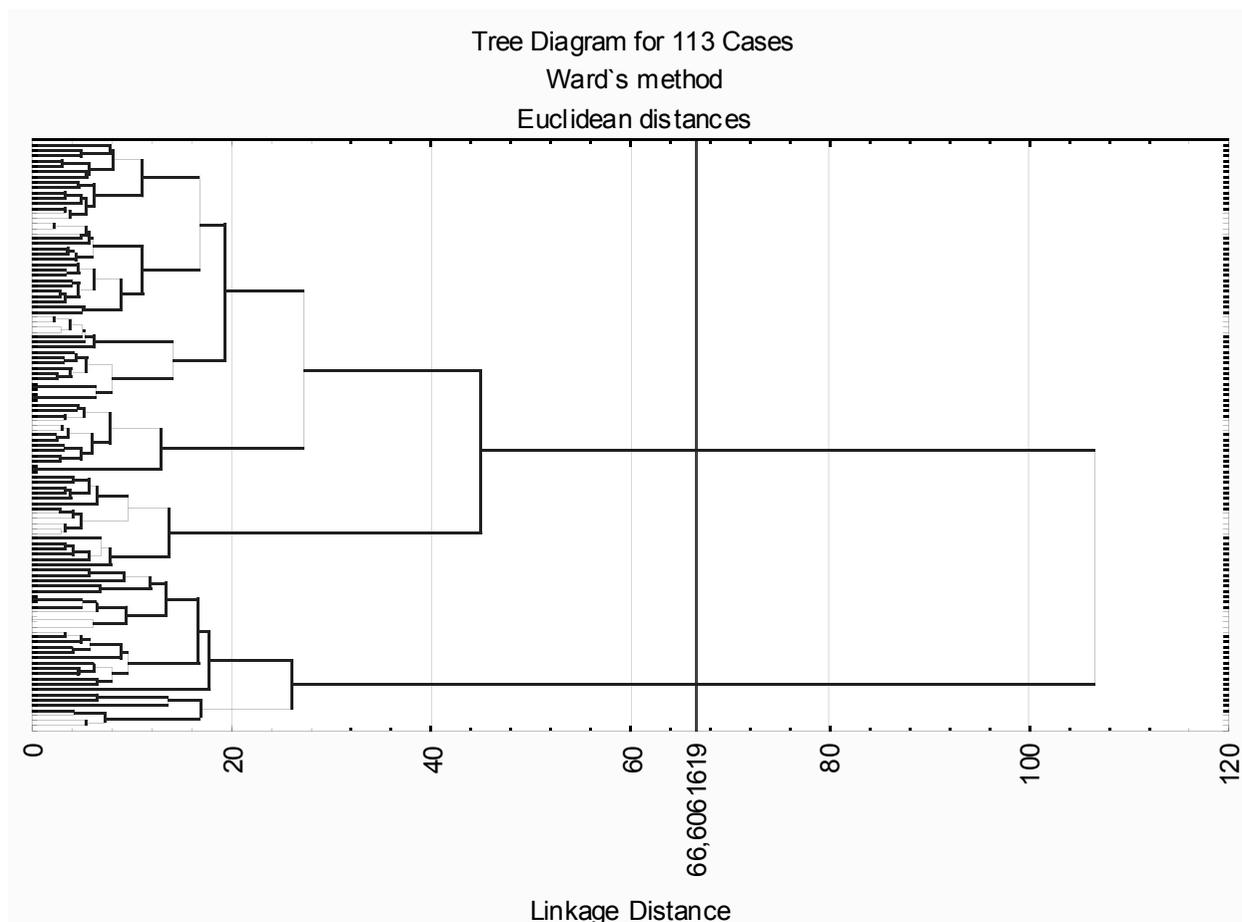
Критерий - Cut-off	Клъстер 1	Клъстер 2
Общ холестерол > 5,2 mmol/L	13 (39,33%)	50 (62,50%)*
HDL-холестерол < 1,0 mmol/L	7 (21,21%)	10 (12,50%)
LDL-холестерол > 3,2 mmol/L	15 (45,45%)	46 (57,50%)
Триглицериди > 1,7 mmol/L	21 (63,63%)	26 (32,50%)*
Глюкоза-0 > 5,6 mmol/L	17 (51,51%)	23 (28,75%)*
Глюкоза-120 > 7,8 mmol/L	7 (21,21%)	13 (16,25%)
HgA1C > 6,4%	4 (12,12%)	2 (2,5%)*
Имунореактивен инсулин > 20 mU/L	18 (54,54%)	13 (16,25%)*
С-пептид > 4,4 ng/mL	18 (54,54%)	18 (22,5%)*
Високо чувствителен С-реактивен протеин > 5 mg/L	18 (54,54%)	37 (46,25%)

* P < 0,05 two-tailed

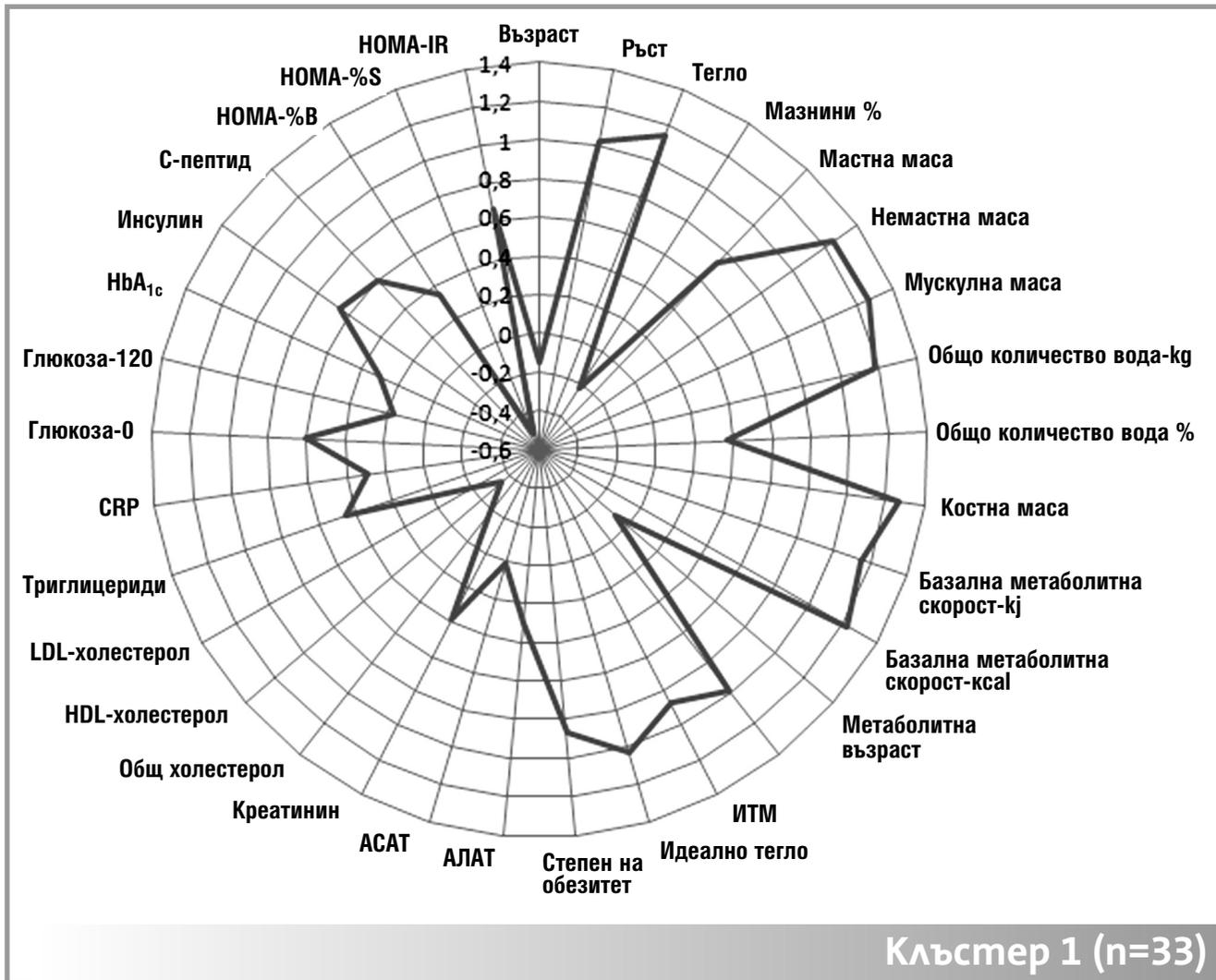
mg/dL (1,0 mmol/L) за мъжете; <50 mg/dL (1,3 mmol/L) за жените или лекарствена терапия по повод на ниски нива на HDL-холестерол

4. Повишено артериално налягане – систолно ≥ 130 mmHg и/или диастолно ≥ 85 mmHg, или антихипертензивна лекарствена терапия

Фигура 1. Дендрограма на участниците в проучването



Фигура 1. Радар на Клъстер 1

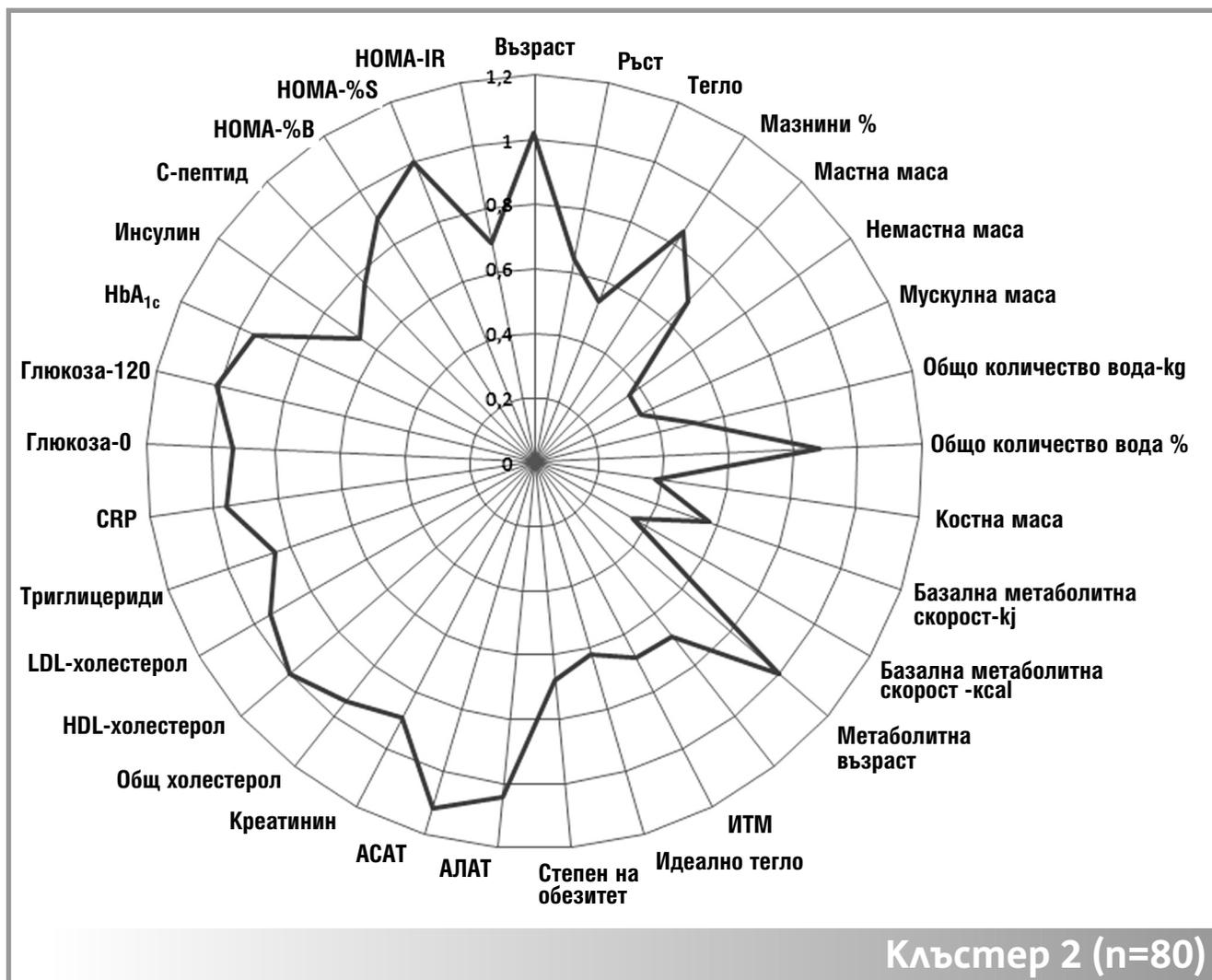


5. Повишено ниво на кръвната захар ≥ 100 mg/dL (5,6 mmol/l) или лекарствена терапия по повод на повишени нива на кръвната захар. При наличие на три от петте компонента се поставя диагнозата „метаболитен синдром“. Няма задължителен компонент на метаболитния синдром, но измерването на обиколката на талията се препоръчва за предварителен скрининг. Ниско реактивното възпаление, маркер на което е повишеният С-реактивен протеин, често не се включва в дефиницията за метаболитен синдром, независимо че е предиктор за сърдечно-съдово заболяване и ЗД тип 2 (15). Същото се отнася и за инсулиновата резистентност. Това би могло да доведе до подценяване на метаболитния риск при обезни индивиди. С оглед на това, критерий за включване в проучването на определени лица, измежду активно потърсилите

медицинска помощ за редукция на тегло, беше резултатът от скорвата оценка, показваща най-малко умерен риск от развитие на ЗД тип 2 според FINFRISK. Не всички лица, обаче, покриват по-горе цитираните критерии за поставяне на диагнозата „метаболитен синдром“. Около 15% от пациентите имат само 2 от формалните 5 критерия, цитирани по-горе, но пък имат или високи стойности на инсулина, или показват изразени въглехидратни нарушения.

Метаболитният синдром е доста хетерогенен като фенотипна изява. Пациентите със ЗД тип 2 се различават помежду си по отношение на степента на наднормено тегло в момента на поставяне на диагнозата (16). Дори при нормални стойности на BMI рискът от ЗД тип 2 може да бъде повишен при лицата с по-високо съдържание на мастна тъкан (17), вероятно поради

Фигура 2. Радар на Клъстер 2



съпътстващото ниско реактивно възпаление - т. нар. „затлъстяване при нормално тегло“ (18). Съществуват също и метаболитно здрави обезни индивиди, при които не се наблюдава наличие на съпътстващи рискови фактори. Наскоро публикуван метаанализ, обаче, показва, че дори и метаболитно здравите обезни индивиди са с повишен риск от развитие на ЗД тип 2 в сравнение с метаболитно здравите с нормално тегло (19).

Като потенциално ограничение на методологията на нашето проучване (20) може да се отчете първо фактът, че аналитичният ни подход (*клъстерен анализ*) е хипотеза-независим. Второ, като всяка мета-аналитична процедура, резултатът изцяло зависи от данните, включени в анализа. Трето, като всеки крос-секционен анализ, не можем да коментираме каузални връзки между параметрите *per se* и можем да устано-

вим единствено, че има разлики между идентифицираните подгрупи, които се нуждаят от по-подробно изучаване.

Заклучение

Нашето проучване потвърждава подчертано хетерогенния характер на метаболитния синдром, което подсказва участие на комплексни етиопатогенетични фактори, действащи вероятно по различен начин при мъжете и при жените. По-подробното целенасочено изучаване на разнообразното съчетание от метаболитни отклонения при лицата с повишен риск от развитие на ЗД тип 2 може да се използва за прецизиране на профилактичните и терапевтичните подходи при различен по естество и степен сърдечно-съдов риск.

Cluster Analysis of the Components of the Metabolic Syndrome in Subjects With an Increased Risk for Diabetes Mellitus Type 2

Andreeva-Gateva, Pavlina A.^{1,2}, Simeonov, Vasil D.³, Georgieva-Nikolova, Radka T.⁴, Tafradjiiska-Hadjiolova, Radka K.⁵

¹ Medical University of Sofia, Faculty of Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology

² University of Sofia „St Kliment Ohridsky“, Faculty of Medicine, Department of Internal Diseases, Pharmacology and Clinical Pharmacology, Pediatrics, Epidemiology, Infectious Diseases and Dermatology

³ University of Sofia „St Kliment Ohridsky“, Faculty of Chemistry and Pharmacy, Department of Analytical chemistry

⁴ Medical University of Sofia, Faculty of Medicine, Department of Chemistry and Biochemistry

⁵ Medical University of Sofia, Faculty of Medicine, Department of Pathophysiology

Address for correspondence:

Dr Pavlina Andreeva-Gateva

Department of Pharmacology and Toxicology

Medical University – Sofia, Faculty of Medicine, 2, Zdrave str

e-mail: pandreeva_gateva@yahoo.com

Abstract

The link of obesity to diabetes mellitus (DM) type 2 and cardiovascular risk is complex, different pathophysiological mechanisms are involved and it is difficult to precisely define the role of each one at any given moment.

The aim of this study was to identify subgroups with different pattern and stage of cardiovascular risk among subjects with an increased risk for DM type 2, based on the co-existence of overweight with other elements of the metabolic syndrome.

Materials and methods. A cross-sectional study on 113 subjects – 28 male (27-67 years, 47,54±11,74 years) and 85 female (21-70 years, 48,53±13,30 years) actively seeking medical advice about weight reduction was conducted. Inclusion criterion was at least moderate risk for DM type 2 within 10 years, based on the Finnish Diabetes Association scoring system – score above 11 from maximum of 26. Cluster analysis and principal components analysis were performed after anthropomorphic measurements and evaluations of lipid and carbohydrate parameters (during oral glucose tolerance test), insulin, C-peptide, creatinine, C-reactive protein, liver tests, and beta-cell function assessment, insulin sensitivity and insulin resistance, evaluated with HOMA-calculator.

Results. Two clusters (subgroups) of individuals at risk were identified, affected by sex, degree of obesity and degree of insulin resistance. *Cluster 1* (72,73% men) comprised subjects with a higher degree of obesity, including visceral obesity and higher degree of insulin resistance than the subjects in *Cluster 2* (95% women). In *Cluster 1* the prevalence of hypertriglyceridemia, diabetes mellitus and prediabetes was significantly higher ($P<0,05$), than in *Cluster 2*.

Conclusion. Our study confirms the heterogeneity of the metabolic disturbances in subjects with increased risk for DM type 2, suggesting different pattern and degree of cardiovascular risk, the sex being of determining importance.

Key words: obesity, metabolic syndrome, cluster analysis, principal components analysis

Introduction

Obesity was declared as pandemic by the World Health Organization. A cross-sectional study (1) conducted in 2010 in 16 European countries, including Bulgaria, showed that almost half of the adult individuals (47,6%, i.e. 54,5% of men and 40,8% of women) were overweight (body mass index BMI > 25 kg/m²) or obese (BMI > 30 kg/m²). The prevalence of obesity was 12,8% (14,0% in men and 11,5% in women) and increases with age. Between 1980 and 2013 worldwide the prevalence of overweight and obesity increased from 28,8% to 36,9% in the men and from 29,8% to 36,9% in the women (2). A lot of publications show that obesity and cardio-metabolic risk factors often coincide and probably were causally related forming the so called metabolic syndrome (3). Obesity was related with an increased risk of arterial hypertension, dyslipidemia, diabetes mellitus (DM) type 2, ischemic heart disease, stroke, biliary disease, osteoarthritis, sleep apnea and respiratory disturbances, as well as some cancers (4).

Approaching only one of the common factors for obesity, DM type 2 and cardiovascular risk do not reflect the complexity of the link. This was because different pathophysiological mechanisms were interrelated and it was difficult to define precisely their individual contribution in each moment of time (5). Recently published studies on the dynamic of plasma glucose levels, insulin sensitivity, beta-cell function (6) and sub-clinical inflammation (7) preceding DM and cardiovascular complications contribute to our etiological and pathophysiological knowledge, but there was a risk for oversimplifying the relationships among the involved complex and heterogeneous mechanisms.

The cluster analysis was a multivariate method for characterization of individuals forming relatively homogeneous subgroups (clusters) with similar parameters. An additional analysis was performed (i.e. a comparison of parameters among clusters, principal component analysis) after the end of the clustering procedure in order to interpret the obtained results (8). Cluster analysis was a type of exploratory method, analyzing data collected in a particular study (based on *a posteriori* information) (9). Up to now relatively few studies were published based on cluster analysis of patients with obesity and increased risk for DM type 2.

The aim of this study was to identify among patients with increased risk of DM type 2 subgroups with different pattern and stage of cardiovascular risk, based on co-occurrence of overweight with other metabolic syndrome compounds.

Material and methods

A cross-sectional study was conducted on subjects actively seeking medical advice for weight reduction successively recorded for a one-year period in an Outpatient consultation office for obese patients. All

A cross-sectional study was conducted on subjects actively seeking medical advice for weight reduction successively recorded for a one-year period in an Outpatient consultation office for obese patients. All subjects included into the study signed an informed consent about the confidentiality of the statistical analysis of their data. All eligible patients were initially assessed based on data for their physical activity, fruits and vegetables consumption, arterial hypertension and family history for DM. The inclusion criterion was at least a moderate risk (FINDRISK score above 11 from 26 maximum) for manifestation of DM type 2 during the next 10 years, according the score system of the Finish Diabetic Association. The used criterion was consistent with the recommended variant of use FINDRISK questionnaire for the Bulgarian population (10).

The anthropometric and laboratory parameters were analyzed, as follows:

1. The bioimpedance parameters were evaluated with a professional analyzer of body composition (Tanita Body Composition Analyzer) – height, weight, fat %, fat mass (kg), fat-free mass – FFM (kg), muscle mass (kg), total body water – TBW (kg), total body water in % (TBW%), bone mass (kg), basal metabolic rate (BMR), metabolic age, visceral fat rating, body mass index – BMI (kg/m²), degree of obesity.

2. Serum laboratory tests – alanine aminotransaminase – ALAT (U/L), aspartate aminotransaminase – ASAT (U/L), creatinine (mcmol/L), total cholesterol (mmol/L), HDL-cholesterol (mmol/L), LDL-cholesterol (mmol/L), triglycerides (mmol/L), high-sensitivity C-reactive protein – hs CRP (mg/L), serum glucose level (mmol/L) during oral glucose tolerance test (OGTT) with 75 g glucose – at 0 minute (glucose – 0) and at 120 minute (glucose – 120), glycated hemoglobin – HbA_{1c} (%), immunoreactive insulin – IRI (mU/L), C-peptide (ng/mL). All laboratory evaluations were performed in one and the same certified for quality laboratory using one and the same methods routinely applied in laboratory practice.

3. Additionally, beta-cell function (%B) and insulin sensitivity (%S) as a percent from a normal referent population and insulin resistance HOMA IR, as a reciprocal of %S (100/%S). were calculated using HOMA calculator (www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator).

The statistical analysis was performed using Statistica 12,0 software. *Cluster analysis and principal components analysis* were done after the preliminary Z-transformation of the data, according to the following formula: $Z_{ij} = (X_{ij} - \bar{X}_i) / S_i$, where Z_{ij} was the Z-transformed value of the parameter, X_{ij} was the actually measured value of the parameter, \bar{X}_i was the mean value of the sample, and S_i was the standard deviation. Thus normalized immeasurable numbers replace the real values of the parameters, allowing their expression as comparable immeasurable values even with big differences in the absolute dimensions of the parameters. Hierarchic cluster analysis (squared Euclidean distance as a similarity measure,

Ward's method for clustering, Sneath criterion i.e. $2/3 D_{\max}$ and a graphical presentation – dendrogram) were used.

The principal components analysis was applied in order to evaluate the structure of the data set. For this purpose Varimax normalized rotation was used, where new abstract variables, so called latent factors, were obtained by lineal combinations of the initial variables. They were additionally optimally vis-a-vis rotated in a new coordinate space aiming the best separation of the original variables.

Results

The medical records from the first visit of 113 patients (28 men aged from 27 to 67 years, mean age $47,54 \pm 11,74$ years and 85 women, aged from 21 to 70 years, mean age $48,53 \pm 13,30$ years) were analyzed (Table 1). Common features for all patients were that they were all actively-seeking medical advice for weight reduction, had already been in contact with the health care system, including with endocrinology specialists; and all of them were well-informed about their health status and the risks for cardiovascular diseases and DM, related with overweight and obesity.

It was impressive that among the individuals, who actively-seek advice for weight reduction the overall preponderance of women was 72,22%. A phenotypical heterogeneity of the studied subjects – subjects with BMI less than 25 kg/m^2 , as well as with very high BMI – up to $63,3 \text{ kg/m}^2$ was observed. The fat mass also varied significantly – from 10,3 up to 55,7%; the same was true for visceral fat rating, varying from 3 to 35%.

The dendrogram from the cluster analysis clearly showed two clusters (Figure 1). The subjects classification based on the cluster analysis produced a smaller subgroup (*Cluster 1*) with 33 subjects (9 women and 24 men) and a bigger almost entirely „female“ subgroup (*Cluster 2*) with 80 subjects (4 men and 76 women). The cluster analysis confirmed the importance of the factor „sex“ for the phenotypical presentation of the metabolic syndrome.

The principal components analysis showed the importance of two abstract *latent factors* (*Factor 1* and *Factor 2*) explaining 50,75% of the between-cluster variation. The contribution of particular parameters for *Factor 1* is seen in Table 1 (marked in bold and italic) with level of significance $> 0,7$. The constituents of the *latent Factor 1* were parameters characterizing obesity (obesity parameters) and insulin resistance – weight, fat mass (kg), visceral fat rating, BMI, degree of obesity, insulin, insulin sensitivity (reversed) and insulin resistance. They explain 37,53% of the between-cluster variations. The constituents of the *latent Factor 2* additionally could explain 13,22% of the between-cluster variations (Table 1).

After the Z-transformation of the studied parameters, radars were built visualizing the characteristics of the two subgroups (clusters) (Figure 2 and Figure 3). In *Cluster 1* (72,73% men and 27,27% women) were included subjects with a higher weight, due to higher quantity of fat mass but also due to nonfat mass – with greater muscle mass, higher total body water, higher visceral fat rating and bone mass, higher basal metabolic rate, higher degree of obesity and higher insulin resistance (HOMA-IR). In *Cluster 2* (95% women and 5% men) subjects with lower degree of obesity, including lower visceral fat rating, were included.

The mean values of the lipid parameters of both subgroups were slightly above the reference ranges. In both of clusters however subjects with substantially higher values could be observed. Furthermore, in *Cluster 1* the prevalence of hypertriglyceridemia was statistically significantly higher than in *Cluster 2* (63,63% versus 32,50%, $P < 0,05$) (Table 2). In *Cluster 2* the prevalence of hypercholesterolemia (total cholesterol above 5,2 mmol/L) was significantly higher – 62,50% versus 39,33% in *Cluster 1* ($P < 0,05$).

The results from OGTT showed that in both clusters carbohydrate disturbances were recorded (impaired fasting glucose: baseline glucose – 5,6 to 6,9 mmol/L and/or impaired glucose tolerance: glucose at 120th min of the OGTT – 7,8 to 11,1 mmol/L). The prevalence of the fasting hyperglycemia in *Cluster 1* was significantly higher than in *Cluster 2* (51,51% versus 28,75%, $P < 0,05$).

In *Cluster 2* however there was one subject with glucose level above 11,1 mmol/l at 120th min suggesting DM. The HbA_{1c} value for this subject was 7,0%.

Values of HbA_{1c} above 6,4% (criterion for DM) were detected in 12,12% of the subjects in *Cluster 1* and in 2,5% of the subjects of *Cluster 2*. This difference in the prevalence was statistically significant ($P < 0,05$) (Table 2). The prevalence of prediabetes was 59,58 % for *Cluster 1* versus 36,25 % for *Cluster 2* ($P < 0,05$) if a cut-off 5,7% was chosen for the HbA_{1c} (prediabetes criterion of American Diabetes Association, 2011).

In *Cluster 1* the levels of the immunoreactive insulin were more often above the upper reference limit of 20,0 mU/L. Those results correlated with the higher insulin resistance level in this subgroup.

The C-reactive protein was markedly higher in some of the subjects (reaching up to 30,90 with an upper limit of normal below 5 mg/L), but significant differences in the prevalence of subjects with an increased CRP could not be detected between the groups. The ASAT and ALAT levels did not differ significantly between the clusters. In both clusters creatinine values were in the reference ranges for the corresponding sex and age.

Table 1. Characteristics of the studied patients – all and by subgroups (clusters)

	All N = 113 Female – 85 (75,22%) Male – 28 (24,78%)	Cluster 1 N= 33 Female – 9 (27,27%) Male – 24 (72,73%)	Cluster 2 N = 80 Female – 76 (95%) Male – 4 (5,00 %)	Factor loading (Varimax normalized) Extraction: principal components Marked loading at >0,70	
				Factor 1 37,53%	Factor 2 13,22%
Variables	Mean ± SD (Min ÷ Max)	Mean ± SD (Min ÷ Max)	Mean ± SD (Min ÷ Max)		
Age (y)	48,28 ± 12,89 (21,00 ÷ 70,00)	46,30 ± 1,91 (26,00 ÷ 67,00)	49,10 ± 13,19 (21,00 ÷ 70,00)	0,23	-0,46
Height (cm)	165,35 ± 9,90 (147,00 ÷ 192,00)	175,42 ± 9,63 (155,00 ÷ 192,00)	161,20 ± 6,35 (147,00 ÷ 177,00)	0,20	0,76
Weight (kg)	99,99 ± 27,18 (55,80 ÷ 200,60)	131,18 ± 24,99 (80,20 ÷ 200,60)	87,13 ± 14,57 (55,80 ÷ 121,80)	0,71	0,65
Fat (%)	40,78 ± 7,60 (10,30 ÷ 55,70)	39,08 ± 9,65 (10,30 ÷ 55,70)	41,48 ± 6,43 (16,10 ÷ 54,70)	0,64	-0,42
Fat mass (kg)	41,41 ± 15,23 (8,30 ÷ 91,50)	52,57 ± 18,59 (8,30 ÷ 91,50)	36,81 ± 10,54 (9,00 ÷ 61,30)	0,81	0,25
FFM (kg)	58,59 ± 15,87 (39,60 ÷ 138,40)	78,64 ± 14,49 (63,20 ÷ 138,40)	50,31 ± 5,67 (39,60 ÷ 63,80)	0,42	0,87
Muscle Mass (kg)	55,67 ± 15,12 (37,60 ÷ 131,80)	74,76 ± 13,83 (60,00 ÷ 131,80)	47,80 ± 5,41 (37,60 ÷ 60,60)	0,42	0,88
TBW (kg)	42,27 ± 12,73 (3,20 ÷ 98,30)	57,33 ± 11,35 (33,50 ÷ 98,30)	36,06 ± 6,48 (3,20 ÷ 55,00)	0,36	0,86
TBW (%)	42,98 ± 5,32 (33,10 ÷ 63,10)	44,94 ± 6,22 (33,60 ÷ 63,10)	42,17 ± 4,66 (33,10 ÷ 60,00)	-0,53	0,56
Bone Mass (kg)	2,94 ± 0,74 (2,00 ÷ 6,60)	3,88 ± 0,66 (3,20 ÷ 6,60)	2,55 ± 0,28 (2,00 ÷ 3,20)	0,44	0,87
BMR (kJ)	7383,55 ± 2483,95 (68,58 ÷ 19414,00)	10242,45 ± 2148,08 (8276,00 ÷ 19414,00)	6204,25 ± 1413,27 (68,588 ÷ 067,00)	0,37	0,80
BMR (kcal)	1812,25 ± 518,59 (1226,00 ÷ 4640,00)	2448,00 ± 513,39 (1978,00 ÷ 4640,00)	1550,00 ± 180,84 (1226,00 ÷ 1943,00)	0,47	0,85
Metabolic age (y)	60,14 ± 13,44 (25,00 ÷ 84,00)	59,03 ± 13,50 (25,00 ÷ 82,00)	60,60 ± 13,39 (31,00 ÷ 84,00)	0,43	-0,49
Visceral Fat Rating	13,44 ± 6,31 (3,00 ÷ 35,00)	19,64 ± 5,97 (5,00 ÷ 35,00)	10,89 ± 4,35 (3,00 ÷ 29,00)	0,70	0,38
BMI (kg/m ²)	36,18 ± 7,56 (23,20 ÷ 63,30)	42,77 ± 8,35 (30,90 ÷ 63,30)	33,46 ± 5,12 (23,20 ÷ 47,60)	0,80	0,36
Ideal Body Weight (kg)	60,41 ± 7,31 (47,50 ÷ 81,10)	67,91 ± 7,33 (52,90 ÷ 81,10)	57,32 ± 4,50 (47,50 ÷ 68,90)	0,19	0,76
Degree of Obesity	64,52 ± 34,29 (5,50 ÷ 187,80)	94,46 ± 37,91 (40,40 ÷ 187,80)	52,17 ± 23,19 (5,50 ÷ 116,30)	0,80	0,36
ALAT (U/L)	22,56 ± 12,16 (5,00 ÷ 93,00)	26,27 ± 10,02 (10,00 ÷ 52,00)	21,03 ± 12,63 (5,00 ÷ 93,00)	0,18	0,29
ASAT (U/L)	20,37 ± 8,42 (10,00 ÷ 81,00)	20,48 ± 5,29 (14,00 ÷ 37,00)	20,33 ± 9,43 (10,00 ÷ 81,00)	0,08	0,12

	All N = 113 Female - 85 (75,22%) Male - 28 (24,78%)	Cluster 1 N= 33 Female - 9 (27,27%) Male - 24 (72,73%)	Cluster 2 N = 80 Female - 76 (95%) Male - 4 (5,00 %)	Factor loading (Varimax normalized) Extraction: principal components Marked loading at >0,70	
				Factor 1 37,53%	Factor 2 13,22%
Variables	Mean ± SD (Min ÷ Max)	Mean ± SD (Min ÷ Max)	Mean ± SD (Min ÷ Max)		
Creatinine (mcmol/L)	69,82 ± 5,01 (42,00 ÷ 122,00)	75,59 ± 6,98 (52,00 ÷ 117,70)	67,43 ± 13,38 (42,00 ÷ 122,00)	0,22	0,09
Total cholesterol (mmol/L)	5,50 ± 1,18 (2,00 ÷ 8,99)	5,29 ± 1,32 (2,00 ÷ 8,15)	5,58 ± 1,11 (3,08 ÷ 8,99)	0,01	-0,28
HDL-cholesterol (mmol/L)	1,41 ± 0,37 (0,72 ÷ 2,21)	1,28 ± 0,32 (0,87 ÷ 2,21)	1,46 ± 0,37 (0,72 ÷ 2,21)	-0,51	-0,08
LDL-cholesterol (mmol/L)	3,38 ± 1,05 (0,51 ÷ 6,22)	3,17 ± 1,15 (0,51 ÷ 5,48)	3,46 ± 0,99 (1,45 ÷ 6,22)	0,05	-0,27
Triglycerides (mmol/L)	1,61 ± 0,65 (0,39 ÷ 3,67)	1,90 ± 0,75 (0,44 ÷ 3,67)	1,49 ± 0,55 (0,39 ÷ 3,10)	0,5	-0,02
hs CRP (mg/L)	6,03 ± 5,04 (0,18 ÷ 30,90)	7,48 ± 5,27 (0,95 ÷ 18,50)	5,43 ± 4,82 (0,18 ÷ 30,90)	0,57	0,01
Glucose-0 (mmol/L)	5,44 ± 0,65 (3,60 ÷ 7,10)	5,83 ± 0,59 (5,00 ÷ 7,10)	5,29 ± 0,61 (3,60 ÷ 6,90)	0,43	0,20
Glucose-120 (mmol/L)	6,15 ± 1,77 (3,00 ÷ 11,40)	6,44 ± 1,72 (3,40 ÷ 10,90)	6,03 ± 1,78 (3,00 ÷ 11,40)	0,35	-0,09
HbA_{1c} (%)	5,73 ± 0,41 (4,80 ÷ 7,00)	5,85 ± 0,43 (5,10 ÷ 6,90)	5,67 ± 0,39 (4,80 ÷ 7,00)	0,32	0,06
IRI (mU/L)	16,70 ± 10,91 (3,67 ÷ 69,70)	23,88 ± 14,46 (4,85 ÷ 69,70)	13,73 ± 7,15 (3,67 ÷ 37,37)	0,74	0,28
C-peptide (ng/mL)	4,12 ± 1,70 (1,74 ÷ 12,29)	5,16 ± 2,07 (2,76 ÷ 12,29)	3,69 ± 1,29 (1,74 ÷ 7,00)	0,69	0,26
HOMA-% B	132,01 ± 48,44 (56,20 ÷ 280,40)	148,77 ± 54,70 (56,20 ÷ 273,40)	125,10 ± 43,71 (58,30 ÷ 280,40)	0,57	0,16
HOMA-% S	64,50 ± 37,89 (12,20 ÷ 211,60)	45,27 ± 29,74 (12,20 ÷ 155,50)	72,43 ± 38,05 (20,90 ÷ 211,60)	-0,74	-0,1
HOMA-IR	2,17 ± 1,37 (0,47 ÷ 103,00)	3,08 ± 1,76 (0,64 ÷ 8,20)	1,79 ± 0,94 (0,47 ÷ 4,78)	0,75	0,28

Discussion

As a result from the application of a cluster analysis application on a relatively small subject group, we identified two main patterns of obesity with increased risk for DM type 2 in patients actively seeking medical advice – pattern with obesity although with lower grade as a main problem (*Cluster 2*) and pattern with obesity and insulin resistance (*Cluster 1*). In both pat-

terns other components of the metabolic syndrome were also presented. The sex distribution in both clusters clearly showed the importance of the gender factor – „male“ cluster (72,73% men) (*Cluster 1*) and „female“ cluster (95,0% women) (*Cluster 2*).

The importance of sex and race for the metabolic syndrome and obesity phenotype were well described elsewhere (11). Our results comply with similarly conducted cluster analysis in women in fertile age showing that obesity was the most important cardiomet-

Table 2. Number (prevalence in %) of patients with metabolic disturbances

Cut-off	Cluster 1	Cluster 2
Total cholesterol > 5,2 mmol/L	13 (39,33%)	50 (62,50%)*
HDL-cholesterol < 1,0 mmol/L	7 (21,21%)	10 (12,50%)
LDL-cholesterol > 3,2 mmol/L	15 (45,45%)	46 (57,50%)
Triglycerides > 1,7 mmol/L	21 (63,63%)	26 (32,50%)*
Glucose-0 > 5,6 mmol/L	17 (51,51%)	23 (28,75%)*
Glucose-120 > 7,8 mmol/L	7 (21,21%)	13 (16,25%)
HgA _{1C} > 6,4%	4 (12,12%)	2 (2,5%)*
Immunoreactive insulin > 20 mU/L	18 (54,54%)	13 (16,25%)*
C-peptide > 4,4 ng/mL	18 (54,54%)	18 (22,5%)*
High-sensitivity C-reactive protein > 5 mg/L	18 (54,54%)	37 (46,25%)

*P < 0,05 two-tailed

Figure 1. Dendrogram the of subjects included into the study

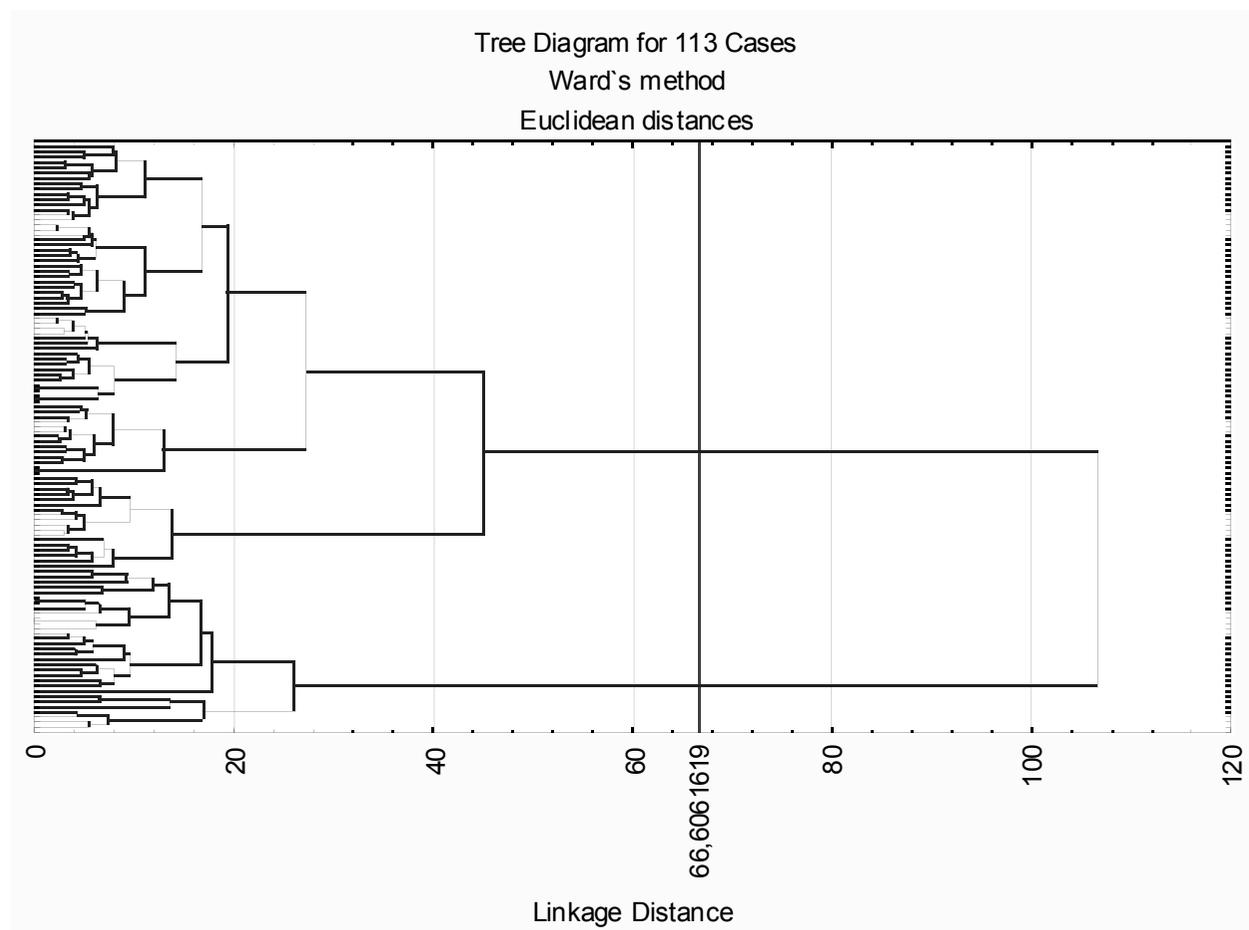
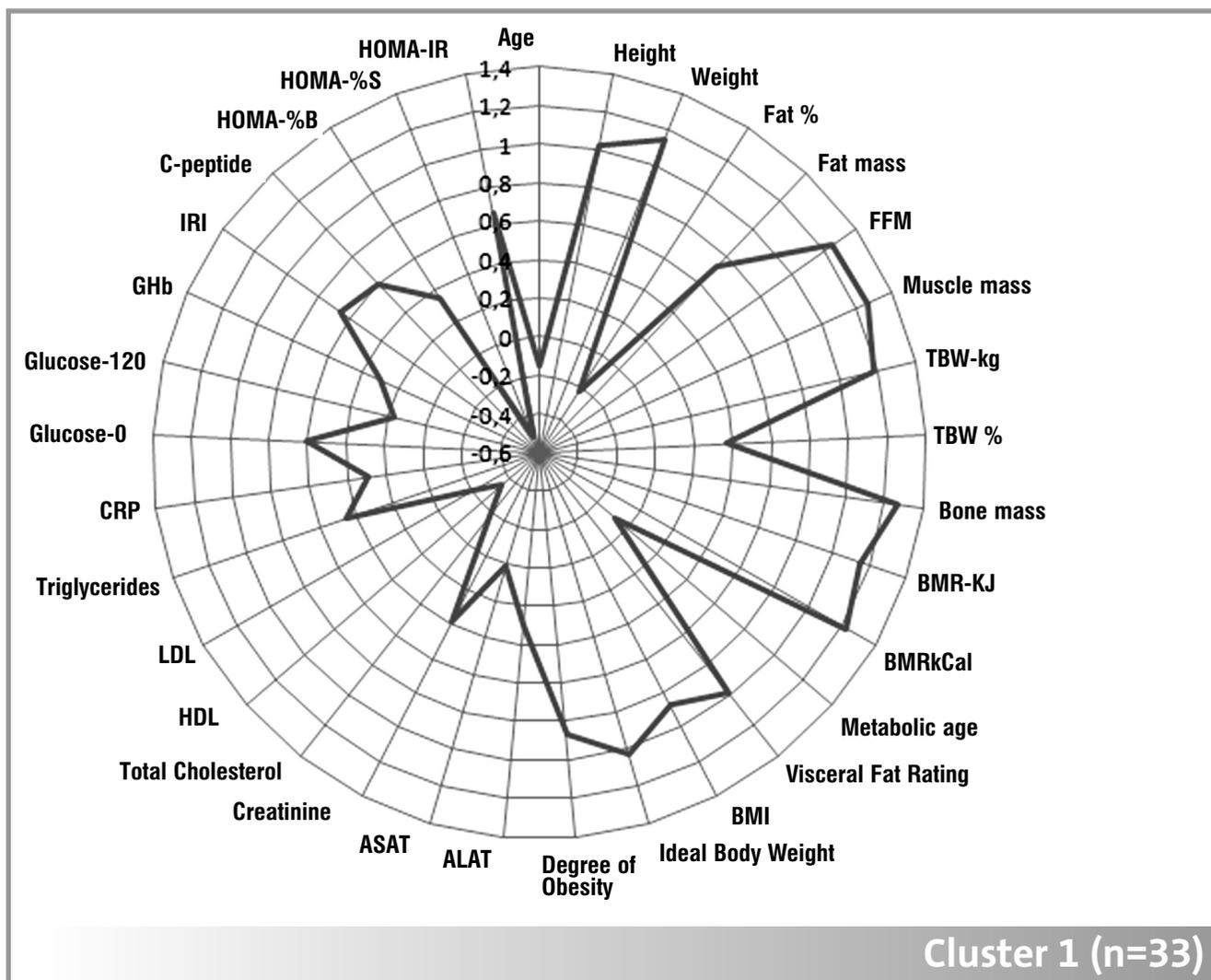


Figure 2. Radar of Cluster 1



bolic risk factor for such a population (12). Our study confirmed recently published data from other Bulgarian authors demonstrating considerably higher activity of Bulgarian women seeking medical advice for overweight related problems and cardiovascular risk (13).

During the last decade the metabolic syndrome was defined by different criteria, proposed by various organizations, mostly the International Diabetic Federation and the American Heart Association. In 2009 the metabolic syndrome criteria were unified as follows (14):

1. Increased waist circumference – population defined (Caucasian population – for men ≥ 94 cm (increased risk), ≥ 102 cm (highly increased risk); for women – ≥ 80 cm (increased risk), ≥ 88 cm (highly increased risk).

2. Increased levels of triglycerides ≥ 150 mg/dL (1,7 mmol/L) or drug therapy of increased triglycerides.

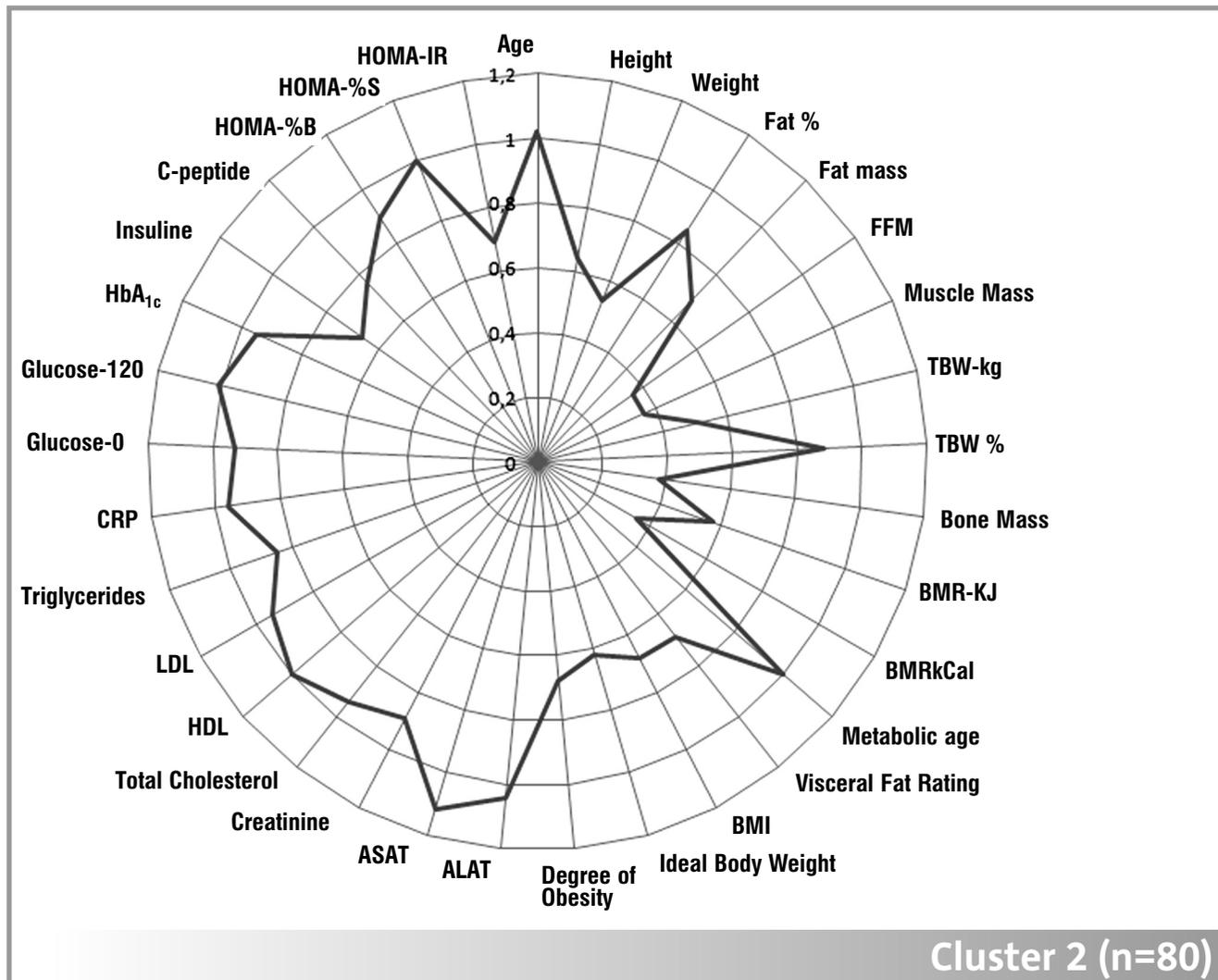
3. Decreased levels of HDL-cholesterol <40 mg/dL (1,0 mmol/L) for men and <50 mg/dL (1,3 mmol/L) for women or drug therapy of low HDL-cholesterol.

4. Increased arterial blood pressure – systolic ≥ 130 mmHg and/or diastolic ≥ 85 mmHg, or antihypertensive drug therapy.

5. Increased blood glucose level ≥ 100 mg/dL (5,6 mmol/L) or drug therapy because of increased blood glucose levels.

The manifestation of 3 from 5 components was consistent with the diagnosis „metabolic syndrome“. There were no obligatory components of the metabolic syndrome, but waist circumference measurement was suggested as preliminary screening. Low grade inflammation, as indicated by increased C-reactive protein often was omitted from the definition of the metabolic syndrome, albeit a predictor for cardiovascular disease and DM type 2 (15). The same was true for the insulin resistance. This could lead to underestimation of the metabolic risk in obese individuals. Therefore, the criterion for inclusion into the study was a score consistent with at least moderate risk for DM type 2

Figure 3. Radar of Cluster 2



according to FINDRISK. Not all of enrolled subjects however covered the above-mentioned criteria for the metabolic syndrome. About 15% of them presented with only 2 out of 5 criteria, but had also increased insulin levels or carbohydrate metabolism disturbances.

The metabolic syndrome was highly heterogenic phenotypically. The patients with DM type 2 differed by the degree of obesity at the moment of establishing the diagnosis (16). Even with normal BMI values the risk for DM type 2 could be increased in individuals with higher fat mass (17) probably due to coexisting low grade reactive inflammation – the so called normal-weight obesity (18). Metabolically healthy obese individuals without associated risk factors also exist. A recently published meta-analysis however indicates

that even metabolically healthy obese subjects had an increased risk for DM type 2, as compared with normal weight metabolically healthy individuals (19).

A potential limitation of the methodology of our study (20) is the fact that our analytic tool (cluster analysis) was a hypothesis-free. Furthermore, the result depended entirely on the data included in the analysis as it holds true for all meta-analytical procedures. And finally, we cannot make comments on the causal relationship among the studied parameters per se which results from the cross-sectional design. We can only reveal that there were differences between the groups, needing further evaluation.

Conclusion

Our study supports the heterogeneity of the metabolic syndrome, suggesting that etiological and pathogenic factors were probably differently involved in men and in women. A detailed purposeful study of the varied combinations of the metabolic disturbances in subjects with an increased risk for DM type 2 could be useful for refining our preventive and therapeutic approaches depending on the pattern and degree of the cardiovascular risk.

References

1. Gallus S, Lugo A, Murisic B, Bosetti C, Boffetta P, La Vecchia C. Overweight and obesity in 16 European countries. *Eur J Nutr*. 2014 Aug 5. [Epub ahead of print]
2. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet* - 29 May 2014. doi:10.1016/S0140-6736(14)60460-8
3. Kurtoglu S, Akin L, Kendirci M, Hatipoglu N, Elmali F, Mazioglu M. The absence of insulin resistance in metabolic syndrome definition leads to underdiagnosing of metabolic risk in obese patients. *Eur J Pediatr* 2012; 171(9): 1331-1337.
4. Jensen M, Ryan D, Apovian C, Ard J, Comuzzie A, Donato K et al. 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society. *Circulation* 2014; 129 (25 Suppl 2): S102-38
5. Golden S, Brown A, Cauley J, Chin M, Gary-Webb T, Kim C, et al. Health Disparities in Endocrine Disorders: Biological, Clinical, and Nonclinical Factors—An Endocrine Society Scientific Statement. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(9): E1579–E1639.
6. Tabák AG, Jokela M, Akbaraly T, Brunner EJ, Kivimäki M, Witte DR. Trajectories of glycaemia, insulin sensitivity, and insulin secretion before diagnosis of type 2 diabetes: an analysis from the Whitehall II study. *Lancet* 2009; 373 (9682):2215-2221.
7. Tabák AG, Carstensen M, Witte DR, Brunner EJ, Shipley MJ, Jokela M, et al. Adiponectin trajectories before type 2 diabetes diagnosis: Whitehall II study. *Diabetes Care* 2012; 35(12): 2540-2547.
8. Hu F. Obesity Epidemiology. *Oxford University Press* 2008, 512 p.
9. Schulze MB, Hoffmann K. Methodological approaches to study dietary patterns in relation to risk of coronary heart disease and stroke. *Br J Nutr* 2006; 95(5): 860-869
10. Tankova, T, Chakarova N., Dakovska L, Atanassova I. Evaluation of the Finnish Diabetes Risk Score as a screening tool for impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance and undetected diabetes. *Diab. Res. Clin. Pract.* 2010; 92(1): 46-95.
11. Patel MJ, Batch BC, Svetkey LP, Bain JR, Turer CB, Haynes C, et al. Race and sex differences in small-molecule metabolites and metabolic hormones in overweight and obese adults. *OMICS* 2013;17(12): 627-635.
12. Tzeng CR, Chang YC, Chang YC, Wang CW, Chen CH, Hsu MI. Cluster analysis of cardiovascular and metabolic risk factors in women of reproductive age. *Fertil Steril* 2014; 101(5): 1404-1410.
13. Chakarova N, Christov V, Tankova T, Dimitrova R, Petkova M. FINDRISK as a screening tool for Metabolic syndrome and increased risk for diabetes. *Endocrinologia* 2014; 19(1): 28-35.
14. Alberti KG, Eckel R, Grundy S, Zimmet P, Cleeman J, Donato K, et al. Harmonizing the Metabolic Syndrome. A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009; 120: 1640-1645.
15. Ridker PM. Inflammatory biomarkers and risks of myocardial infarction, stroke, diabetes, and total mortality: implications for longevity. *Nutr Rev* 2007; 65 (12 Pt 2): S253-259.
16. Pery IJ, Wannamethee SG, Walker MK, Thomson AG, Whincup PH, Shaper AG. Prospective study of risk factors for development of non-insulin dependent diabetes in middle aged British men. *BMJ* 1995; 310(6979): 560–564.
17. Gómez-Ambrosi J, Galofré SC, Santos EJS, Valentí GMJV, Ramírez RFB, Fröhbeck SJG. Body adiposity and type 2 diabetes: increased risk with a high body fat percentage even having a normal BMI. *Obesity (Silver Spring)* 2011;19(7):1439-1444.
18. De Lorenzo A, Del Gobbo V, Premrov MG, Bigioni M, Galvano F, Di Renzo L. Normal-weight obese syndrome: early inflammation? *Am J Clin Nutr* 2007; 85 (1): 40-45.
19. Bell JA, Kivimäki M, Hamer M. Metabolically healthy obesity and risk of incident type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Obesity Reviews* 2014; 15: 504–515.
20. Aldenderfer, M. S., & Blashfield, R. K. Cluster analysis. Newbury Park, CA: Sage Publications 1984, 30-56.



Casus pro diagnosi

Нончев, Боян Ив., Аргатска, Антоанета В., Орбецова, Мария М.

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

Представя се случай на 26 годишна пациентка с анамнестични данни за тиреоидна патология от 7 годишна възраст (увеличена щитовидната жлеза, клинични признаци на тиреотоксикоза). В миналото по този повод е провеждано тиреостатично лечение като липсва конкретна информация за лекарствени средства, доза и срок на приложение. През 2007 г. след първа нормално протекла бременност и раждане са установени високи нива на FT₄ и FT₃ при стойности на TSH в референтни граници и клинични данни за лека форма на тиреотоксикоза. Иницирано е тиреостатично лечение като неколкостепенно са провеждани курсове с тирозол и пропицил във високи дози с трудно повлияване на хормоналните нива. В хода на терапията на фона на 400 мг/дн. пропицил е отчетено рязко повишаване на нивото на TSH (82,0 mIU/l) при персистиране на висок FT₃ – 12,58 pmol/l (н. 1,82-4,62 pmol/l), нормален FT₄ – 10,05 ng/l (н. 8,5-17 ng/l) и данни за нарастване на обема на струмата. Към терапията е добавен левотироксин 50 µg/дн. и пациентката е насочена към Клиника по ендокринология за оценка и лечение. Не съобщава за фамилна обремененост за заболявания на щитовидна жлеза. По време на стационарното наблюдение е установена високостепенна струма с наличие на компресивна симптоматика и дискретни клинични данни за тиреотоксикоза. УЗ изследване на шийна област обективизира щитовидна жлеза с увеличени размери: десен лоб – 30/33/60 мм; ляв лоб – 31/37/61 мм; хипоехогенна 2 ст. ехоструктура и изразена нехомогенност на паренхимата, леко усилена васкуларизация. В долна трета на десен лоб се открива солидна хиперехогенна окръглена формация с резки очертания, хипоехогенно хало и размери 12/12 мм, в долна трета на ляв лоб се открива формация с подобна ехоструктура и размери – 14/12мм. От хормоналните и имунологични анализи се установява TSH – 50,10 mIU/l (н. 0,49-4,67 mIU/l); FT₄ – 8,48 ng/l (9,14-23,80 ng/l); FT₃ – 7,89 pmol/l (2,23-5,35 pmol/l); TAT – 22,0 IU/ml (н. 0,0-34,0 IU/ml); ТРОАб – 328,6 IU/ml (н. 0-12 IU/ml) и TRAb – 2,2 U/l (н. 0-1,5 U/l).

Дадена е препоръка за радикално оперативно лечение след достигане на клинично еутиреоидно състояние и през м. юни 2009 г. е извършена тиреоидектомия с траен хистологичен резултат (ляв и десен лоб на щитовидна жлеза) базедовифицирана струма. Следоперативно е иницирано заместително лечение с левотироксин. Поради персистиране на силно завишени стойности на TSH дозата на хормоналния препарат постепенно е увеличена до 300 µg/дн. В следващите две години пациентката е приемала между 200 и 300 µg/дн. левотироксин според актуалните нива на TSH, като при контролните прегледи липсват данни за клинично проявена тиреоидна дисфункция (Табл. 1).

Таблица 1. Стойности на TSH и доза на заместителното лечение в следоперативния период

Дата	TSH (н. 0,27-4,2 mIU/l)	Препоръчвана доза левотироксин (µg)
07.2009 г.	> 100	100
09.2009 г.	95,41	150
11.2009 г.	76,53	200
12.2009 г.	40,87	250
03.2010 г.	20,33	250 / 300 през ден
05.2010 г.	12,09	250 / 300 през ден
07.2010 г.	3,85	250 / 300 през ден
10.2010 г.	8,39	250 / 300 през ден

остатък от десен лоб с размери 8/8/14 мм, с хипоехогенна структура и неправилна форма. В ложето на ляв лоб липсва тиреоидна тъкан. Липват възлести формации и увеличени шийни лимфни възли.

MPT на хипоталамо-хипофизарна област: Нормална MPT на ходка за мозъчния паренхим супра- и субтенториално. Свободни субарахноидни пространства и базални цистерни. Свободна супраселарна цистерна. Хипофизната жлеза е нормално разположена, следвайки огънатата костна села. От сагиталните образи размерите венетро-дорзално/кранио-каудално са 11/5 мм. Централно разположен инфундибулум с дискретна девиация наясно. Известна хетероинтензност на паренхимата без оформяне на интрасубстанциална лезия. След контрастното усилване обаче средно под инфундибулума се отдиференцира хипоинтензен фокус около 4/2 мм. Симетрични пп. optici и tr.n.optici. Двустранно кавернозните синуси са с нормално

Във връзка с трайно влошения хормонален баланс е препоръчана нова оценка в специализирана Клиника по ендокринология. Пациентката е хоспитализирана в Клиника по Ендокринология и болести на обмяната при УМБАЛ „Св. Георги“, Пловдив на 23. 11.2010. При приемането пациентката не споделя за субективни оплаквания, отрича промени в телесното тегло, менструалният цикъл е редовен. При обективна оценка липсват клинични белези за тиреоидна дисфункция. На фона на лечение с левотироксин 250/300 µg/през ден се установяват следните резултати: TSH – 9,361 mIU/l (н. 0,36-5,6 mIU/l); FT₄ – 28,86 pmol/l (н. 7,86-14,4 pmol/l); FT₃ – 4,40 pmol/l (н.3,6-6,0 pmol/l); ТРОАб – 16,55 IU/ml(н. 0,0-9,0 IU/ml); ТgАб – 1,04 IU/ml (н.0,0-4,0 IU/ml). Препоръчано е дозата на левотироксина да се редуцира до 125 µg/дн.

УЗ изследване на шийна област: визуализира се тиреоиден

разположение и запазено съдържимо. Не се виждат сигнални промени в съседните костни сегменти. **Заключение:** МРТ данни за микроаденом на хипофизната жлеза. **Фиброгастроскопия:** Хроничен еритемо-ексудативен гастрит.

В периода след гехоспитализацията периодично са провеждани контролни изследвания и допълнително е коригирана дозата на заместителното лечение (Табл. 2).

Таблица 2. Хормонални показатели и доза на заместителното лечение в следоперативния период

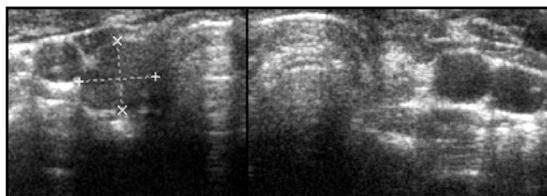
Дата	TSH	FT ₄	FT ₃	Дневна доза левотироксин
01.2011	9,361 mIU/l (н.0,34-5,60)	28,86 pmol/l (н. 7,86-14,40)	4,40 pmol/l (н. 3,60-6,00)	200 µg
06.2011	64,69 mIU/l (н. 0,34-5,50)	12,94 pmol/l (н. 7,85-14,40)	4,72 pmol/l (н. 3,60-6,00)	150 µg
12.2011	35,39 mIU/l (н.0,27-4,20)	25,44 ng/l (н. 9,30-17)		125 µg
01.2012	74,19 mIU/l (н.0,27-4,20)	19,80 ng/l (н. 9,3-17)		200 µg
04.2012	22,24 mIU/l (н. 0,27-4,20)	31,60 ng/l (н. 9,3-17)		200 / 250 µg
09.2012	73,34 mIU/l (н. 0,27-4,20)	19,4 ng/l (н. 9,3-17)		125 µg

При последната хоспитализация в Клиника по Ендокринология през м. ноември 2012 г. пациентката провежда лечение със 125 µg/гн. левотироксин. Няма съществени субективни оплаквания и промени в телесното тегло.

Обективно състояние: Жена на видима възраст, отговаряща на действителната. В добро общо състояние. Афебрилна. Нормостеничен хабитус. Ръст – 165 см. Тегло – 49 кг. ИТМ – 18 кг/м². Кожа – нормална оцветка, тургор и еластичност. Женски тип окосмяване. ПЛВ на достъпните места не се палпират. Шия – оперативен цикатрикс от разрез по Кохер. Дихателна система – симетричен гръден кош, везикуларно дишане. ССС – РСД, честота 74 уд/мин; RR 100/60 mmHg. Корем – под нивото на гръдния кош, без органомегалия. Крайници – без отоци. Пулсации на периферни артерии – неотслабени.

Лабораторни изследвания: Еритроцити – 4,64 x10¹²/l; хемоглобин – 132 g/l; хематокрит – 0,377; левкоцити – 10,58 x10⁹/l; MCV – 81,4 fL; тромбоцити – 280 x10⁹/l; СУЕ – 52 mm/h; кр. захар – 5,4 µmol/l; общ белтък 73 g/l; албумин 45 g/l; холестерол – 4,4 µmol/l; HDL-холестерол – 1,39 µmol/l; триглицериди – 0,71 µmol/l; урея – 6,0 mmol/l; креатинин – 46 µmol/l; пикочна киселина – 174 µmol/l; хлор – 97 mmol/l; калий – 4,6 µmol/l; натрий – 143 µmol/l; АсАТ – 17 IU/l; АААТ – 15 IU/l; АФ – 166 IU/l; КФК – 69 IU/l; ЛДХ – 373 IU/l; общ билирубин – 10,2 µmol/l; директен билирубин – 2,61 µmol/l; серумно желязо – 12,9 µmol/l; ТЖСК – 57,5 µmol/l; феритин – 16,3 ng/ml (н. 11-306,8 ng/ml); TSH – 79,176 mIU/l (н. 0,34-5,60 mIU/l); FT₄ – 14,03 pmol/l (н. 7,86-14,40 pmol/l);

Фигура 1. УЗ изследване на ложето на щитовидна жлеза 3 г. и 5 м. постоперативно



Въпроси:

1. Каква е вероятната диагноза въз основа на изложените данни?
2. Какви заболявания би следвало да бъдат обсъдени в диференциално-диагностичен план?
3. Какви допълнителни изследвания са необходими за изясняване на диагнозата?
4. Какъв терапевтичен подход ще предложите?

Изпратете вашия отговор до **15. 12. 2014 г.** в редакцията на сп. Ендокринология на хартиен носител – на пощенския адрес на списанието; в електронен вид – на електронната поща на Главния редактор: morbetzova@abv.bg.

FT₃ – 4,71 pmol/l (н. 3,60-6,00 pmol/l); ТРОАб – 12,84 IU/ml (н. 0,00-9,00 IU/ml); ТgАб – 0,54 IU/ml (н. 0,00-4,00 IU/ml); SHBG – 45,8 pmol/l (н.17-130 pmol/l); пролактин – 268,78 mIU/l.

УЗ изследване на шийна област: Състояние след тиреоидна резекция. Наличие на остатък от десен лоб с размери 9/10/20 мм и хипоехогенна нехомогенна ехоструктура. Данни за нарастване размера на остатъка спрямо предходната ехография. Не се визуализират възлестни формации и увеличени шийни лимфни възли (Фиг. 1).

Контролна МРТ на хипоталамо-хипофизарна област (2 години след инициалната МРТ): Добре отдиференцирани адено- и неврохипофиза. Размери от сагиталната равнина 10/5 мм. От коронарната равнина вляво е леко засилен конвекситетът на жлезата като инфундибулумът е с централно разположение и лека девиация към дясно. Паренхимът на аденохипофизата е леко нееднороден от Т1 образите. След контрастната апликация се отдиференцира хиподенсен фокус срединно и парасагитално вляво, с размер около 4мм.

Заключение: Нормална МРТ на ходка за мозъчния паренхим. Микроаденом на хипофизната жлеза.

ЕМГ: Запазена проводимост по изследваните двигателни нерви на долни крайници. Леко снижена проводимост по н. суралис двустранно, повече в дясно, както и н. Медианус.

Българско дружество по ендокринология *Bulgarian Society of Endocrinology*

Списание
ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ISSN 1310-8131

Journal
ENDOCRINOLOGIA ISSN 1310-8131

Адрес на редакционната колегия:

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

Editorial Board address for correspondence:

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

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

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

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

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

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

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

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

Структурата на статиите трябва да отговаря на следните изисквания:

Титулна страница

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

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

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

Резюме

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

Основен текст

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

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

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

Title page

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

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

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

Abstract

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

Main text

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

Tables and figures

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

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

Таблицы и илюстрации

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

Книгопис

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

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

References

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

Examples

Reference to a journal article:

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

If the original cited paper is in Bulgarian:

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

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

Примери:

Статия от списание:

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

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

Глава (раздел) от книга:

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

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

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

References to a book chapter:

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

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

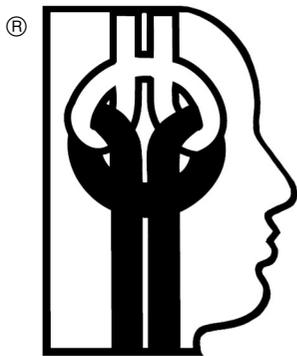
Address for sending the manuscripts and other editorial correspondence

Editorial Board Address for Correspondence:

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

Адрес на редакционната колегия:

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



ЕНДОКРИНОЛОГИЯ

ENDOCRINOLOGIA

Списание
на Българското дружество
по ендокринология
към СНМД В България

Journal
of the Bulgarian Society
of Endocrinology (BSE)

Главен редактор
Проф. д-р Мария ОРБЕЦОВА, гм

Редактор на английския текст

Д-р Александър ШИНКОВ

Отговорен редактор

Румен НИНОВ

© **Първа корица и графичен дизайн**

Румен НИНОВ

Editor-in-chief

Prof. Maria ORBETZOVA, MD, PhD

English language editor

Alexander SHINKOV, MD

Art director Rumen NINOV

© **Cover&Design** Rumen NINOV

Технически секретар

Маргарита СЛАВЧЕВА

E mail: mora4a2@abv.bg

Technical secretary

Margarita SLAVCHEVA

E mail: mora4a2@abv.bg

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

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

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

• SCOPUS Elsevier
Bibliographic Databases (since
2001)

• EMBASE
• Bulgarian Citation Index
(since 1996)

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

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