ISSN 1310-8131

ЕНДОКРИНОЛОГИЯ
ENDOCRINOLOGIA

Списанието се индексира от/The journal is indexed by:
- ***Elsevier Bibliographic Databases, (SCOPUS) Netherlands***
- ***EMBASE***
- ***Bulgarian Citation Index***

Том XX / Volume XX

Българско дружество по ендокринология

ISSN 1310-8131

Списание **ЕНДОКРИНОЛОГИЯ** *том XX, книжка 1, 2015*

Съдържание

Journal ENDOCRINOLOGIA *volume XX, number 1, 2015*

Contents

Българско дружество по ендокринология

Bulgarian Society of Endocrinology

Роля на антителата към цинков транспортер 8 (ZnT8) в диагнозата на захарен диабет тип 1

Чакърова, Невена Я., Грозева, Грета Г., Димова, Румяна Б., Танкова, Цветалина Ив.
Клиника по Диабетология, Клиничен Център по Ендокринология, Медицински Университет - София

Zinc Transporter 8 (ZnT8) Antibodies in the Diagnosis of Type 1 Diabetes

Chakarova, Nevena Y., Grozeva, Greta G., Dimova, Roumyana B., Tankova, Tsvetalina Iv.
Department of Diabetology, Clinical Center of Endocrinology, Medical University, Sofia

Резюме

Утвърдените имунологични маркери в диагнозата на захарен диабет тип 1 включват три антитела – антиинсулинови антитела (IAA), антитела към 65 kD изоформата на декарбоксилазата на глутаминовата киселина (GAD65-Ab) и антитела към тирозин-фосфатаза (IA-2-Ab). Въпреки изследването на тези антитела, част от пациентите със захарен диабет с инсулинов дефицит остават антитяло-негативни, което създава диагностични, а оттам и терапевтични проблеми. Очертава се необходимостта от нови по-надеждни и по-специфични имунологични маркери, имащи висока информативна стойност.

В последните години се разглежда ролята на нов имунологичен маркер – антитяло към цинков транспортер 8 (ZnT8), който представлява специфична за β-клетката структура и съответно автоантиген. Цинкът играе важна роля във функционирането на бета-клетката, като участва в процесите на складиране, секреция и отчасти в действието на инсулина. ZnT8 е разположен в мембраната на секреторните гранули в β-клетката и осигурява транспорта на цинковите йони от цитозола към вътрешността на везикулите. Състои се от 369 аминокиселини и се кодира от ген SLC30A8, намиращ се в 8-ма хромозома. Натрупаните до момента данни отреждат значима роля на антителата към ZnT8 в диагнозата и предикцията на захарен диабет тип 1.

Ключови думи:

цинков транспортер 8, захарен диабет тип 1, антитела, бета-клетка

Abstract

The established immunologic markers in the diagnosis of type 1 diabetes include three antibodies – insulin antibodies (IAA), glutamic acid decarboxilase 65 kD isoform antibodies (GAD65-Ab) and tyrosine phosphatase antibodies (IA-2-Ab). Despite the assessment of these antibodies, a part of the patients with insulin deficient diabetes remain antibody-negative presenting a certain diagnostic and therapeutic problem. New, more reliable, specific and highly informative immunologic markers are needed.

The role of a new immunologic marker – an antibody against zinc transporter 8 (ZnT8), which is a specific for the beta cell structure and respectively autoantigen, is being discussed over the last years. Zinc is important for the beta cell function as it takes part in the processes of storage, secretion and partly in the acion of insulin. ZnT8 is localized in the membranes of the beta cell secretory granules maintaining the zinc ion transport from the cytosol into the granules. It is formed by 369 amino acids and is encoded by the SLC30A8 gene on chromososme 8. Existing data support the role of ZnT8 antibodies in the diagnosis and prediction of type 1 diabetes.

Key words:

zinc transporter 8, type 1 diabetes, antibodies, beta-cell

Имунологични маркери при захарен диабет тип 1

Захарен диабет тип 1 се характеризира с деструкция и прогресивна загуба на β- клетъчната маса на панкреаса, водеща до абсолютен инсулинов дефицит. В преобладаващия брой случаи – около 80-85%, това се осъществява по автоимунни механизми и в клиничната практика се класифицира като автоимунен захарен диабет или захарен диабет тип 1А. В останалите около 15% липсват маркери за автоимунен процес и захарният диабет тип 1 се означава като идиопатичен или захарен диабет тип 1В (1). Участието на имунната система в патогенезата на захарен диабет тип 1 се потвърждава от хистологичните данни за лимфоцитна инфилтрация на островите на панкреаса – т. нар инсулит, наличието на антитела, насочени към островноклетъчни структури, асоциацията на заболяването с носителство на определени алели, свързани с главния комплекс на тъканната съвместимост (HLA-системата), както и съчетанието на захарен диабет тип 1 с други автоимунни заболявания в рамките на автоимунните полиендокринни синдроми (АПС) (2).

Независимо, че централна роля в автоимунната реакция към β-клетката заема Т-клетъчният имунитет, за целите на клиничната практика се използва изследването на хуморалния имунитет – доказването на антитела в серума, насочени към структури на бета-клетката, тъй като доказването на антиген-специфични Т-клетки е значително по-трудно. Антителата присъстват в серума години преди изявата на заболяването и имат доказана както диагностична, така и предиктивна стойност (2).

Диагнозата захарен диабет тип 1А се базира изцяло на изследването на антитела към структури на бета-клетката. Утвърдените имунологични маркери през последните няколко десетилетия включват 3 антитела – антиинсулинови антитела (IAA), антитела към 65 kD изоформата на декарбоксилазата на глутаминовата киселина (GAD65-Ab) и антитела към тирозин-фосфатаза (IA-2-Ab).

GAD65 антитела

GAD (glutamic acid decarboxilase) е ензим, открит от W.A. Baekkeskov и сътр. през 1990 г., с молекулно тегло 64 kD и две изоформи с голяма хомоложност – 65 kD и 67 kD. GAD не е специфичен за бета-клетката ензим, експресира се и в останалите островни клетки и в малка степен в белия дроб (3). GAD е широко представен в GABA-ергичните неврони на ц.н.с., като GAD антитела в значително по-високи титри от тези при захарен диабет тип 1 са установени при пациенти със stiff man syndrome, а напоследък се описват и при други неврологични заболявания (3-5). При захарен диабет тип 1 GAD65 антителата бележат тенденция да се повишават с възрастта, персистират с години след диагностициране на заболяването и са по-чести при HLA-DR3 позитивни пациенти (6, 7). При GAD65-Ab позитивните пациенти е установена по-висока честота и на други органоспецифични автоантитела - тиреопероксидазни, париетално-клетъчни и др. (8, 9). Установяването на положителни GAD65-Ab прави пациента по-рисков за изява на антитела срещу други органи и определя потенциалната му принадлежност към автоимунните полиендокринни синдроми.

Инсулинови антитела

Антитела срещу инсулина (IAA) се установяват при 80% от децата със захарен диабет тип 1 и тяхната честота намалява с увеличаване на възрастта и давността на заболяването. В клиничната практика се използват основно за диагноза на автоимунен захарен диабет при деца, както и в диференциалната диагноза на хипогликемиите за изключване на редките имуномедиирани хипогликемии. При пациенти със стартирано инсулиново лечение на практика са неприложими, поради наличие на антитела към екзогенния инсулин.

IA-2 антитела

IA-2 *(тирозин-фосфатаза)* представлява 105 kD трансмембранен протеин с невроендокринен произход от групата на тирозинфосфатаза-подобните белтъци. Също е неспецифичен за бета-клетката протеин, експресира се в значима степен в някои неврони и невроендокринни тъкани и в доловими нива в тимуса и слезката (3). Предполага се, че от този протеин се получават антигените IA-2a (ICA 512) и IA-2b *(фогрин)*. Антителата към последния са маркер за захарен диабет тип 1 при полиендокринен автоимунитет. Антителата към IA-2 са едни от най-важните прогностични маркери и се откриват при 58-71% от новозаболелите. Варират според възрастта – по-висока честота при по-млади лица, и генотипа – по-чести при HLA-DR4 (10).

В съвременните условия изследването на антитела представлява рутинен подход при диагностициране на пациентите с новооткрит захарен диабет. Особено ценно е изследването на антитела за диагностициране на така наречения захарен диабет тип LADA (latent autoim -mune diabetes of the adult), който представлява частен случай на захарен диабет тип 1А, изявяващ се в по-късна възраст и фенотипно наподобяващ клиничната картина на захарен диабет тип 2. От първостепенна важност и особено актуално е и изследването на маркерите за автоимунитет при децата и младите пациенти с клинична картина на захарен диабет тип 2, поради значител-

ното увеличаване на заболеваемостта от захарен диабет тип 2 в тези възрастови групи при съвременния начин на живот и необходимостта от категорично диференциране на двете основни категории захарен диабет. Изследването на антитела е основна опорна точка в клиничната практика и при диагнозата на всички фенотипно неясни случаи на захарен диабет. Въпреки изследването на имунологичните маркери – GAD65-Ab, IAA и IA-2-Ab, част от пациентите със захарен диабет с инсулинов дефицит остават антитяло-негативни, което създава диагностични, а оттам и терапевтични проблеми. Очертава се необходимостта от нови по-надеждни и по-специфични имунологични маркери, имащи висока информативна стойност.

В последните години се разглежда ролята на нов имунологичен маркер – антитяло към цинков транспортер 8 (ZnT8), който представлява специфична за β-клетката структура и съответно автоантиген (3, 11-13).

Роля на цинка в β-клетката

Бета-клетката се отличава с изключително високо съдържание на цинк (14). Цинкът играе водеща роля във функционирането на бета-клетката, като участва в процесите на складиране, секреция и отчасти в действието на инсулина (2, 14, 15). Основното количество цинк - около 70%, се съдържа в секреторните гранули, където осигурява складирането и структурната стабилност на проинсулина и инсулина под формата на хексамери. При екзоцитоза на инсулин цинкът се косекретира в екстрацелуларното пространство и цинковите йони се освобождават под въздействието на pH на кръвта, като вероятно по паракринен път упражняват ихибиращ ефект върху алфа-клетките и допринасят за преустановяване на секрецията на глюкагон и също така по автокринен механизъм допълнително потенцират глюкозостимулираната инсулинова секреция от бета-клетката (2, 14). Интерес представлява фактът, че цинкът в секреторните гранули се свързва и с островния амилоиден полипетид, като вероятно води до намаляване на отлагането на амилоидни плаки (14).

Структура и функция на цинковите транспортери

Ролята на цинковите транспортери в бета-клетката е свързана с обезпечаване на транспорта на цинковите йони между ектрацелулар–ното пространство и цитозола и между цитозола и секреторните гранули, като по този начин осигуряват цинковата хомеостаза. Съществуват две групи цинкови транспортери:

• ZnT, кодирани от гени SLC30A и включващи 10 представители, обозначавани с арабски цифри – от ZnT1 до ZnT10,

• Zip, кодирани от гени SLC39A и наброяващи 14 представители – от Zip1 до Zip14.

Структурата на ZnT включва 6 трансмембанни домейна и разположени в цитоплазмата амино- и карбокситерминални участъци. Функцията на ZnT е свързана с намаляване на цитозолния цинк посредством транспортирането му към екстрацелуларното пространство или към лумена на клетъчните органели. Структурно Zip се състоят от 8 трансмембрани домейна и екстрацелуларно разположени амино- и карбокситерминални участъци. Функцията им е обратна на тази на ZnT – те повишават цитозолната цинкова концентрация като транспортират цинка от екстрацелуларното пространство и от лумена на органелите към цитозола (2, 14, 15).

Има данни, че поне осем от цинковите транспортери от групата ZnT(SLC30A) се експресират в бета-клетката (SLC30A 1,2,4,5,6,7,8 и 9), като основно представителство и роля има ZnT8 (14).

ZnT8 е разположен в мембраната на секреторните гранули в β-клетката и осигурява транспорта на цинковите йони от цитозола към вътрешността на везикулите. Състои се от 369 аминокиселини и се кодира от ген SLC30A8, намиращ се в 8-ма хромозома (2, 14, 15).

При човека експресията на този ген е ограничена почти изцяло до ендокринния панкреас – основно в бета-клетките и в значително-по-малка степен в алфа-клетките, поради което ZnT8 се приема за специфичен за бета-клетката автоантиген.

Извън ендокринния панкреас SLC30A8 се експресира в ретината, където загубата му вероятно участва в развитието на исхемична ретинопатия. SLC30A8 мРНК е установена в човешки лимфоцити и адипоцити, без да е доказан белтъчен продукт (14).

Роля на ZnT8 и SLC30A8 при захарен диабет

В последните години нараства интересът към ZnT8 като прицелна молекула на автоимунния процес при захарен диабет тип 1 (11, 12). Интересен факт е, че ZnT8 има отношение и към развитието на захарен диабет тип 2, поради което се говори за дуалистична роля на този протеин и на неговия ген в етиологията и патогенезата на захарния диабет (16). Установено е че полиморфизъм в един нуклеотид (SNP) (rs13266634C>T, R325W) в SLC30A8 гена, водещ до промяна в позиция 325 – замяна на аргинина с триптофан (R→W), определя повишен риск от развитие на захарен диабет тип 2. Генетичната предразположеност за развитие на захарен диабет тип 2 при Кавказката раса е свързана с R325W варианта на SLC30A8 гена (15, 16). Носителите на рисковия алел R325W показват снижена базална и стимулирана инсулинова секреция и абнормен орален глюкозо-толерансен тест (15).

Освен това, именно участъкът от аминокиселини от позиция 268 до позиция 369, включващ и позиция 325, който представлява карбокситерминалния край на веригата, разположен интрацелуларно, е основният антигенен епитоп за антителата към ZnT8 при захарен диабет тип 1, с основна роля на аминокиселината на позиция 325. Смята се, че този полиморфизъм няма отношение към риска от развитие на автоимунен захарен диабет, но SLC30A8 генотипът е от ключово значение за специфичността на автоантителата към ZnT8 - ZnT8-325R и ZnT8-325W-специфични антитела, в зависимост от наличието съответно на аргинин или триптофан на 325 позиция (17, 18). Така, полиморфизмът, засягащ позиция 325 при захарен диабет тип 1, определя специфичността на антоантителата, а при захарен диабет тип 2 се асоциира с промени в бета-клетъчната маса и секреция (12).

Място на антителата към ZnT8 в диагнозата на захарен диабет тип 1 – данни от клинични проучвания

Натрупаните до момента данни отреждат значима роля на антителата към ZnT8 в диагнозата и предикцията на захарен диабет тип 1. Наблюдават се известни различия, като вероятно влияние оказват различни фактори – расова принадлежност, възраст при изява на заболяването, генетични фактори, свързани с полиморфизмите в SLC30A гена и други.

ZnT8-Ab позитивност в различни популации и при GAD65 и IA-2 негативни пациенти

Най-висока честота на положителни ZnT8-Ab е установена в кавказката популация. Wenzlau и сътр., които са откривателите на ZnT8 като автоантиген, съобщават за наличие на антитела към ZnT8 в кавказка популация с новооткрит захарен диабет тип 1 в 63% от случаите при наличие на останалите антитела както следва – IA-2 -72%, GAD65 -68% и IAA – 55%. Авторите установяват ZnT8-Ab при 26% от пациентите със захарен диабет тип 1, класифицирани като анитялонегативни на базата на изследването на антитела към GAD65, IA-2, островноклетъчни антитела и инсулинови антитела, което редуцира случаите на идиопатичен захарен диабет тип 1 с 4% Това дава основание на авторите да посочват антителата към ZnT8 като важен допълнителен и независим имунологичен маркер при захарен диабет тип 1. Колективът посочва, че изследването на ZnT8-Ab има най-голяма стойност като четвърти автоимунен маркер в допълнение към утвърдения стандарт GAD65, IA-2 и IAA, тъй като повишава диагностичната чувствителност от 94% на 98%, докато заместването на което и да е от трите утвърдени антитела с изследване на ZnT8-Ab, не променя значимо броя на диагностицираните антитялопозитивни пациенти със захарен диабет тип 1 (11).

Сходни са данните за ZnT8-Ab позитивността и при шведска популация деца и юноши със захарен диабет тип 1. Andersson и сътр. съобщават 65% честота на антитела към ZnT8, при честота на останалите антитела както следва – IA-2 - 73%, GAD65 - 56% и IAA - 33%. Позитивни само за ZnT8-Ab са 3,4% от изследваните, като в проучването са използвани специфични антитела, насочени към различните аминокиселинни варианти в позиция 325. Използването на ZnT8 повишава диагностичната чувствителност до 93% (19, 20).

ZnT8 е второто по честота антитяло след GAD65-Ab при индийци по данни на Shivaprasad и сътр. В кохорта от 88 индийци със захарен диабет тип 1 с до 4-годишна давност на заболяването, GAD, ZnT8 и IA-2 антитела се установяват съответно в 64,7%, 31,8% и 19,3% от случаите, а при новооткрит захарен диабет тип 1 честотата на ZnT8 достига 45%. ZnT8 автоантитела се установяват при 26% от GAD65 и IA-2 негативните пациенти. Колективът установява, че комбинираното използване на GAD65 и ZnT8 разпознава до 97% от антитяло-позитивните пациенти и може да замести използването на IA-2 като серологичен маркер при индийска популация, без загуба на чуствителност и специфичност (21).

Според данни на Kawasaki в японската популация с най-висока честота са антителата срещу GAD65 (~82%), следвани от антителата срещу IA-2 (~58%), антиинсулиновите антитела IAA (~55%) и антителата срещу ZnT8 (~50%). Използването на четирите антитела води до диагностициране на автоимунен захарен диабет в 94% от случаите и свежда антитялонегативните пациенти до 6% (22).

Относително по-нисък е процентът на ZnT8-Ab позитивност в китайската популация по данни на Yang и сътр. – 24,1% Честотата на ZnT8-Ab в изследваната популация е близка да тази на IA-2-Ab – 25,8% и по-ниска от тази на GAD65-Ab – 53,4% Независимо от това, допълнителното изследване на тези антитела заедно с GAD65 и IA-2 повишава значимо диагностичната чувствителност, като антитела към ZnT8 се установяват в 13,5% от пациентите негативни към IA-2 и GAD65, които биха били класифицирани като идиопатичен захарен диабет тип 1 (23).

ZnT8-Ab позитивност в различни възрастови групи и при различна давност на заболяването

Наличието и титърът на антителата към ZnT8 показват определена зависимост от възрастта и давността на заболяването, като данните от проучванията са сравнително еднозначни и посочват най-висока честота на анти-

телата в детската възраст и при пациентите с новооткрит захарен диабет.

Резултати от проспективни проучвания на Wenzlau и сътр. по отношение появата и динамиката в титъра на ZnT8-Ab показват, че те се появяват по-късно в сравнение с GAD65-Ab и IA-2-Ab, установяват се най-рано около 2-годишна възраст, нарастват значимо след 3-mата година от живота, като достигат пикова честота – около 80% в късната юношеска възраст, след което намаляват (11). Резултатите на Yang и сътр. също показват най-висока честота на антитяло-позитивност към ZnT8 при изява на заболяването във възрастовата група 0-9 години, след което честотата намалява, като статистическа значимост достига разликата между възрастовите групи 10-19 години и над 40 години (23). Howson и сътр. при изследвания върху голяма кохорта британци със захарен диабет тип 1 също потвърждават наличието на обратна зависимост между давността на заболяването и установяването на ZnT8-Ab. Те съобщават за най-висок процент позитивност при давност на заболяването под 2 години. По отношение на възрастта, обаче, за разлика от преобладаващите в литературата данни, този колектив установява по-висока честота на антитела към ZnT8 при по-голяма възраст към изява на заболяването (24).

Значими различия в наличието на антитела към ZnT8 между деца и възрастни установяват Kawasaki и сътр. За разлика от GAD65-Ab, антителата към ZnT8, както и към IA-2, показват сигнификантно по-висока честота в детската възраст – IA-2 - 78%, ZnT8 - 61%, спрямо съответно 41% и 39% при възрастната популация. При допълнителен анализ по възрастови интервали се доказва значима обратна зависимост между възрастта на изява на заболяването и наличието на антитела към ZnT8 – най-висока честота на наличие на антитела – 70% се установява във възрастовата група под 10 години, след което намалява със статистически значима разлика във всяка следваща възрастова група, достигайки до 24% за групата над 30 години. Това дава основание авторите да посочат антителата към ZnT8 и IA-2 като маркери за автоимунен диабет при деца. Независимо от това, според резултатите на колектива самостоятелната роля на антителата към ZnT8 е по-голяма в диагнозата на автоимунния захарен диабет при възрастни. При деца допълнителното изследване на антителата към ZnT8 не повишава диагностичната чувствителност в сравнение с комбинираното използване на GAD65 и IA-2 антитела, докато при възрастни води до редуциране на случаите със захарен диабет тип 1B с 3%. Авторите посочват, че тези данни би следвало да залегнат при разработване на диагностичен алгоритъм за захарен диабет тип 1 предвид възрастта на изява на заболяването (22, 25).

ZnT8-позитивност и клинична картина на захарния диабет

В редица проучвания е изследвана зависимостта между наличието на ZnT8-антитела и клиничните характеристики на захарния диабет.

Kawasaki и сътр. съобщават за връзка между клиничната картина при изява на заболяването и честотата на ZnT8-Ab позитивност, като антителата към ZnT8 се асоциират с остра изява на заболяването. Наличие на антитела към ZnT8 се установява при 50% от възрастните пациенти с остра изява на захарен диабет тип 1 спрямо 21% от пациентите с латентна изява и при нито един от пациентите с така наречената фулминантна форма на захарен диабет тип 1 (25).

Yang и сътр. също посочват някои фенотипни характеристики на ZnT8-Ab-позитивните пациенти, като установяват, че те са по-млади и с по-нисък ИТМ в сравнение с ZnT8-Ab негативните пациенти, а като клинични характеристики - пациентите позитивни само към ZnT8 са с по-високи инсулинови нужди и с по-ниско систолно артериално налягане в сравнение с антитяло-негативните пациенти със захарен диабет тип 1 (23). Huang и сътр. също намират по-високи стойности на систолното налягане при пациенти с диабет тип LADA, които са с положителни ZnT8-Ab, в сравнение с GAD65-Ab позитивните пациенти (26). Според резултатите на Lamposana и сътр. при италианска кохорта с LADA диабет, допълнителното изследване на ZnT8-Ab позволява клинично разграничаване на пациентите с автоимунен диабет. Авторите посочват, че колкото по-голям е броят на позитивните антитела и колкото по-висок е техният титър, толкова повече са фенотипните характеристики на изявен инсулинов дефицит - по-млада възраст, по-високи гликемии, по-нисък ИТМ и обиколка на талия, по-ниски нива на холестерол и триглицериди и по-висока честота на анти-тиреопероксидазни антитела (27).

ZnT8-Ab при захарен диабет тип LADA

От клинична гледна точка едно от най-ценните приложения на изследването на антитела е идентифициране на пациентите с автоимунен захарен диабет тип LADA.

Andersen и съавтори установяват значима роля на антителата към ZnT8 при пациентите с диабет тип LADA. 34,3% от тях показват наличие на антитела към ZnT8 в сравнение с 18,7% от възрастните лица с класически захарен диабет тип 1. Освен това авторите намират, че при LADA ZnT8-Ab персистират във времето, докато при групата с класически захарен диабет тип 1 при възрастни антителата се асоциират с по-кратка давност на заболяването (28).

Противоположни са резултатите от проучването HUNT в друга скандинавска популация,

които показват 6,2% позитивност за антитела към ZnT8 при пациенти с LADA диабет в сравнение с 22% от пациентите със захарен диабет тип 1, изявен след 25-годишна възраст (29).

Изследване в аржентинска популация също подкрепя приложението на антителата към ZnT8 при LADA диабет. 10,7% от случаите са показали позитивност за антитела към ZnT8, като с по-висок процент на позитивност е само изследването на GAD65 – 12,5%, в сравнение с 3,3% за IA-2, което дава основания на авторите да предложат като начален диагностичен алгоритъм при LADA диабет изследването на GAD65 и ZnT8 антитела (30).

Данни на Huang и сътр. от LADA China Study също подкрепят приложението на ZnT8-Ab в диагнозата на захарен диабет тип LADA. Те установяват честота на ZnT8-Ab при 1,99% от пациентите със захарен диабет с фенотипни характеристики на захарен диабет тип 2, която е значимо по-ниска от честотата на GAD65-Ab – 6,43%, но сравнима с тази на IA-2-Ab – 1,96% Добавянето на ZnT8-Ab в диагностичния панел повишава чувствителността за откриване на LADA от 7,58% на 8,62% (26).

Резултати на Lampasona и колектив показват 18,6% позитивност към ZnT8 при пациенти с характеристики на LADA диабет, позитивни за GAD65 и/или IA-2, като честотата е сходна с тази на IA-2 антителата. Изследването на ZnT8-Ab води до допълнително идентифициране на още 1,4% пациенти с автоимунен диабет, които са GAD65 и IA-2 негативни (27).

ZnT8 при полиендокринен автоимунитет

Съществуват макар и не толкова мащабни данни за честотата на антителата към ZnT8 при пациенти с други автоимунни заболявания.

Антитела към ZnT8 са установени при до 30% от пациентите с други антоимунни заболявания, асоциращи се със захарен диабет тип 1, по данни на Wenzlau и сътр. – при 8,6% от пациентите с Адисонова болест без изявен захарен диабет, при 13,3% от индивидите с положителни антитела към 21-хидроксилаза, но без изявена Адисонова болест и захарен диабет и при 30.8% от родствениците на пациенти със захарен диабет тип 1 и цьолиакия, които имат положителни трансглутаминазни антитела (11).

Най-честа е асоциацията на захарен диабет тип 1 с автоимунни заболявания на щитовидната жлеза, като това се наблюдава основно при пациентите с положителни GAD65-Ab (22). Jonsdottir и сътр. проследяват 2433 деца с новооткрит захарен диабет тип 1, при които изследват честотата на тиреоидни автоантитела (срещу тиреоидната пероксидаза и срещу тиреоглобулин). Авторите намират, че положителните GAD65-Ab и ZnT8-Ab, установени при диагностициране на захарен диабет тип 1, повишават риска за тиреоиден автоимунитет (31).

Предиктивна стойност на ZnT8-Ab

Освен в диагнозата на автоимунния захарен диабет, антителата към структури на бета-клетката имат и определена предиктивна стойност за развитие на заболяването. Известно е, че рискът за развитие на захарен диабет тип 1 нараства с броя на установените антитела, така че допълнителното изследване на ZnT8-Ab по презумция дава възможност за идентифициране на индивиди с по-висок риск (6). Данните от проучванията показват, че антителата към ZnT8 са важен и независим предиктивен маркер.

Резултати от проспективно проучване на Wenzlau и сътр. показват, че при проследяване на лица с едно положително антитяло (GAD65, IA-2 или IAA) и наличие на положителни ZnT8-Ab, 36,8% са развили захарен диабет за период от 5 години в сравнение със 7,3% в групата с едно положително антитяло от стандартните и без наличие на антитела към ZnT8 (11).

В проспективно проучване върху голяма кохорта първостепенни родственици на индивиди със захарен диабет тип 1, Yu и сътр. установяват, че изследването на ZnT8-Ab представлява силен и независим предиктивен маркер. Честотата на антителата към ZnT8 сред изследваните е 24,3% и е сравнима с тази на IA-2 – 26,5% при честота на GAD65-Ab 74% и IAA 33,3%. Позитивността към ZnT8 нараства значимо с нарастване броя на положителните антитела от стандартни имунологични маркери (GAD65, IA-2, IAA) – 10,5% при наличие на 1 положително антитяло и 79,4% при 3 положителни антитела. Наличието на ZnT8-Ab повишава значимо риска при лицата с наличие на 1 или 2 от стандартните антитела в сравнение с лицата с отрицателни ZnT8-Ab и 1 или 2 от останалите антитела. В групите с 1 положително стандартно антитяло 4-годишният риск при наличие на ZnT8-Ab нараства на 31% в сравнение със 7% при ZnT8-негативните. Рискът е най-висок при съчетание на ZnT8 и IA-2 антитела (32).

В България към момента има твърде ограничен опит с използването на антителата към ZnT8 в диагнозата на захарния диабет, както и по отношение на предиктивната им стойност за развитие на това и други автоимунни заболявания. На базата на изложените данни е явно, че има популационни различия, което налага натрупването на собствен опит и анализ на собствени данни, които да очертаят мястото на ZnT8 в диагнозата и предикцията на захарния диабет в нашата популация.

1. **Tankova Ts. Zacharen diabet.** Sofia: Paradigma 2013 (In Bulgarian) (Танкова Ц. Захарен диабет. София: *Парадигма*; 2013|.

2. **Kawasaki E.** ZnT8 and type 1 diabetes. *Endocrine J* 2012; 59 (7): 531-537.

3. **Wenzlau JM, Hutton JC.** Novel diabetes autoantibodies and prediction of type 1 diabetes. *Curr Diab Rep* 2013; 13(5): 608-615.

4. **Dayalu P, Teener JW.** Stiff Person syndrome and other anti-GAD-associated neurologic disorders. *Semin Neurol* 2012; 32(5): 544-549.

5. **Rakocevic, G, Floeter MK.** Autoimmune stiff person syndrome and related myelopathies: understanding of electrophysiological and immunological processes. *Muscle Nerve* 2012; 45(5): 623-634.

6. **Verge CF, Gianini R, Kawasaki E.** Number of autoantibodies (against insulin, GAD or ICA512/IA2) rather than particular autoantibody specificities determines risk of type 1 diabetes. *J Autoimmun* 1996; 9(3): 379-383.

7. **Verge CF, Ganini R, Kawasaki E, Yu L, Peietropaolo M, Jackson RA et al.** Prediction of type 1 diabetes in first degree relatives using a combination of insulin, GAD and ICA 512 /IA-2 antibodies. *Diabetes* 1996; 45(7): 926-933.

8. **Van den Driessche A, Eenkhoorn V, Van Gaal L, De Block C.** Type 1 diabetes and autoimmune polyglandular syndrome: a clinical review. *Neth J Med* 2009; 67(11): 376-387.

9. **De Block CE, De Leeuw IH, Rooman RP, Winnock F, Di Caju MV, Van Gaal LF.** Gastric parietal cell antibodies are associated with glutamic acid decarboxylase-65 antibodies and the HLA DQA1*0501- DQB1*0301 haplotype in type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2000; 17(8): 618-622.

10. **Leslie R, Atkinson MA, Notkins AL.** Autoantigens IA-2 and GAD65 in type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1999; 42(1): 3-14.

11. **Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, et al.** The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104 (43): 17040-17045.

12. **Wenzlau JM, Moua O, Sarkar SA, Yu L, Rewers M, Eisenbarth GS et al.** SlC30A8 is a major target of humoral autoimmunity in type 1 diabetes and a predictive marker in prediabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1150:256-259.

13. **Wenzlau JM, Hutton JC, Davidson HW.** New antigenic targets in type 1 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2008; 15(4): 315-320.

14. **Davidson HW, Wenzlau JM and O'Brien RM.** Zinc transporter 8 (ZnT8) and b cell function. *Trends Endocrinol Metab* 2014; 25(8): 415-425.

15. **Huang L.** The Pancreatic Bata cell. Chapter Fourteen - Zinc and its transporters, pancreatic b-cells, and insulin metabolism. *Vitam Horm* 2014; 95: 365-390.

16. **Chistiakov DA, Voronova NV.** Zn(2+)-transporter-8: a dual role in diabetes. *Biofactors* 2009; 35(4): 356-363.

17. **Wenzlau JM, Liu Y, Yu L, Moua O, Fowler KT, Rangasamy S, et al.** A common non-synonymous single nucleotide polymorphism in the SLC30A8 gene determines ZnT8 autoantibody specificity in type 1 diabetes. *Diabetes* 2008; 57(10): 2693-2697.

18. **Kawasaki E, Uga M, Nakamura K, Kuriya G, Satoh T, Fujishima K, et al.** Association between anti-ZnT8 autoantibody specificities and SLC30A8 Arg325Trp variant in Japanese patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* 2008; 51(12): 2299-2302.

19. **Andersson C, Larsson K, Vaziri-Sani F, Lynch K, Carlsson A, Cedervall E, et al.** The three ZNT8 autoantibody variants together improve the diagnostic sensitivity of childhood and adolescent type 1 diabetes. *Autoimmunity* 2011; 44(5): 394-405.

20. **Andersson C, Vaziri-Sani F, Delli A, Lindblad B, Carlsson A, Forsander G, BDD Study Group et coll.** Triple specificity of ZnT8 autoantibodies in relation to HLA and other islet autoantibodies in childhood and adolescent type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 2013; 14(2): 97-105.

21. **Shivaprasad C, Mittal R, Dharmalingam M, Kumar PK.** Zinc transporter-8 autoantibodies can replace IA-2 autoantibodies as a serological marker for juvenile onset type 1 diabetes in India. Indian *J Endocrinol Metab* 2014; 18: 345-349.

22. **Kawasaki E.** Type 1 diabetes and autoimmunity. *Clin Pediatr Endocrinol* 2014; 23(4): 99-105.

23. **Yang L, Luo S, Huang G, Peng J, Li X, Yan X, et al.** The diagnostic value of zinc transporter 8 autoantibody (ZnT8A) for type 1 diabetes in Chinese. *Diabetes Metab Res Rev* 2010; 26(7): 579-584.

24. **Howson JM, Krause S, Stevens H, Smyth DJ, Wenzlau JM, Bonifacio E, et al.** Genetic association of zinc transporter 8 (ZnT8) autoantibodies in type 1 diabetes cases. *Diabetologia* 2012; 55(7): 1978-1984.

25. **Kawasaki E, Nakamura K, Kuriya G, Satoh T, Kobayashi M, Kuwahara H, et al.** Differences in the humoral autoreactivity to zinc transporter 8 between childhood- and adult-onset type 1 diabetes in Japanese patients. *Clin Immunol* 2011; 138(2): 146-153.

26. **Huang G, Xiang Y, Pan L, Li X, Luo S, Zhou Z.** Zinc transporter 8 autoantibody (ZnT8A) could help differentiate latent autoimmune diabetes in adults (LADA) from phenotypic type 2 diabetes mellitus *Diabetes Metab Res Rev* 2013; 29(5): 363-368.

27. **Lampasona V, Petrone A, Tiberti C, Capizzi M, Spoletini M, di Pietro S, et al.** Zinc transporter 8 antibodies complement GAD and IA-2 antibodies in the identification and characterization of adult-onset autoimmune diabetes: Non Insulin Requiring Autoim - mune Diabetes (NIRAD) 4. *Diabetes Care* 2010; 33(1): 104-108.

28. **Andersen MK, Harkonen T, Forsblom C, Groop PH, Knip M, Tuomi T.** Zinc transporter type 8 autoantibodies (ZnT8A): prevalence and phenotypic associations in latent autoimmune diabetes patients and patients with adult onset type 1 diabetes. *Autoimmunity* 2013; 46(4): 251-258.

29. **Sorgjerd EP, Skorpen F, Kvaloy K, Midthjell K, Grill V.** Prevalence of ZnT8 antibody in relation to phenotype and SLC30A8 polymorphism in adult autoimmune diabetes: results from the HUNT study, Norway. *Autoimmunity* 2013; 46(1): 74-79.

30. **Trabucchi A, Faccinetti NI, Guerra LL, Puchulu FM, Frechtel GD, Poskus E, Valdez SN.** Detection and characterization of ZnT8 autoantibodies could help to screen latent autoimmune diabetes in adult-onset patients with type 2 phenotype. *Autoimmunity* 2012; 45(2): 137-142.

31. **Jonsdottir B, Andersson C, Carlsson A, Delli A, Forsander G, Ludvigsson J, et al.** Thyroid autoimmunity in relation to islet autoantibodies and HLA-DQ genotype in newly diagnosed type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetologia* 2013; 56(8): 1735-1742.

32. **Yu L, Boulware DC, Beam CA, Hutton JC, Wenzlau JM, Greenbaum CJ, et al.** Zinc transporter-8 autoantibodies improve prediction of type 1 diabetes in relatives positive for the standard biochemical autoantibodies. *Diabetes Care* 2012; 35(6): 1213-1218.

Address for correspondence:

Д-р Невена Чакърова, дм

Клиничен Център по Ендокринология,
Медицински Университет, София
1431 София, ул.Здраве №2
e-mail: veni_chakarova@abv.bg

Nevena Chakarova, MD, PhD

Clinical Center of Endocrinology,
Medical University, Sofia
2 Zdrave Str., 1431 Sofia, Bulgaria
e-mail: veni_chakarova@abv.bg

Неалкохолна чернодробна стеатозна болест при захарен диабет тип 2 и метаболитен синдром: роля на нискостепенното системно възпаление

Никитов, Захари С., Геренова, Жулиета Б.
МБАЛ „Проф. Д-р Стоян Киркович“, Клиника по Ендокринология, Медицински факултет, Катедра Пропедевтика на вътрешните болести, Тракийски университет, Стара Загора

Non Alcoholic Fatty Liver Disease in Type 2 Diabetes Mellitus and Metabolic Syndrome: the Role of Low-grade Systemic Inflammation

Nikitov, Zahari S., Gerenova, Julieta B.
МНАТ „Prof. D-r Stoian Kirkovich“, Department of Endocrinology, Faculty of Medicine, Department of Propedeutic of internal diseases, Trakia University, Stara Zagora.

Резюме

Неалкохолната чернодробна стеатозна болест (НЧСБ) се установява често при пациенти с метаболитен синдром и захарен диабет тип 2 (до 90% в някои проучвания). Тъй като прогресията на това състояние до стеатохепатит и цироза може да повлияе съществено върху протичането и прогнозата при тези пациенти, факторите, водещи до това са обект на все по-нарастващ интерес. Установено е, че хроничното възпаление, което е налице при тези две заболявания, може да играе ключова роля за усложняването на чернодробната стеатоза. Причините за това системно възпаление вероятно са инсулиновата резистентност и свързаната с нея висока концентрация на свободни мастни киселини. Все повече проучвания демонстрират и ролята на чревната дизбиоза и ендотоксемията, предизвикана от навлизане в кръвообращението на фрагменти от бактериалната стена. Определянето на маркерите, демонстриращи неговото наличие и активност и тяхната роля в патогенезата на чернодробното увреждане, са важни с оглед правилно стадиране на НЧСБ и евентуално търсене начини за повлияване хода на заболяването.

Ключови думи:

неалкохолна чернодробна стеатозна болест; захарен диабет тип 2; метаболитен синдром; тумор некротизиращ фактор алфа, интерлевкин 6.

Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is often found in patients with the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus (up to 90 % in some studies). The progression of the condition to steatohepatitis and cirrhosis might significantly alter the course and the progniosis of the disease in these patients. Therefore the factors which contribute to such progression have been recently the focus of an increased interest. It has been determined that the chronic inflammatory condition that is present in both diseases may be the key for the progression and deterioration of liver steatosis. The most likely causess for this systemic inflammation are the insulin resistance and the subsequent high concentration of free fatty acids. An increasing number of studies also demonstrate the role of gut microbiota and endotoxemia caused by the intrusion of bacterial wall fragments into the blood steam. Defining the markers that demonstrate the existence and activity of systemic inflammation, and its role in the patogenesis of liver damage are crucial in view of properly predicting the development of NAFLD and of eventually seeking better ways of managing the course of the disease.

Key words:

non-alcoholic fatty liver disease; type 2 diabetes mellitus; metabolic syndrome; tumor necrosis factor alfa; interleukin-6.

Въведение

Затлъстяването и неразривно свързаните с него метаболитен синдром (МС), дислипидемия и захарен диабет тип 2 (ЗД2) са с все по-нарастваща честота в последните десетилетия и все повече добиват епидемични размери и висока социална значимост. Едно от често срещаните усложнения при тези състояния е неалкохолната чернодробна стеатозна болест (НЧСБ), чиято поява може значително да утежни протичането и прогнозата, особено при евентуална прогресия до стеатохепатит и цироза. Диагнозата НЧСБ изисква установяването на стеатоза, било чрез образните методи на изследване (ехография, КАТ или МРТ) или хистологично – чрез чернодробна биопсия при изключване на други причини за чернодробно мастно натрупване като сигнификантна консумация на алкохол, хепатит С, употреба на стеатогенни медикаменти, хемохроматоза (идиопатична и вторична) или други вродени заболявания (болест на Уилсон). Хистологично НЧСБ се разделя на 2 типа, които могат да се разглеждат и като 2 етапа в протичането на заболяването: чернодробна стеатоза и стеатохепатит. Чернодробната стеатоза се характеризира с наличие на мастно натрупване в хепатоцитите, без данни за хепатоцитно увреждане по типа на балонна дегенерация. Стеатохепатитът се характеризира с балонна дегенерация на хепатоцитите, възпалителна реакция с или без наличие на чернодробна фиброза. Основна роля за възникването на чернодробна стеатоза и нейната по-нататъшна прогресия се отдава на инсулиновата резистентност и хроничното нискостепенно системно възпаление, които са в основата на МС и ЗД2.

Диагноза на НЧСБ

Образните методи на изследване (ехография, КАТ или МРТ) обичайно са достатъчно информативни за наличие на мастно чернодробно натрупване, но те, дори в комбинация с изследване на трансаминазите, не могат да различат обикновената стеатоза от стеатохепатита. Имайки предвид, че прогнозата на двете състояния е коренно различна, ранното установяване на възпалителна реакция и фиброза, характерни за преминаването на едното състояние в другото, е от изключителна важност. Обикновената чернодробна стеатоза обичайно се приема за бенигнено състояние, докато стеатохепатитът често прогресира до чернодробна цироза и не съвсем рядко – до карцином (1,3). В едно проучване, публикувано през 2009 г. Aliya Quayyum и сътр. сравняват ехографията, КАТ и МРТ и намират, че магниторезонасното изследване е най-близко до чернодробната биопсия като диагностична стойност (4). Ехографското изследване дава добри резултати едва при по-изразени стеатозни промени, но въпреки това поради ниската цена и достъпност остава най-използваният диагностичен метод в масовата клинична практика (2). Ехографията дава известна възможност и да се оцени тежеста на стеатозата, като критерий е ехогенността на чернодробния паренхим.

Обикновено се използват 5 категории:

0 – липсва стеатоза;
1 – минимална стеатоза;
2 – лека стеатоза;
3 – умерена стеатоза и
4 – тежка стеатоза.

За оценка на ехогенността като база се използват ехогенността на кортекса на десен бъбрек, ехогенността на съдовата стена на интрапаренхимните съдове и отражението на диафрагмата (4).

И досега се приема, че златен стандарт при стадирането на НСЧБ е хистологичното изследване при черноробна биопсия, което с голяма точност показва наличието на балонна дегенерация на хепатоцитите, възпалителна реакция и наличието и степента на фиброзата (2). Повечето автори приемат, обаче, че това изследване е с малка приложимост в практиката поради високата му цена и не редките усложнения около манипулацията (5). Това налага усилено търсене на неинвазивни маркери, отчитащи наличието на стеатохепатит, тоест демонстриращи възпалението и фиброзата. Тяхното разработване е неразривно свързано с установяването на това, кои фактори са отговорни за прогресията до стеатохепатит, и по нататък до цироза, което и понастоящем не е напълно ясно (3).

При диагностициране на НСЧБ от основно значение е изключване на друга причина за мастно чернодробно натрупване. На първо място трябва да се изключи хроничната алкохолна злоупотреба. Критериите за това са твърде разтегливи при различните автори като варират от консумация на 10 до 40 г. на чист алкохол на ден. Все пак в момента е приет консенсус, който определя като сигнификантна алкохолната консумация на повече от 21 алкохолни единици на седмица за мъже и >14 за жени през последните 2 години. Една алкохолна единица е 10 г чист алкохол (25 мл концентрат или 80 мл вино) (5).

Леко повишен серумен феритин се наблюдава често при пациенти с чернодробна стеато-

за и не е сигурен белег за абнормно отлагане на желязо. Все пак, по-високите стойности на феритина и високото насищане на трансферина налагат генетичен анализ за изключване на вродена хемохроматоза. Повишените титри на автоантителата в серума насочват към автоимунно чернодробно заболяване, но трябва да се има в предвид, че в 21% от случаите на ясно дефинирана НЧСБ се установяват високи титри на антинуклеарни антитела (ANA) и антигладкомускулни антитела (ASMA). Медикаменти, които водят до мастно чернодробно натрупване са Methotrexat, Tamoxifen, Amiodaron, системни кортикостероиди и др. Други причини за чернодробно увреждане са парентерално хранене, гладуване и липодистрофия (1,5).

Честота

Редица автори разглеждат НЧСБ като чернодробна проява на МС (1). В подкрепа на този поглед върху заболяването са и данните за неговата честота. Докато в общата популация се установява честота на НЧСБ между 6,3% и 33% с медиана 20%, то при пациенти с високостепенно затлъстяване и МС тази честота може да достигне до 90%. Едно проучване с ултразвук установява честота на чернодробна стеатоза при пациенти със ЗД2 от 69%, а при друго подобно проучване 127 от 204 диабетици са със ехографски данни за чернодробна стеатоза, потвърдена хистологично при 85% от случаите. В проучване публикувано през 2014 г. в JCEM Sanchez и сътр. установяват честота на чернодробна стеатоза и стеатохепатит съответно в 76% и 56% сред пациенти със ЗД2 и нормални аминотрансферази. Мъжкият пол също е рисков фактор за НЧСБ. Обширно проучване, обхващащо 26527 души показва честота 16% при жените спрямо 31% при мъжете (2,5-7).

Патогенеза на НЧСБ

Инсулиновата резистентност (ИР) е основният патогенетичен механизъм при МС и ЗД2 (1). При това състояние мастната тъкан е резистентна на антилиполитичното инсулиново действие, което води до усилена липолиза и повишаване на нивото на свободните мастни киселини (СМК). От друга страна са налице високи инсулинови нива, което в условията на повишен прием на мазнини и усилена липолиза води до натрупване на триглицериди в чернодробните клетки. В състояние на ИР усилената липолиза (основно във висцералната мастна тъкан) води до засилен инфлукс на СМК и глицерол в черния дроб. Те се очистват чрез усилена синтеза на триглицериди и глюконеогенеза (глицерол като субстрат за глюконеогенеза, СМК като източник на АТФ чрез бета-окисление). Степента на ИР в мастната тъкан се определя от т. нар AdipoIR индекс. Стойността му се изчислява по формула, която включва нивото на СМК и имунореактивния инсулин на гладно – *СМК х инсулин*. При пациенти с НЧСБ, дори и без затлъстяване, нивото на СМК и AdipoIR са повишени. Редица автори приемат, че AdipoIR може да служи като маркер за чернодробно увреждане. Докато връзката между ИР и чернодробното мастно натрупване изглежда категорично доказана, то не е съвсем ясно как и доколко висцералното и хепаталното мастно натрупване рефлектират върху метаболитните нарушения. Редица проучвания намират строга корелация между количеството на отложените мазнини в черния дроб и оментума и степента на ИР на всички нива – черен дроб, мастна тъкан и мускули. Дислипидемия (хипертриглицеридемия, хиперхолестеролемия и ниски нива на HDL холестерол) се открива в до 80% от пациентите с НЧСБ. Мастното чернодробно натрупване повлиява еквилибриума между инфлукса на СМК и тяхната оксидация, *de novo* липосинтезата и VLDL-секрецията. При пациенти с НЧСБ нивата на адипонектин са намалени въпреки повишената липолиза и концентрация на СМК, което е свързано с повишена липидна оксидация. Доказано е, че адипонектин стимулира оксидацията на МК на ниво черен дроб и мастна тъкан. Нивата на адипонектин са в отрицателна корелация с тези на триглицеридите и в положителна с тези на HDL-холестерола и размера на LDL- частиците. Това показва ролята на адипонектина в метаболизма на липопротеините. Ето защо, ниските нива на адипонектин при НЧСБ може да се разглеждат като израз на намаления капацитет за липидна оксидация и изместване на процеса на ре-естерификация на мастните киселини (8,9).

Роля на системното възпаление и маркери на възпалението

Метаболитният синдром се приема като основен рисков фактор за прогресията на чернодробната стеатоза към стеатохепатит. Това вероятно е свързано с така характерното за синдрома хронично системно възпаление (нискостепенно системно възпаление). Отдавна е известно, че мастната тъкан не е само място за натрупване на триглицериди, но че тя е изключително метаболитно активна и в нея се синтезират редица биологично активни субстанции – хормони и цитокини, наречени сумарно адипокини. Смята се, че цитокините играят важна роля

в развитието на чернодробната стеатоза и прогресията и до стеатохепатит (така наречената „two hit" хипотеза). Проинфламаторни цитокини са тумор некротизиращ фактор алфа (TNFα), интерлевкини 1 и 6 (IL 1, IL6) и интерферон. Th2 цитокините IL4 и IL10, както и адипонектинът имат противовъзпалително действие. За адипонектина е известно, че намалява инсулиновата резистентност. Освен директен ефект върху чернодробното възпаление, проинфламаторните цитокини имат и индиректен увреждащ ефект чрез засилване на инсулиновата резистентност, която е отговорна за първоначалното мастно натрупване в чернодробната клетка.

Известно е, че TNFα активира интрацелуларни сигнални молекули като Jun N-терминална киназа и инхибира капа бета киназа бета, което прави клетката резистентна към инсулиновото действие. От друга страна, клетъчните механизми свързани с инсулиновата резистентност стимулират продукцията на TNFα. Той активира чернодробната продукция на мастни киселини, увеличава синтезата на VLDL и триглицеридите. Може да индуцира както хепатоцитна апоптоза, така и пролиферация, и играе основна роля в развитието на фиброзата. Високите нива на TNFα допълнително допринасят за хепатоцитното увреждане и чрез засилване на оксидативния стрес.IL6 е мултифункционален цитокин, който регулира имунния отговор, остро-фазовата реакция и хематопоезата. Следователно, проинфламаторните цитокини TNFα и IL6 играят роля във всички етапи на възникването и прогресията на НЧСБ. Множество проучвания намират сигнификантна корелация между повишените нива на тези цитокини и наличието на НЧСБ. Освен тях изглежда, че и редица други хемокини играят роля за появата на възпалителна реакция, бележеща прогресията на стеатозата към стеатохепатит. Трансформиращият растежен фактор бета 1(TGF-b1) играе важна роля в чернодробната апоптоза, натрупването на екстрацелуларен матрикс и фиброгенезата. Някои автори установяват сигнификантно повишени нива на този цитокин при пациенти с НЧСБ (10-12).

Остава открит въпросът, каква е причината за хроничното възпалително състояние при затлъстяване. С други думи, какво стимулира адипоцитите да продуцират проинфламаторни цитокини TNFα и IL6. Изглежда, че един от възможните отговори е високото плазмено ниво на СМК при затлъстяване и прием на храна с високо съдържание на мазнини, което е и причината за мускулната и чернодробна инсулинова резистентност. Редица проучвания върху плъхове и културелни човешки адипоцити потвърждават категорично този факт, като механизмът, по който се стимулира цитокинната продукция, е активиране на пътя на нуклеарен фактор капа бета (NF-κB). NF-kB е основният регулатор на транскрипцията, отговорен за всички възпалителни процеси (11).

Затлъстяването и богатата на мазнини диета водят до сигнификантна промяна в дебелочревната микробна флора. Това от своя страна води до промяна в пермебиалитета на чревната стена и до постъпване в плазмата на ендотоксини, продуцирани от разрасналата се патологична чревна флора. В основата на тази ендотоксемия е един липополизахарид (LPS), който е съставна част от клетъчната стена на редица Gr(-) бактерии. Изглежда, че ендотоксемията е пряко свързана с натрупване на макрофаги в чернодробната тъкан и повишена продукция на проинфламаторни цитокини като TNFα, което от своя страна допринася за засилване на инсулиновата резистентност и чернодробното увреждане. Редица проучвания демонстрират, че промяната в начина на хранене и включването на пребиотици и пробиотици могат да намалят нивата на проинфламаторните цитокини, инсулиновата резистентност, както и да предотвратят прогресията на чернодробната стеатоза до стеатохепатит (9).

Неинвазивни методи за оценка и стадиране на НЧСБ.

Както бе споменато по-горе, основно предизвикателство при диагнозата на НЧСБ е определянето на тежеста и стадирането на това заболяване. Образните методи на изследване, както и класическите лабораторни показатели за чернодробно увреждане като AST, ALT и GGTP сами по себе си не винаги могат да дадат ясен отговор. Понастоящем Американската Гастроентерологична Асоциация препорчва за определяне на наличието на фиброза да се използват следните методи: NAFLD Fibrosis score, Enhanced Liver Fibrosis (ELF) panel и еластографията. NAFLD fibrosis score включва 5 показателя – възраст, кръвна захар на гладно, ИТМ, съотношение AST/ALT и албумин. Изчисляването става по определена формула, която е достъпна в онлайн вариант (http://nafldscore.com). Стойности над 0,676 имат 67% сензитивност и 97% специфичност за доказване наличието на фиброза, а стойности под 1,455 имат 90% сензитивност и 60% специфичност за отхвърлянето ѝ. Сравнително нов показател за наличие на стеатохепатит е серумното ниво на цитокератин-18 фраг-

ментът. Скорошен метаанализ на редица проучвания показва сензитивност от 78% и специфичност от 87% на този показател за наличие на стеатохепатит при НЧСБ. С много добра диагностична стойност се очертава и МР еластография (3,5).

Заключение

Изглежда, че инсулиновата резистентност, високите серумни нива на СМК и техният инфлукс в черния дроб, производството на проимфламаторни цитокини като IL6 и TNFα, намалената синтеза на адипонектин са фактори, които играят ключова роля във възникването и прогресията на НЧСБ. Те се самоиндуцират взаимно, като се получава патологичен кръг, в който се намесва и ендотоксемията, предизвикана от чревната дизбиоза в резултат от богатата на мазнини храна. Трудно е да се каже къде точно е началото на тази патологична верига, но промяната в начина на живот и хранене и редуцирането на телесното тегло е вероятно начин да се повлияе върху всички тези фактори и би могло да допринесе за прекъсване на този порочен кръг. Изглежда, че са налице и редица други възможности за повлияване на причините за развитието на това заболяване, но и те подлежат на допълнително проучване и уточняване.

References

1. **Tankova Ts.** Diabetes mellitus and Non-alcocholic fatty liver disease. Nauka endocrinologia 2012 (2):47 - 51 (Танкова Цв. Захарен диабет и неалкохолна стеатозна болест. *Наука ендокринология 2012* (2): 47-51) (in Bulgarian).

2. **Bakalov D, Boyanov M, Sheinkova G, Vesenkova L, Prodanova G, Hristov V.** Non - alcocholic fatty liver disease by male patients whit type 2 diabetes mellitus. J Clin Med. 2010; 3(3):3 1-36. (Бакалов Д, Боянов М, Шеинкова Г, Везенкова Л, Проданова Г, Христов В. Неалкохолна стеатозна болест на черния дроб при мъже със захарен диабет тип 2. *J Clin Med.* 2010; 3(3):31-36) (in Bulgarian).

3. **Mateva L, Ivanova R.** Fibrosis and Non-alcocholic fatty liver disease. *Bulgarska hepatogastroenterologia* 2009; 2: 21-25. (Матева Л, Иванова Р. Фиброза при неалкохолна стеатозна болест. *Българска хепатогастроентерология* 2009; 2: 21-25) (in Bulgarian).

4. **Qayyum A, Daryl M, Chen Richard S, Westphalen B.** Evaluation of diffuse liver steatosis by ultrasound, computed tomography, and magnetic resonance imaging: which modality is best? *Clin Imaging* 2009; 33(2): 110-115.

5. **Naga Ch, Zobair Y, Joel E, Anna M, Elizabeth M. Brunt et al.** The Diagnosis and Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 2012; 55: 2005-2023.

6. **Williams CD, Stenger J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, et al.** Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged populationutilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology* 2011; 140: 124-131.

7. **Leite NC, Salles GF, Araujo AL, Villela-Nogueira CA, Cardoso CR.** Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver Int* 2009; 29: 113-119.

8. **Boden G.** Fatty Acid-induced Inflammation and Insulin Resistance in Skeletal Muscle and Liver Current Diabetes Reports 2006; 6: 177-181.

9. **Osto M, Geurts L, Everard A.** Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Landes Bioscience* 2012, *Gut Microbes* 3:4: 279-288.

10. **Subir Kumar Das, Balakrishnan V.** Role of Cytokines in the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Ind J Clin Biochem* 2011; 26(2): 202-209.

11. **Haukeland JW, Damas JK, Konopski Z, L?berg EM, Haaland T.** Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *J Hepatol* 2006; 44: 1167-1174.

12. **Tarantino G, Savastano S, Colao A.** Hepatic steatosis, low-grade chronic inflammation and hormone/growth factor/ adipokine imbalance. *World J Gastroenterol* 2010; 16(38): 4773-4783.

Address for correspondence:

Д-р Захари Никитов

Клиника по Ендокринология,
МБАЛ „Проф. Д-р Стоян Киркович“
ул. Столетов 2, Стара Загора 6000
e-mail: zahari_nikitov@yahoo.com

Zahari Nikitov MD

Clinic of Endocrinology,
MHAT „Prof. D-r Stoian Kirkovich“
Stoletov 2 Str. Stara Zagora 6000 Bulgaria
e-mail: zahari_nikitov@yahoo.com

Имунна дисфункция и захарен диабет тип 2

[1]Ганева, Силвия С., [1]Тодорова Катя Н., [2]Луканов, Цветан Хр.
[1]Клиника по Ендокринология и болести на обмяната,
[2]Медико-диагностична лаборатория по имунология, УМБАЛ „Д-р Георги Странски“ ЕАД – Плевен

Immune Dysfunction and Type 2 Diabetes Mellitus

[1]Ganeva, Silviya S., [1]Todorova, Katya N., [2]Lukanov, Tzvetan Chr.
[1]Clinic of Endocrinology and metabolic diseases
[2]Medico-diagnostic laboratory of immunology
University Multiprofile Hospital for Active Treatment „Dr. Georgy Stranski“ – Pleven

Резюме

През последните 30 години се променя стереотипната представа за патогенезата на захарния диабет тип 2 (ЗДТ2) от класическо метаболитно до мултифакторно хронично възпалително заболяване. Абдоминалното затлъстяване е не само основен фактор за развитие на инсулинова резистентност (ИР), но и причина за възникване и персистиране на нискостепенно хронично възпаление сред пациентите с метаболитен синдром (МС) и ЗДТ2. Инициацията на възпалителния процес при тези състояния се осъществява посредством активиране и дисрегулация на вродения имунитет. Повишената серумна концентрация на неестерифицирани мастни киселини и глюкоза по няколко различни механизма водят до вътреклетъчно активиране в адипоцити, макрофаги, мускулни, ендотелни и панкреасни β-клетки на основните регулатори на възпалението, които поддържат продукцията на инфламаторни цитокини. Хроничната хипергликемия, при пациенти с МС и ЗДТ2 и свързаната с нея глюкотоксичност причиняват β-клетъчен стрес и апоптоза, продукция на автоантитела и активация на Т лимфоцити, реагиращи с панкреасните β-клетъчни антигени. Затлъстяването и индексът на телесна маса са критични за развитието на панкреасната β-клетъчна апоптоза и те представляват патогенетичен „мост“, разделящ ЗД тип 1 (ЗДТ1) от ЗДТ2. Автоимунно медиирана панкреасна β-клетъчна деструкция се открива при двата типа диабет, но скоростта на развитие

Abstract

During the last 30 years the stereotype concept for Diabetes mellitus type 2 (DM type 2) has been changing – from a classic metabolic to a multifactor chronic inflammatory disease. Abdominal obesity is not only a major factor for the progression of insulin resistance (IR), but it is also responsible for the activation and persistence of low-grade chronic inflammation among the patients with metabolic syndrome (MS) and DM type 2. The initiation of low- level chronic inflammation in these conditions is accomplished by activation and dysregulation of innate immunity. The increased serum concentration of unsaturated fatty acids and glucose leads by several different mechanisms to an intracellular activation of major regulators of inflammation in adipocytes, macrophages, muscle cells, endothelial cells and pancreatic beta cells. As a result the synthesis of inflammatory cytokines is increased. The chronic hyperglycemia in the patients with DM type 2 and MS and the subsequent glucotoxity lead to β-cell stress and apoptosis, production of auto-antibodies and activation of T-lymphocytes, responding to β -cell antigens. Obesity and the body mass index are critical for the progress of pancreatic β-cell apoptosis. They both are pathogenic „bridge“ dividing Diabetes mellitus type 1 (DM type 1) from DM type 2. Autoimmune mediated β-cell destruction is found in both types of diabetes, but the progress is much more slower in DM type 2.

The different mechanisms of immune

е много по-бавна при ЗДТ2.

В настоящия обзор се дискутират различните механизми на имунния отговор при ЗДТ2, допринасящи за превключване от вроден към адаптивен имунен отговор с реакция на автоимунитет.

response in DM type 2 that contribute to switching of innate to adaptive immunity with autoimmunity reaction are discussed in the present review.

Ключови думи:

метаболитен синдром, захарен диабет тип 2, нискостепенно хронично възпаление, имунна дисфункция

Key words:

metabolic syndrome, diabetes mellitus type 2, low-grade chronic inflammation, immune dysfunction.

Въведение

През последните 30 години се променя стереотипната представа за патогенезата на захарния диабет тип 2 (ЗДТ2) от класическо метаболитно (1) до мултифакторно хронично възпалително заболяване.

Ранни проучвания доказаха, че интраабдоминалното затлъстяване се асоциира с нарушена инсулинова активност и ниско-степенно хронично възпаление. Хроничното възпаление блокира вътреклетъчното разпространение на инсулиновия сигнал, причинява инсулинова резистентност и допринася за развитие на ЗДТ2 (2). Затлъстяването и инсулиновата резистентност се съчетават с хроничен, но субклиничен възпалителен процес, който нарушава инсулиновата активност в инсулин- чувствителните тъкани и затруднява панкреасната β- клетъчна функция (3).

Възможните механизми, допринасящи за поддържане на нискостепенно хронично възпаление включват: 1) активиране на основните ключови регулатори на възпалението [JNK (c-Jun NH2-терминална киназа) и нуклеарен транкрипционен фактор kB (NFkB)], които поддържат продукцията на инфламаторни цитокини; 2) свръхпродукция на свободни кислородни радикали (оксидативен стрес) и 3) производство на сигнали за програмирана клетъчна смърт (апоптоза). В условията на стрес адипоцитите секретират молекули, които чрез хемотаксис привличат клетките на имунната система, главно моноцити, и се превръщат в макрофаги. Нормално макрофагите произвеждат и антиинфламаторни цитокини (интерлевкин-10 - IL-10), чрез които предпазват клетките и елиминират потенциално опасните токсини. Инфилтрацията с макро-фаги корелира с размера на адипоцитите. Хипертрофиралите адипоцити в интраабдоминалната мастна тъкан са специфичен таргет за имунните клетки. Взаимодействието между имунните клетки и адипоцитите стартира начален възпалителен процес (4).

Участието на моноцитни клетки, специфични хемокини и цитокини във възпалителния процес са проява на активиран вроден имунен отговор. Pikup и Crook (1997 г.) първи изказват хипотезата, че естественият имунитет, може да бъде въвлечен в патогенезата на ЗДТ2. В свои проучвания те установяват сигнификантно по-високи нива на С-реактивен протеин (CRP), интерлевкин-1 (IL-1), интерлевкин-6 (IL-6), сиалова киселина и тумор-некрозис фактор-алфа (TNF-α) при пациентите с МС и ЗДТ2. Това им дава основание да поставят на дискусия въпроса, доколко нискостепенното хронично възпаление, характерно за ЗДТ2, е резултат на активиран вроден имунен отговор (5). Седем години по-късно Crook доказва хипотезата, че инициацията на нискостепенното хронично възпаление при ЗДТ2 се осъществява посредством активиране и дисрегулация на вродения имунитет (6).

В наше пилотно проучване, обхващащо 120 пациенти с МС, с нарушен въглехидратен толеранс и със ЗДТ2, ние също установяваме сигнификантно повишени серумни нива на IL-1 и IL- 6, но без промени в нивата на hsCRP и TNF-α (7). Повишени серумни нива на IL-1β са установен и при български пациенти с хиперкортицизъм (болест и синдром на Cushing), изследвани от екип на Томова и сътр. (8).

В по-нови студии от последните години се акцентира, че в имунния отговор при пациенти със ЗДТ2, освен вродения имунитет, се включват и елементи на придобит (специфичен) имунен отговор. Активацията на адаптивния имунен отговор изисква антигенна специфичност (9).

Роля на вродения имунитет в развитието на инсулинова резистентност и дисгликемия.

Вроденият имунитет е еволюционно възникнал адаптивен механизъм, целящ да запази организма от вредното влияние на попаднали в него екзогенни субстанции, с потенциален антигенен характер (10). Чрез герминативно кодирани рецептори (модел разпознаващи рецептори – „pattern-recognition receptors" PRRs) имунната система разпознава консервативни елементи от микроорганизмите (липиди, липопротеини, протеини и нуклеинови киселини) – патоген асоциирани молекулярни модели „pathogen-associated molecular patterns" PAMPs). Разпознаването на PAMPs от PRRs води до активация на вътреклетъчни сигнални пътища и продукция на инфламаторни цитокини, хемокини или интерферони. Най-добре изучени рецептори, принадлежащи към фамилията на PRRs, са наречени toll-like receptors. При хората са разпознати 10 такива рецептора. Класифицират се на базата на типа PAMPs, който разпознават. Toll- like receptor 2 и 4 (TLR-2, TLR-4), физиологично, разпознават липополизахариди, които са основен компонент в стената на грам негативните микроорганизми. Експресират се върху клетъчната повърхност на макрофаги, епителни, ендотелни, мускулни клетки, адипоцити и хепатоцити (11).

Освен в имунната регулация TLRs участват в регламторните механизми на енергийната хомеостаза в организма (12). Това откритие дава нова насока в изследването на вродения имунитет и TLRs като патогенетични елементи на затлъстяването, инсулиновата резистентност и ЗДТ2. TLRs се експресират и върху глиални мозъчни клетки, кортикални невронии, както и върху мозъчен съдов ендотел. Интересно е, че тези невроналниTLRs са несензитивни за бактериални стимули и високо чуствителни към ендогенни молекули като протеина на термичния шок с молекулярна маса 70kD (heat shock protein 70kD). В експериментални условия е доказано, че високомастна диета в продължение на 2 до 4 седмици води до сигнификантно повишение на липополизахаридите в плазмата (13). Повишената им абсорбция се осигурява от наличната чревна флора. Така причинената от диетата метаболитна ендотоксиемия след повишен прием на масти при пациенти с МС отключва развитието на ниско-степенно възпаление. При мишки с подкожно инжектирани липополизахариди се установява затлъстяване, макрофагиална инфилтрация на мастната тъкан, стеатоза и инсулинова резистентност на чернодробната тъкан, хипер - инсулинемия и хипергликемия.

При затлъстели индивиди серумните нива на не-естерифицирани мастни киселини се повишават в резултат на екзогенния липиден внос и ендогенно чрез завишената адипоцитна липолиза. Активирането на възпалителните процеси посредством вродения имунитет се осъществява по два едновременно протичащи механизми: **TLR зависим и TLR независим** (14).

При опосредствания от **TLR** процес в макрофагите и клетките на мастната и мускулната тъкан, неврални структури, ендотелни клетки и черен дроб образуването на лиганд рецепторния коплекс (TLR2, TLR4 и дълговерижни наситени МК) инициира активирането на редица вътреклетъчни сигнали. Те са отговорни за формирането на диацилглицерол и серамиди, които от своя страна водят до повишен оксидативен стрес. Успоредно с това се активира протеинкиназа С (PKC), транскрипционен нуклеарен фактор – NFkβ и се повишава синтезата на IL-6 и TNF-α. Потиска е активирането на JNK, което води до инхибиране на фосфорилирането на инсулин рецепторен субстрат-1(IRS-1) и ИР.

При **TLR независимия** механизъм мастните киселини директно повишават вътреклетъчната продукция на свободни кислородни радикали от стимулирането на стрес кинази и инфламозоми (вътреклетъчни компоненти на вродения имунитет, мултипротеинни олигомери, съдържащи ензимите капсаза-1 и капсаза-5) и увеличават секрецията на IL-1 в циркулацията (15).

С напредване на метаболитните нарушения и ИР се наблюдава и преходна хипергликемия. При процесите на не-ензимно гликиране се образуват крайни продукти на гликирането (AGE). Активирането на RAGE (рецептор за AGE) по клетъчната повърхност стимулира проинфламаторния транскрипционен фактор NFkβ и стрес киназите с краен резултат повишено образуване на свободни кислородни радикали (16). Вторият механизъм, по който хипергликемията активира вродения имунитет е посредством вътреклетъчно метаболизиране на глюкозата по пътя на оксидативното фосфолириране, активизиране на инфламозомите и повишаване секрецията на IL-1 от макрофаги, β-клетките и ендотелните клетки (17).

Роля на бялата мастна тъкан в инициране и поддържане на нискотепенното хронично възпаление при МС и ЗД.

Бялата мастна тъкан не е инертно депо на триглицериди, а е източник на редица хормоноподобни пептиди с хетерогенен състав (18, 19). Съдържа зрели адипоцити, стромално-клетъчни

елементи като преадипоцити, фибробласти, ендотелни клетки хистиоцити и макрофаги. Преадипоцитите имат свойства да се деференцират в макрофаги (20). Поради общата си еволюция адипоцитите притежават някои характеристики на макрофагите. От друга страна при про-атеросклеротични състояния, макрофагите могат да акумулират липиди подобно на адипоцитите и да се превърнат в пенести клетки (21). Размерът на макрофагиалната инфилтрация в мастната тъкан е правопропорционална на индекса на телесна маса (ИТМ) и размера на адипоцитите. Макрофагите в мастната тъкан могат да проявяват както противовъзпалителни свойства, чрез продукция на IL-10 от макрофагите от субклас 2 (M2), така и провъзпалителни, чрез продукция на IL-1, IL-6, TNF-α от макрофагите от субклас 1 (M1) (22). При мишки с диетично провокирано затлъстяване се наблюдава промяна в съотношението между двата макрофагиални фенотипа с превалиране на провъзпалителният M1 тип (23). Адипоцити и макрофаги, изолирани от затлъстели мишки показват повишена експресия на TLR (основно TLR2, TLR4) и повишена продукция на цитокини, проинфламаторни фактори като TNF-α, IL-6 и хемокини. Триадата „адипоцит-макрофаг-TLR4“ е основната за развитието на инфламаторен процес при затлъстяване.

Роля на придобития имунитет в развитието на захарен диабет тип 2

Автоимунитетът е високо-специфичен, мултифакторен процес, свързан със загуба на имунен толеранс и хронично повишени нива на автореактивни В и Т лимфоцити. В резултат на патологични междуклетъчни сигнали в прицелните за имунния процес клетки и тъкани се достига до преждевременна клетъчна апоптоза. Клинични индикатори за активен автоимунен процес са наличието на циркулиращи авто-антитела и активирани Т лимфоцити, лимфоцитна инфилтрация на засегнатите органи и тъканна деструкция, честа асоциация с друго автоимунно заболяване и подобряване на състоянието след провеждане на имуносупресивна терапия. Стигми на автоимунен процес се откриват в множество патологични състояния, които не покриват критериите за автоимунно заболяване. Захарният диабет тип 2 е един такъв пример.

Докато установяването на макрофагиална инфилтрация в мастната тъкан доказва участието на вродения имунитет в развитието на нискостепенното хронично локално и генерализирано възпаление при затлъстяване, то *in vitro* установеното наличие на активирани Т-лимфоцити в мастната тъкан безапелационно доказва участието на придобития имунитет в процесите на инфламация при индивиди с ИР (24). Nishimura и сътрудници откриват в епидидимална мастна тъкан от затлъстели животински модели повишени нива на цитотоксични CD8+ Т-лимфоцити. CD8+Т-лимфоцитите се свързват с протеините от клас I на главния комплекс на тъканна съвместимост (ГКТС), като модулират имунния отговор. С повишаване на съдържанието на адипозна тъкан при експерименталните животни се повишава популацията на цитотоксичните CD8+Т-лимфоцити и намалява популацията на експерсиращите CD4+ (Т хелперни-Th) и Т регулаторни (Treg) лимфоцитни субпопулации. Характерно за Th лимфоцити е свойството им да въздействат върху типа на имунните реакции. Th1 субпопулацията, секретират цитокини с проинфламаторна активност и поддържат континиума на автоимунната активност. Th2 лимфоцити имат антиинфламаторна и имуносупресивна активност. Установено е, че в мастната тъкан при затлъстяване предоминира Th1 опосредстваният имунен отговор (25).

Това откритие, само по себе си, поражда още въпроси, относно началния механизъм на активация на CD8+ лимфоцитите, биологичния смисъл на превключване от Th2 към Th1 имунен отговор, намаляването на Treg лимфоцити, откриването на специфични антигени, отговорни за лимфоцитната активация и инициация на възпалителния процес. Нискостепенното хронично възпаление провокира тъканна деструкция и освобождаване на „авто-антигени“ (26). Допълнително в циркулацията се освобождават множество разградни продукти от екстрацелуларния матрикс и цитокини от клетъчната апоптоза (27). Проинфламаторните цитокини стимулират пролиферацията наавтореактивни Т лимфоцити, които имат директен цитотоксичен ефект (28).

Повишаването на плазмената глюкоза при развитие на ЗДТ2 сред пациенти с МС, активирането на инфламозомите, повишената концентрация на TLR2 и TLR4 и макрофагиалната инфилтрация в панкреаса водят до β-клетъчен стрес (3). По този начин глюкотоксичността предизвиква β-клетъчна апоптоза, която е причина за осъществяване на патологични сигнали, продукция на автоантитела и активация на Т лимфоцити, реагиращи с β-клетъчни антигени. При повишена глюкозна концентрация в експериментални условия е установена повишена експресия на β-клетъчни антигени като декарбоксилазата на глутаминовата киселина (GAD) (29). През 2001г. Wilkin (30) пръв изказва хипотезата, че затлъстяването и индексът на телесна маса са критич-

ни за развитието на β-клетъчната апоптоза и представлява патогенетичен „мост“ между ЗД тип 1 и ЗД тип 2. Според тази хипотеза автоимунно медиирана β-клетъчна деструкция се открива при двата типа ЗД, но скоростта на развитие е много по-бавна при ЗД тип 2.

Затлъстяването не е класически рисков фактор за автоимунни заболявания, но повишената продукция на IL-1β от адипоцити и имунокомпетентни клетки бързо води до повишена експресия на Fas рецептори (клетъчно повърхностен рецептор, опосредстващ програмираната клетъчна смърт) в панкреасните клетки. Същите стават по-чуствителни за Fas-медиирана NF-κB-стимулирана апоптоза, чрез свързване с Fas лиганди. Fas лиганди се експресират от множество имунни клетки, включително и активирани Т лимфоцити (31, 32). Интересно е, че концентрацията на циркулиращите нива на интерлевкин IL-1β и на неговият лиганд рецептор се повишава при ЗД тип 2 и при автоимунни заболявания. Хипергликемията усилва секрецията на проинфламаторни цитокини в панкреасните островни β клетки (IL-1β), експресията на Fas рецептори и на автоантигени, отговорни за апоптозата на инсулин продуциращите клетки.

Лимфоцитна функция и дисфункция при ЗД тип 2

Повишените левкоцитни нива се асоциират с 1,5 пъти повишен риск от развитие на ЗДТ2 (33). Не отдавна е изяснена и ролята на моноцитите и макрофагите в мастната тъкан при пациенти със ЗД тип 2 и затлъстяване (34), но все още съществуват много малко изследвания върху патогенетичната ролята на В и Т лимфоцитите и техните продукти.

В експериментални проучвания е установена и инфилтрация с В лимфоцити в мастната тъкан при обезни мишки. Полигенни модели на ЗД тип 2 с отстраняване на гена за тежката имуноглобулинова верига и предизвикан В клетъчен дефицит не развиват ЗД. По този начин се предполага дисфункция на В лимфоцитите при пациенти със ЗД тип 2. Установява се намалена продукция на анти-инфламаторен IL-10 при стимулиране на TLR 2, TLR 4 и TLR 9 в сравнение със здрави лица (35). Съответно ниската продукция на IL-10 в отговор на липополизахаридите се свързва с повишен риск от ЗД тип 2 при възрастни пациенти (36).

Процесът на имунна девиация с превключване на един вид имунен отговор към друг се определя от типа на лимфоцитната популация. Brooks-Worrell и съавтори (37) демонстрират наличието на островно-реактивни Т клетки при пациенти, фенотипно определени като ЗДТ2.

При тях се наблюдава по-тежка алтерация на β клетките и по-ниска остатъчна инсулинова секреция. Същите пациенти показват наличие на автореактивни Т лимфоцити към островно-клетъчни антигени без позитивни антитела.

Наред с автореактивни Т лимфоцити затлъстяването се свързва и с нарушено съотношение между Th1/Th2, което води до повишена секреция на про-имфламаторни адипокини, цитокини и хемокини, спомагащи за привличането на повече имунокомпетентни клетки в панкреаса и мастната тъкан при обезни пациенти със ЗДТ2 (38).

При затлъстяване е установено повишение и на друг Т-лимфоцитно-клетъчен подтип – Th17, участващ в инициацията на автоимунните състояния и възпалението (39). Повишения брой Th17 и CD8+ Т лимфоцити при ЗДТ2 и затлъстяване също са може би свързващ елемент между хроничното нискостепенно възпаление и островно-клетъчната автоимунна деструкция на панкреаса.

Т-регулаторните лимфоцити (Treg) са активни участници в осигуряването на периферен имунен толеранс. Осъществяват супресивната си роля чрез директен клетъчен контакт и продукция на IL-10. В миши модели на затлъстяване техният брой е драстично намален. Те физиологично потискат индукцията на възпалението, автоимунните реакции, инсулиновата резистентност и органните усложнения при пациенти с МС и ЗДТ2 (40). Други автори установяват повишена Т- лимфоцитна инфилтация в мастната тъкан, включително и на Treg лимфоцити при затлъстяване, но определят като все още неясна ролята им в патогенезата на ЗДТ2 (41).

Заключение

Честотата на затлъстяване и развитие на ЗДТ2 в световен мащаб придобива епидемични размери. Добре известно от исторически план е, че успешната борба с епидемиите се осъществява чрез профилактика. Хроничното възпаление при пациенти с МС е не само причина за развитието на ЗДТ2, но играе и съществена роля в появата и прогресията на диабетните усложнения. Чрез изучаване на патогенетичните механизми, залегнали в отключването и разгръщането на нискостепенно хронично възпаление и автоимунни алтерации при пациенти с МС и ЗД тип 2, в бъдеще ще бъде възможно да се превентира развитието им при затлъстяване и да се утвърдят нови имуномодулиращи стратегии за превенция и/или лечение на ЗДТ2 и свързаните с него макро-васкуларни усложнения.

References

1. **Wentworth JM, Fourlanos S, Harrison LC.** Reappraising the stereotypes of diabetes in the modern diabetogenic environment. *Nat Rev Endocrinol 2009;* 5: 483-489.

2. **Koleva D, Orbetzova M, Atanassova P.** Adipose tissue hormones and appetite and body weight regulators in insulin resistance. *Folia Medica* 2013; 55(1): 25-32.

3. **Donath MY, Shoelson** SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 98-107.

4. **Mraz M, Haluzik M.** The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. *J Endocrinol 2014;* 222: 113-127.

5. **Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D.** NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with Metabolic syndrome *X. Diabetologia* 1997; 40: 1286-1292.

6. **Crook M.** Type 2 diabetes mellitus: a disease of the innate immune system? An update. *Diabet Med* 2004; 21: 203-207.

7. **Ganeva S, Todorova K, Rayanova G.** The serum levels of interleukins (IL-1, IL-6), TNF-α and hsCRP in patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *X National congress of Endocrinology, abstracts, 2013 (in Bulgarian).* (Ганева С, Тодорова К, Раянова Г. Нива на серумни интерлевкини (IL-1, IL-6), TNF-α и hs CRP при пациенти с метаболитен синдром и захарен диабет тип 2. *X Национален конгрес по Ендокринология, абстракти. 2013.)*

8. **Tomova A, Kumanov PH, Robeva R, Manchev St, Konakchieva R.** Melatonon secretion and non-specific immune responses are differentially expressed in cortocotropin- dependent and cortocotropin- independent Cuching's syndrome. *Med Sci Monit* 2008; 16 (6): 327-332.

9. **Velloso LA, Eizirik DL, Cnop M.** Type 2 diabetes mellitus- an autoimmune disease. *Nat Rev Endocrinol* 2013; 9; 750-755.

10. **Jin C, Henao-Mejia J, Flavell RA.** Innate Immune Receptors: Key Regulators of Metabolic Disease Progression. *Cell Met* 2013;17:873-882.

11. **K?nner AC, Br?ning JC.** Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2011; 22: 16-23.

12. **Pimentel GD, Ganeshan K, Carvalheira JB.** Hypothalamic inflammation and the central nervous system control of energy homeostasis. *Mol Cell Endocrinol 2014*; 397(1-2):15-22.

13. **Cani P, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck A, Delzenne N.** Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes* 2008; 57 (6): 1470-1481.

14. **Takeuchi O, Akira S.** Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell 2010*; 140: 805-820.

15. **Lamkanfi M, Dixit VM.** Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2012; 28: 137-161.

16. **Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM.** Receptor for AGE (RAGE) and its ligands-cast into leading role in diabetes and the inflammatory response. *J Mol Med* 2009; 87:235-247.

17. **Boni-Schnetzler M, Boller S, Debray S, Bouzakri K, Meier DT, Prazak R, et al.** Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor I. *Endocrinology* 2009; 150: 5218-5229.

18. **Koev Dr.** Adiponectin - a new metabolic regulator in the adipocyte family. *Endocrinologia* 2004; 1: 22-31. (in Bulgarian) (Коев Др. Адипонектин - новият метаболитен регулатор в семейството на адипоцита. *Ендокринология* 2004; 1: 22-31).

19. **Milcheva B, Orbetzova M.** Adipose tissue - an endocrine organ. Endocrinologia 2004; 2: 64-73. (in Bulgarian) (Милчева Б, Орбецова М. Мастната тъкан- ендокринен орган. *Ендокринология* 2004; 2: 64-73).

20. **Curat CA, Miranville A, Sengen?s C, Diehl M, Tonus T, Busse R.** From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages. Induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* 2004; 53: 1285-1292.

21. **Wellen KE, Hotamisligil GS.** Inflammation, stress and diabetes. *J Clin Invest* 2005; 115: 1111-1119.

22. **Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard JP.** Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab* 2008; 34: 2-11.

23. **Lumeng C, Bodzin J, Saltiel A.** Obesity induces phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007; 117: 175-184.

24. **Nishamura S, Manabe I, Nagai R.** Adipose tissue inflammation in obesity and metabolic syndrome. *Discovery Med* 2009; 8: 55-60.

25. **Strissel K, DeFuria J, Shaul M, Bennett G, Greenberg A, Obin M.** T-Cell Recruitment and Th1 Polarization in Adipose Tissue During Diet-Induced Obesity in C57BL/6 Mice. *Obese* 2010; 18(10): 1875-2065.

26. **Kamradt T, Mitchison NA.** Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med* 2001; 344: 655-664.

27. **Gallucci S, Matzinger P.** Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 114-119.

28. **Lukens JR, Dixit VD, Kanneganti TD.** Inflammasome activation in obesity-related inflammatory diseases and autoimmunity. *Discov Med 2011;* 12: 65-74.

29. **Hao W, Li L, Mehta V, Lernmark A, Palmer JP.** Functional state of the β cell affects expression of both forms of glutamic acid decarboxylase. *Pancreas* 1994; 9: 558-562.

30. **Wilkin TJ.** The accelerator hypothesis: weight gain as the missing link between type 1 and type 2 diabetes. *Diabetologia* 2001; 44: 914-922.

31. **Maedler K, Spinas GA, Lehmann R, Sergeev P, Weber M, Fontana A, et al.** Glucose induces β-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes* 2001; 50: 1683-1690.

32. **Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, Moritz W, Kaiser N, Donath M.** Glucose induced α-cell production of IL-1β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest* 2002;110: 851-860.

33. **Schmidt MI, Duncan BB, Sharrett AR, Lindberg G, Savage PJ, Offenbacher S, et al.** Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities Study): a cohort study. *Lancet* 1999; 353: 1649-1652.

34. **Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou C, et al.** Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003; 112: 1821-1830.

35. **Jagannathan M, McDonnell M, Liang Y, et al.** Toll-like receptors regulate B-cell cytokine production in patients with diabetes. *Diabetologia* 2010; 53: 1461-1471.

36. **van Exel E, Gussekloo J, de Craen AJ, Fr?lich M, Bootsma-Van Der Wiel, et al**: Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes: the Leiden 85-Plus Study. *Diabetes* 2002; 51: 1088-1092.

37. **Brooks-Worrell BM, Greenbaum CJ, Palmer JP, Pihoker C.** Identification of auto antibody-negative autoimmune type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2011; 34: 168-173.

38. **Poggi M, Jager J, Paulmyer-Lacroix O, Peiretti F, Gremeaux T, et al.** The inflammatory receptor CD40 is expressed on human adipocytes: contribution to cross talk between lymphocytes and adipocytes. *Diabetologia* 2009; 52: 1152-1163.

39. **Winer S, Paltser G, Chan Y, Tsui H, Engleman E, et al.** Obesity predisposes to Th17 bias. *Eur J Immunol* 2009; 39: 2629-2635.

40. **Eller K, Kirsch A, Wolf AM, Sopper S, Tagwerker A, Stanzl U, et al.** Potential role of regulatory T cells in reversing obesity-linked insulin resistance and diabetic nephropathy. *Diabetes* 2011; 60: 2954-2962.

41. **Zeyda M, Huber J, Prager G, Stulnig TM.** Inflammation correlates with markers of T-cell subsets including regulatory T cells in adipose tissue from obese patients. *Obesity* 2011; 19: 743-748.

Address for correspondence:

Д-р Силвия Ганева

Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „ Д-р Георги Странски“ ЕАД
Гр. Плевен - 5800
ул. „Владимир Вазов“ №91
e-mail: silvia_ganeva@abv.bg

Dr. Silviya Ganeva

Clinic of Endocrinology and metabolic diseases,
„Dr. Georgy Stranski“ University Hospital
91, „Vladimir Vazov“ Str. 5800 Pleven
e-mail: silvia_ganeva@abv.bg

Серумни маркери за автоимунна тиреоидна болест при еутиреоидни жени със синдром на поликистозни яйчници

Митков, Митко Д., Няголова, Пресияна В., Орбецова, Мария М.
[1] Клиника по Ендокринология и болести на обмяната,
УМБАЛ „Св. Георги“, МУ, Пловдив

Адрес за кореспонденция

Доц. Митко Д. Митков,

Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Св. Георги“,
Ул. „Васил Априлов“ №15А, Пловдив - 4000,
e-mail: mitko_mitkov@yahoo.com

Резюме

Целта на настоящото пилотно проучване е да се направи оценка на асоциирането на автоимунна тиреоидна болест (АТБ) със синдром на поликистозни яйчници (PCOS) сред българска популация жени.

Материал и методи: Проучването обхваща 70 жени с PCOS на възраст от 16 до 39 г. (ср. възраст 25,06±0,69 г.) и BMI между 18,3 и 39,5 кг/м^2 (ср. BMI 26,50±0,83 г.) и контролна група от 22 клинично здрави жени, съответстващи по възраст (от 20 до 34 г., ср. възраст 26,78±1,7 г., P>0,05) и BMI (от 18 до 28,1 кг/м^2, ср. BMI 23,36±1,4 кг/м^2, P>0,05). При всички участнички в проучването са изследвани базални нива на кръвна захар, общ холестерол, HDL-холестерол, триглицериди, инсулин, тиреостимулиращ хормон (TSH), свободен тироксин (FT4), анти тиреопероксидазни (TPO) и анти тиреоглобулинови (Tg) антитела, лутеинизиращ хормон (LH), фоликулостимулиращ хормон (FSH), естрадиол (E2), андростендион (Andro), тестостерон (T), секс-хормон свързващ глобулин (SHBG), дехидроепиандростерон сулфат (DHEA-S), 24 часова кортизолурия, пролактин (PRL), 17-хидрокси прогестерон (17 OHP), лептин, грелин и галанин-подобен пептид (GALP). Изчислявани са BMI, LDL-холестерол, съотношение LH/FSH, свободен андрогенен индекс (FAI) и HOMA-индекс.

Резултати: Нивата на андрогените, съотношението LH/FSH, инсулина и HOMA-индекса, анти-Tg антитела, лептина и GALP са сигнификантно по-високи при жените с PCOS спрямо контролите, докато по отношение на грелина липсва значима разлика. Положителни серумни маркери за АТБ се откриват при 14 (20%) от жените с PCOS и само при 2 (9,09%) от контролната група, но разликата не достига сигнификантност (χ^2=1,39; P=0,24). Жените с PCOS и АТБ са със сигнификантно по-висока средна възраст, по-високи нива на TSH и по-ниски на T и DHEA-S, отколкото жените с PCOS без АТБ.

Заключение: Тиреоидната функция при PCOS трябва да бъде прецизно оценявана още с поставяне на диагнозата и целенасочено проследявана.

Ключови думи: PCOS, автоимунна тиреоидна болест, лептин, грелин, галанин-подобен пептид

Въведение

Синдромът на поликистозни яйчници (PCOS) и тиреоидната дисфункция са най-честите ендокринопатии сред жените в репродуктивна възраст (1).

PCOS се изявява с клинична и/или биохимична хиперандрогения, олиго/аменорея, поликистозно променени яйчници, като често се съпътства от инфертилитет, наднормено тегло и затлъстяване, нарушения във въглехитратния и липидния метаболизъм (2). Патогенезата на синдрома остава неясна, но се приема, че основните ендокринни отклонения, водещи до разнообразните му фенотипни прояви, са хиперандрогенемията и инсулиновата резистентност.

Хетерогенната изява на PCOS наложи през 1990 г. въвеждане на консенсусни критерии за по-точно поставяне на диагнозата, които периодично биваха актуализирани паралелно на задълбочаване познанията за естеството на заболяването. При всички случаи, обаче, преди да се постави диагнозата PCOS, трябва да се изключат други причини водещи до PCOS-подобен фенотип – нарушения в тиреоидната функция, нарушения в пролактиновата секреция, нарушения в надбъбречната стероидна продукция и др. До скоро се приемаше, че PCOS засяга 5-8% от жените в репродуктивна възраст, но след последните промени в диагностичните критерии се появяват съобщения за разпространение около 12-18% (3).

Тиреоидната дисфункция, и по-специално хипотиреоидизмът, могат да доведат до много от споменатите по-горе симптоми – нарушена инсулинова чувствителност, хиперлипемия, наддаване на тегло, нарушена овариална функция и т.н. По-задълбоченото изследване на връзката между овариална и тиреоидна функция започва през 90-те години на миналия век. Появяват се все повече проучвания, анализиращи тази връзка, но съобщените до този момент резултати са противоречиви и не съвсем убедителни. Автоимунната тиреоидна болест (АТБ) е най-честото автоимунно заболяване, засягащо от 4% до 21% от жените в зависимост от възрастта (4,5) и най-честата причина за хипотиреоидизъм в репродуктивна възраст. Според повечето от последните проучвания, честотата на автоимунния тиреоидит е около 3 пъти по-висока при жени с PCOS, отколкото в общата популация жени (6). За възможна автоимунна етиология, поне за част от случаите с PCOS, се споменава за първи път през 1993 г.(7). През 2007 г. Gleicher и съавт. споделят хипотеза за т. нар. функционални автоантитела, които предизвикват развитието на PCOS, посредством „хипер" стимулиране на фоликулогенезата в яйчниците, подобно на хипертиреоидизма при Базедова болест (8).

Целта на нашето проучване е да се направи оценка на асоциирането на АТБ с PCOS сред българска популация жени, тъй като разпространението и на двете заболявания варира значително в зависимост от използваните диагностични критерии, генетичните различия, етническия произход, приема на йод (9) и т.н.

Материали и методи

Проучването е пилотно и е проведено при 70 пациентки с PCOS, хоспитализирани в Клиника по Ендокринология и болести на обмяната при УМБАЛ „Св. Георги", МУ, Пловдив. Проучването е одобрено от Комисията по Медицинска Етика при МУ, Пловдив и всички участнички са декларирали писмено съгласие за участие.

Диагнозата *PCOS* е поставяна според т. нар. Ротердамски критерии – наличие на поне 2, от следните 3: клинична и/или биохимична хиперандрогения, олиго/аменорея, ехографски данни за поликистозно променени яйчници. Изследванията са извършвани в ранна фоликулинова фаза – 2-5-ти ден след спонтанно получен менструален цикъл и до 7-ми ден след прогестерон индуцирано отпадно кървене. Диагнозата автоимунен тиреоидит е поставяна при стойности на серумните маркери над горната референтна граница – за анти тиреопероксидазни (TPO) антитела >9 IU/L и анти тиреоглобулинови (Tg) антитела >4 IU/L.

Лабораторни изследвания. Кръвна захар (FPG), общ холестерол (TC), HDL-холестерол (HDL-C), триглицериди (TG) са изследвани на клинично-химичен анализатор Konelab 60i, Thermo Electron Corporation (Финландия). Имунореактивен инсулин (IRI), тиреостимулиращ хормон (TSH), свободен тироксин (FT4), анти тиреопероксидазни (TPO) и анти тиреоглобулинови (Tg) антитела, лутеинизиращ хормон (LH), фоликулостимулиращ хормон (FSH), естрадиол (E2), андростендион (Andro), тестостерон (T), секс-хормон свързващ глобулин (SHBG), дехидроепиандростерон сулфат (DHEA-S), 24 часова кортизолурия и пролактин (PRL) са определяни чрез хемилуминисцентен имунологичен анализ (ECLIA) с помощта на анализатор ACCESS, а 17-хидрокси прогестерон (17 OHP) – чрез ELISA метод. Серумните нива на лептин, грелин и галанин-подобен пептид (GALP) са отчитани по ELISA метод със следните характеристики: за лептин (Human Leptin ELISA kit, BioVendor, EU) - sensitivity – 0,156 pg/ml, intra-assay imprecision CV<7.6%, interassay imprecision CV<6,7%; за грелин (Human Ghrelin ELISA Kit, CUSABIO BIOTECH CO., Ltd., China) - обхват на анализа – 0,625-40 pg/ml, sensitivity – 0,2 pg/ml, intra-assay imprecision CV<8%, interassay imprecision CV<10%; за GALP (Human Galanin-like Peptide (GALP) ELISA Kit, CUSABIO BIOTECH CO., Ltd., China) – обхват на анализа – 0,156-10 ng/ml, sensitivity – 0,039 ng/ml, intra-assay imprecision CV<8%, interassay imprecision CV<10%.

Същите изследвания са извършени при контролна група от 22 клинично здрави жени, съответстващи по възраст и BMI на пациентките с PCOS. Допълнително са изчислявани BMI, LDL- холестерол (LDL-C), съотношение LH/FSH, свободен андрогенен индекс (FAI) и HOMA-индекс – по общоприетите формули.

На всички участнички в проучването е извършвано ехографско изследване на малък таз и на

щитовидна жлеза. Количество и процент мастна тъкан са определяни посредством професионален биоимпедансен анализатор на телесния състав (апарат Tanita BC-420).

Условие за включване в проучването е клинично и хормонално еутиреоидно състояние, липса на остри и хронични съпътстващи заболявания и прием на медикаменти, повлияващи въглехидратния и липидния метаболизъм, телесното тегло и хормоналните показатели през последните най-малко 3 месеца. Участничките в проучването са целенасочено разпитвани за прием или контакт с вещества с богато съдържание на йод. Не са включвани жени със значително отклонение в телесното тегло (BMI под 18 и над 40 кг/м^2).

Статистическата обработка е извършена със софтуерен пакет IBM SPSS Statistic 20. Резултатите са представени като средна аритметична ± стандартна грешка на средната аритметична (mean±SEM). Разпределението на променливите е проверявано с теста на Kolmogorov-Smirnov. Приет е коефициент на доверителност (CI) 95% и ниво на значимост P<0,05. Според разпределението на променливите и големината на изследваните групи са използвани параметрични или непараметрични методи за анализ, указани при описание на конкретните резултати.

Резултати:

Изследвани са 70 жени с PCOS на възраст от 16 до 39 г. (ср. възраст 25,06±0,69 г.) и BMI между 18,3 и 39,5 кг/м^2 (ср. BMI 26,50±0,83 г.) и контролна група от 22 клинично здрави жени, съответстващи по възраст (от 20 до 34 г., ср. възраст 26,78±1,7 г., P>0,05) и BMI (от 18 до 28,1 кг/м^2, ср. BMI 23,36±1,4 кг/м^2, P>0,05). Резултатите от проследяваните показатели са представени в Таблица 1.

Получените при параметричен корелационен анализ сигнификантни корелации между показателите за инсулинова резистентност, липиден метаболизъм и биохимична хиперандрогенемия са логични и съвпадат с предварителните ни очаквания. Това се отнася и за намерените сигнификантни корелации на *TSH* – отрицателна с FT4 (R= -0,319; P<0,05) и положителни с пролактина (R= 0,418; P<0,01), анти-TPO (R= 0,527; P<0,01) и анти-Tg (R= 0,438; P<0,01). Що касае характерните за PCOS хормонални показатели, се наблюдава сигнификантна отрицателна корелация на TSH с T (R= -0,252; P<0,05) и тенденция за такава с LH (R= -0,206; P=0,099) и съотношението LH/FSH (R= -0,220; P=0,081), която в тази извадка не достига значимост. *FT4* корелира положително с IRI (R=0,310; P<0,05) и HOMA (R=0,292; P<0,05) и отрицателно с SHBG (R=-0,303; P<0,05). *Анти-TPO*, освен споменатата взаимовръзка с TSH, корелират отрицателно с T (R= -0,350; P<0,05), DHEA-S (R= -0,349; P<0,05) и положително с възрастта (R=0,361; P<0,01). Корелациите на това антитяло с TC (R=0,253; P=0,074) и LDL-C (R= 0,264; P=0,067) са с тенденция към сигнификантност. *Възрастта* корелира сигннификантно и с още няколко от проследяваните показатели – положително с BMI (R= 0,260; P<0,05), TC (R= 0,487; P<0,01), LDL-C (R= 0,435; P<0,01), TG (R= 0,313; P<0,05) и отрицателно с LH (R= -0,381; P<0,01), съотношението LH/FSH (R=-0,332; P<0,01) и DHEA-S (R= -0,285; P<0,05). Трябва да се посочи, обаче, и тенденция към значимост на взаимовръзката с повечето андрогенни маркери – T (R= -0,216; P=0,079), FAI (R= -0,230; P=0,088), 17-OHP (R= -0,361; P=0,064), Andro (R= -0,292; P=0,094).

Положителни серумни маркери за АТБ се откриват при 14 (20%) от жените с PCOS и само при 2 (9,09%) от контролната група – въпреки изразената разлика, при анализ по χ^2 последната не достига сигнификантност (χ^2=1,39; P=0,24). Посредством теста на Mann-Whitney са сравнени всички проследявани параметри между жените с PCOS с и без положителни маркери за АТБ (Табл. 2). Жените с PCOS и АТБ са със сигнификантно по-висока средна възраст, по-високи нива на TSH и по-ниски на T и DHEA-S, отколкото жените с PCOS без АТБ.

В групата жени с PCOS без АТБ е извършен корелационен анализ по Pearson на всички проследявани показатели. Установява се значима отрицателна корелация на *възрастта* с LH (R= -0,512; P<0,01), съотношението LH/FSH (R=-0,517; P<0,01) и повечето хормонални показатели за хиперандрогенемия: FAI (R= -0,338; P<0,05), DHEA-S (R= -0,388; P<0,05), 17OHP (R= -0,603; P<0,01), Andro (R= -0,441; P<0,05), както и положителна с TC (R= 0,322; P<0,05). Нивата на *LH* корелират положително с T (R= 0,389; P<0,01), 17OHP (R= 0,551; P<0,01) и Andro (R= 0,401; P<0,05). TSH корелира отрицателно с LH (R= -0,313; P<0,05) и съотношението LH/FSH (R= -0,342; P<0,05) и положително с FSH (R= 0,366; P<0,05). *FT4* корелира положително само с IRI (R=0,345; P<0,05) и отрицателно със SHBG (R= -0,413; P<0,05). В групата жени с PCOS и автоимунен тиреоидит бе направен анализ с използване коефициента на рангова корелация на Spearman rho. *TSH* корелира силно сигнификантно с PRL (R= 0,817; P<0,01). *Възрастта* корелира отрицателно с нивата на анти-Tg антитела (R= -0,775; P<0,05), положително с LDL-C (R= 0,811; P<0,05) и с процента мастна тъкан (R= 0,900; P<0,05).

Таблица 1. Клинична, метаболитна, хормонална и имунологична характеристика на жените с PCOS и клинично здравите жени.

Параметри (mean ± SEM)	PCOS (n=70)	Контроли (n=22)	P
Възраст (г.)	25,06±0,69	26,78±1,7	NS
BMI (kg/m²)	26,50±0,83	23,36±1,4	NS
Мазнини (%)	33,45±6,15	32,42±1,44	NS
FPG (mmol/l)	5,15±0,11	4,76±0,16	*P=0,074*
IRI (mIU/ml)	7,23±0,52	3,66±0,37	**P=0,0003**
HOMA-индекс	1,68±0,15	0,79±0,09	**P=0,001**
TC (mmol/l)	4,71±0,11	4,31±0,21	*P=0,0837*
HDL-C (mmol/l)	1,35±0,04	1,49±0,07	*P=0,0890*
LDL-C (mmol/l)	2,89±0,09	2,93±0,23	NS
TG (mmol/l)	1,05±0,08	0,8±0,08	*P=0,0989*
TSH (mU/l)	2,46±0,25	1,73±0,11	NS
FT4 (pmol/l)	11,56±0,21	11,37±0,34	NS
TPO-AT (IU/ml)	97,04±34,20	31,84±23,62	NS
Tg-AT (IU/ml)	53,38±49,87	0,19±0,12	**P=0,0001**
LH (IU/l)	7,24±0,67	4,92±0,81	*P=0,073*
FSH (mIU/ml)	6,91±0,21	7,67±0,49	NS
LH/FSH	1,11±0,11	0,67±0,11	**P=0,035**
E2 (pmol/l)	274,94±22,47	221,75±28,33	NS
PRL (mU/l)	348,95±28,96	190,05±39,27	*P=0,058*
T (ng/ml)	0,63±0,03	0,34±0,04	**P=0,0001**
SHBG (nmol/l)	39,14±3,17	60,26±5,55	**P=0,001**
FAI	9,31±1,24	1,99±0,17	**P=0,014**
Andro (ng/ml)	4,82±0,38	2.52±0,20	**P=0,001**
17OHP (ng/ml)	1,0±0,08	0,73±0,09	*P=0,078*
DHEA-S (µg/dl)	269,30±17,7	175,5±20,35	**P=0,006**
Кортизолурия (nmol/24h)	424,25±25,12	374,2±45.06	NS
Лептин (ng/ml)	27,54±1,98	15,63±4,12	**P=0,005**
Грелин (pg/ml)	6,14±0,3	5,56±0,43	NS
GALP (ng/ml)	2,37±0,48	0,64±0,17	**P=0,048**

В проучването са изследвани и няколко допълнителни хормона, които не се включват рутинно в диагностичния процес при PCOS - GALP, лептин и грелин. Нивата на GALP са сигнификантно по-високи в групата с PCOS като цяло спрямо контролната група. При разделянето на групата с PCOS на 2 подгрупи, нивата на GALP при жените с PCOS без АТБ са четири пъти по-високи от тези при контролите, докато при тези с АТБ – около два пъти, но разликите не достигат сигнификантност. Техните стойности при отделните групи са представени в Таблици 1 и 2. За цялата група жени с PCOS получихме следните сигнификантни зависимости: за *GALP* – положителна с FAI (R= 0,291; P<0,05), отрицателна с PRL (R= -0,315; P<0,05), гранична правопропорционална с *грелин* (R= 0,250; P=0,05), T (R= 0,237; P=0,064) и с FT4 (R= 0,245; P=0,086); за *лептин* – положителна с BMI (R= 0,675; P<0,001), T (R= 0,323; P<0,01), FAI (R= 0,462; P<0,01), TG (R= 0,384; P<0,01), IRI (R= 0,571; P<0,001), HOMA (R= 0,500; P<0,001), % мастна тъкан (R= 0,474; P<0,01); отрицателна със SHBG (R= 0,488; P<0,01) и HDL-C (R= -0,309; P<0,05); за *грелин* – положителна с LH (R= 0,315; P<0,05), съотношението LH/FSH (R= 0,254; P<0,05) и гранична отрицателна с възрастта (R= -0,204; P=0,097). За групата жени с **PCOS** без **АТБ** сигнификантните зависимости са: за GALP – отрицателна с PRL (R= -0,377; P<0,05), положителна с *грелин* (R= 0,215; P<0,05); за *лептин* – положителна с BMI (R= 0,637; P<0,001), TSH (R= 0,320; P<0,05), T (R= 0,360; P<0,05), FAI (R= 0,429; P<0,01), TG (R= 0,331; P<0,05), IRI (R= 0,484; P<0,01), HOMA (R= 0,403; P<0,01), % мастна тъкан (R= 0,460; P<0,05), отрицателна със SHBG (R= -0,436; P<0,01) и гранично положителна с *грелин* (R= 0,215; P=0,075); за грелин (освен посочените) – отрицателна с възрастта (R= -0,304; P<0,05), положителна с LH (R= 0,515; P<0,01) и LH/FSH (R= 0,428; P<0,01), и гранично положителна с FAI (R= 0,284; P=0,076). В групата с **PCOS** и **АТБ**: за *GALP* – отрицателна с PRL (R= -0,828; P<0,05), TSH (R= -0,821; P<0,01), анти-TPO (R= -0,752; P<0,05), положителна с FT4 (R= 0,717; P<0,05); за *лептин* – положителна с BMI (R= 0,742; P<0,05), IRI (R= 0,902; P<0,001), HOMA (R= 0,902; P<0,001), отрицателна с SHBG (R= -0,695; P<0,05); за *грелин* – гранична положителна с FT4 (R= 0,605; P=0,084).

Обсъждане

PCOS и АТБ представляват независими рискови фактори, както за сърдечно-съдови заболявания, така и за яйчникова недостатъчност и усложнения на бременността. Двете ендокринопатии могат да се изявят с клинично сходен фенотип, което да затрудни

Таблица 2. Клинична, метаболитна, хормонална и имунологична характери-стика на жените с PCOS с и без АТБ.

Параметри (mean ± SEM)	PCOS с АТБ n - 14	PCOS без АТБ n - 56
Възраст (г.)	29,11±2,41	24,20±0,75 *
BMI (kg/m²)	28,28±3,05	26,23±0,99
Мазнини (%)	33,45±6,15	28,54±0,16
FPG (mmol/l)	5,3±0,15 †	5,22±0,14
IRI (mIU/ml)	7,97±1,53	6,99±0,61 †
HOMA-индекс	1,91±0,39	1,67±0,18 ††
TC (mmol/l)	5±0,36	4,72±0,12
HDL-C (mmol/l)	1,28±0,1	1,39±0,06
LDL-C (mmol/l)	3,24±0,24	2,87±0,11
TG (mmol/l)	1,33±0,29	1,0±0,1
TSH (mU/l)	4,76±1,47	2,15±0,15 **
FT4 (pmol/l)	11,44±0,64	11,58±0,22
TPO-AT (IU/ml)	520,8±112,8 ††	0,73±0,13 **†
Tg-AT (IU/ml)	306,3±284,4 ††	0,13±0,04 **
LH (IU/l)	4,67±0,67	7,57±0,86
FSH (mIU/ml)	7,02±0,64	6,94±0,25
LH/FSH	0,76±0,17	1,15±0,14
PRL (mU/l)	396,1±102,11	345,31±33,50 †
E2 (pmol/l)	247,5±27,22	285,98±32,95
T (ng/ml)	0,39±0,06	0,65±0,04 **††
SHBG (nmol/l)	32,81±5,16	39,99±4,13 †
FAI	6,17±2,03	10,25±1,67 ††
Andro (ng/ml)	4,12±1,05	4,75±0,46 †
17OHP (ng/ml)	1,03±0,09 †	0,93±0,09
DHEA-S (µg/dl)	146,7±24,2	280,45±21,6 **†
Кортизолурия (nmol/24h)	414,8±79,4	423,3±33,4
Лептин (ng/ml)	32,66±5,58 †	27,14±2,62
Грелин (pg/ml)	6,7±0,89	6,25±0,39
GALP (ng/ml)	1,51±1,07	2,57±0,63

* P<0,05;
** P<0,01 – сигнификантност на разликите между двете групи жени с PCOS;
† P<0,05;
†† P<0,01 – сигнификантност на разликите спрямо контролната група (вж. Табл. 1).

навременното поставяне на точна диагноза. Това е особено важно за автоимунния тиреоидит, за който отдавна е известно, че може да протича олигосимптомно, дори безсимптомно в продължение на години и да се установи едва когато доведе до явен хипотиреоидизъм (10). Натрупват се все повече доказателства за асоцииране на АТБ с инфертилитет и неблагоприятни последствия за бременността, вкл. повтарящи се аборти и преждевременно раждане (11). Това са само част от причините, специалистите от различни области на медицината да насочват пациентките все по-често за изследване на серумните маркери за АТБ. Нашето проучване показва, че честотата на АТБ сред жените с PCOS е над два пъти по-висока от тази при контролите, но остава относително ниска в сравнение с повечето други проучвания с подобен дизайн от различни краища на света (12, 13). Получените разлики могат да бъдат обяснени не само с регионална и етническа специфичност на изследваната група, но и с факта, че се касае за целенасочено хоспитализирани пациентки, които са преминали първично медицинско изследване. Освен това в проучването не са включвани жени, при които диагнозата АТБ е поставена само по ехографски критерии, без положителен титър на тиреоидните антитела. При сравняване резултатите на двете групи жени с PCOS и наличие и липса на автоимунен тиреоидит с контролната група се оформят два различни фенотипа. Съдейки по получените синификантни зависимости, се оформят и различни тенденции за развитие на заболяването при двете групи.

1

При жените с ***PCOS*** и ***АТБ*** доминират метаболитните нарушения, които са свързани основно с инсулиновата резистентност. Ако високите нива на серумните маркери персистират те биха довели до увреждане на щитовидната функция и покачване на TSH. В този случай, ще се усили покачването на LDL-C и количеството мастна тъкан. В тази група най-силно се изявява положителната зависимост на TSH с PRL, докато по отношение на андрогенните нива, зависимостите са обратни. Трябва да се има предвид, че хиперпролактинемията не рядко се изявява с PCOS-подобен фенотип, което може да утежни клиничната картина и да доведе до диагностични, респективно терапевтични затруднения.

2 В групата с ***PCOS*** без ***АТБ*** преобладава хиперандрогенемията, която се очаква да прогресира, докато метаболитните отклонения са дискретни. Трябва да се обърне особено внимание на диетичния режим, защото и тук е налице изразена инсулинова резистентност, дори при липса на свръхтегло, която може да се задълбочи при напълняване.

Лептинът се отделя в малки количества от редица тъкани: стомашен епител, плацента, мускулна тъкан, ЦНС, но се счита, че основната му продукция и секреция е от мастната тъкан (14). Натрупват се доказателства, че лептинът е важен не само за регулацията на енергийния баланс и приема на храна, но и че изпълнява роля на метаболитен и невроендокринен хормон. Той участва в глюкозния метаболизъм, взаимодейства с оста хипоталамус-хипофиза-надбъбрек, щитовидната жлеза и растежния хормон, намесва се дори в хемопоезата и имунната система, в репродуктивните процеси (15). Нивата на лептина са в строго взаимодействие с показателите на инсулинова резистентност, установено от редица автори, както и в по-ранни наши проучвания (16). Според настоящото проучване стойностите му са най-високи в групата жени с PCOS и АТБ. Това може да се обясни с предположенията на някои автори за стимулиращата роля на лептина по отношение на автоимунните процеси, в случая на АТБ и покачване на TSH (17, 18).

GALP е невропептид, изолиран през 1999 г., чиито експресиращи клетки са ограничени и се откриват главно в n.arcuatus и неврохипофизата. GALP играе важна роля като междинен невроендокринен сигнал между лептина и хипоталамо-хипофизо-гонадната ос, а това действие най-вероятно е медиирано от нов рецептор (19). Инжектиране на GALP в ц.н.с. стимулира гонадотропин-рилийзинг хормон (GnRH)-медиираната секреция на LH. Тези наблюдения показват, че GALP е молекулярен сигнал, който свързва метаболизма с невроендокринната репродуктивна система и по този начин регулира репродуктивната активност като функция на енергийното състояние (20).

Нивата на GALP при жените с PCOS от нашето проучване са сигнификантно по-високи от тези при контролите, но разликите при разделянето на подгрупи спрямо наличие на АТБ не достигат сигнификантност, вероятно поради тяхната хетерогенност и относително малкия брой изследвани лица. Най-високи са в групата с PCOS без АТБ, където са и най-високите нива на LH. Изявеното взаимодействие на GALP с проследяваните показатели, говори за съпричастността на този хормон към гонадотропната секреция (повишава я), както твърдят и други автори (20, 21).

Грелинът се освобождава от гастроинтестиналния тракт и циркулира в две основни форми - ацилиран и неацилиран, като неацилираният грелин е стабилната форма и е в по-голямо количество. Чрез ацилиране хормонът осъществява ендокринната си функция - стимулиране на секрецията на растежен хормон, индуциране приема на храна, натрупване на мастна тъкан и регулация на енергийната хомеостаза, а също и участие в репродуктивната функция (22). Всички натрупани до момента данни илюстрират комплексен начин на действие на грелина върху хипоталамо-хипофизо-гонадната ос с предоминантен инхибиторен ефект спрямо централните (хипоталамични) нива и GnRH-индуцираната гонадотропинова секреция и директно стимулиращо действие върху базалния LH и FSH синтез (23). Поради липсата на значима разлика в нивата на грелин между отделните PCOS подгрупи и контролната група в нашето проучване, и същевременно намерените корелации с някои хормони, включително лептин и GALP, считаме, че той има известно участие в регулацията на гонадотропната и андрогенната секреция и може да има отношение към тиреоидната функция, което подлежи на целенасочено изясняване.

В заключение, нашите резултати показват една възходяща спирала на взаимодействие между *възраст, TSH* и *анти-TPO*. Тези фактори взаимно си влияят и посредством взаимодействие и с други хормони засилват симптоматиката на основното заболяване, като се явяват предпоставка за по-ранно развитие на хронични усложнения във времето. Въпреки, че става дума за еутироидни жени, тиреоидната функция при PCOS трябва да бъде прецизно оценявана и проследявана. А тъй като АТБ е най-честата причина за хипотиреоидизъм, то изследванията в насока тиреоидна патология трябва да започнат още с поставянето на диагнозата PCOS.

Serum Markers ofF Autoimmune Thyroiditis in Euthyroid Women with Polycystic Ovary Syndrome

MItkov, Mitko D., Nyagolova, Presiyana V., Orbetzova, Maria M.
[1] Clinic of Endocrinology and metabolic diseases
„Sv. Georgy" University Hospital, Medical University, Plovdiv

Address for correspondence:
Assoc. prof. Mitko D. Mitkov
Clinic of Endocrinology and metabolic diseases, „Sv. Georgy" University Hospital,
15A „Vassil Aprilov" Blvd., 4002 Plovdiv
e-mail: mitko_mitkov@yahoo.com

Abstract

The aim of this pilot study was to evaluate the association of autoimmune thyroid disease (AITD) with polycystic ovary syndrome (PCOS) in a sample population of Bulgarian women.

Material and methods: The study comprised of 70 women with PCOS aged from 16 to 39 years (mean age 25,06 ± 0,69 years) and BMI between 18,3 and 39,5 kg/m^2 (mean BMI 26,50±0,83 kg/m^2) and a control group consisting of 22, age and BMI matched, clinically healthy women (aged from 20 to 34 years, mean age 26,78±1,7 years, P>0,05; with BMI from 18 to 28,1 kg/m^2, mean BMI 23,36±1,4 kg/m^2, P>0,05). All the women taking part in the study were tested for basal levels of glucose, total cholesterol (TC), HDL-cholesterol (HDL-C), triglycerides (TG), insulin (IRI), thyroid stimulating hormone (TSH), free thyroxine (FT4), antibodies against thyroperoxidase (TPO) and thyroglobulin (Tg), luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH), estradiol (E2), androstenedione (Andro), testosterone (T), sex hormone binding globulin (SHBG), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S), 24-hour urinary cortisol, prolactin (PRL), 17-hydroxy progesterone (17 OHP), leptin, ghrelin, and galanin-like peptide (GALP). BMI, LDL-cholesterol ratio LH/FSH, free androgen index (FAI) and HOMA-index were additionally calculated.

Results: Androgen levels, LH/FSH ratio, IRI, HOMA-index, TgAb, leptin and GALP were significantly higher in women with PCOS compared to controls, while in terms of ghrelin there was no significant difference. Positive serum markers for the AITD were detected in 14 (20%) women with PCOS and only in 2 (9,09%) women in the control group, but the difference did not reach significance (χ^2=1,39; P=0,24). Women with PCOS and AITD had a significantly higher mean age, higher TSH levels and lower T and DHEA-S ones, than women with PCOS without AITD.

Conclusion: Thyroid function in women with PCOS should be evaluated more accurately at the time of diagnosis and should be carefully followed-up.

Key words: PCOS, Autoimmune Thyroid Disease, Leptin, Ghrelin, Galanin-like peptide

Introduction

Polycystic ovary syndrome (PCOS) and thyroid dysfunction are the most common endocrinopathies among women of reproductive age (1). PCOS is manifested by clinical and/or biochemical hyperandrogenism, oligo/amenorrhea, polycystic ovaries on ultrasound examination, and is often accompanied by infertility, overweight and obesity, disturbances in lipid and carbohydrate metabolism (2). The pathogenesis of the syndrome remains unclear, but it is assumed that the main endocrine abnormalities leading to its various phenotype manifestations are hyperandrogenism and insulin resistance. Because of the heterogeneous expression of PCOS, consensus criteria for more accurate diagnosis have been discussed since 1990, and have been updated periodically in parallel with increasing knowledge of the nature of this syndrome. In all cases, however, before establishing the diagnosis PCOS other causes leading to PCOS-like phenotype must be excluded – disturbances in thyroid function, prolactin oversecretion, impaired adrenal steroid production, etc. Recently it was assumed that PCOS affects 5-8% of women of reproductive age, but after changes in the diagnostic criteria the rate appears to be about 12-18% (3).

Thyroid dysfunction and, in particular, hypothyroidism, can lead to many of the above mentioned symptoms - impaired insulin sensitivity, hyperglycemia,

weight gain, impaired ovarian function, etc. In-depth investigation of the interrelationship between ovarian and thyroid function began in the 1990s. There are an increasing number of studies analyzing this,but so far the reported results are contradictory and unconvincing. Autoimmune thyroid disease (AITD) is the most common autoimmune disease affecting between 4% and 21% of women depending on age (4, 5) In addition, it is the most common cause of hypothyroidism in women of reproductive age. According to the most recent studies, the incidence of autoimmune thyroiditis is about 3 times higher in women with PCOS, than in the general population (6). A possible autoimmune etiology, at least in some PCOS cases, is first mentioned in 1993 (7). In 2007 Gleicher et al. shared the hypothesis of the so-called functional autoantibodies that caused PCOS development, by „hyper" stimulated ovary folliculogenesis, similar to hyperthyroidism in Graves' disease (8).

The ***aim*** of our study was to evaluate the association between AITD and PCOS in a sample population of Bulgarian women, as the frequency of both diseases varies greatly depending on the diagnostic criteria used, genetic differences, ethnic origin, iodine intake (9), etc.

Materials and methods

This was a pilot study and was conducted on 70 patients with PCOS, hospitalized in the Clinic of Endocrinology and metabolic diseases at the „Sv. Georgy" University Hospital. The study was approved by the Committee of Medical Ethics of the Medical University, Plovdiv and all participants declared their written informed consent. The diagnosis of PCOS is made according to the so called Rotterdam criteria - presence of at least 2 of the following 3: clinical and/or biochemical hyperandrogenism, oligo/amenorrhea, ultrasonographic evidence for polycystic ovaries. All blood samples were taken in early follicular phase – 2-5th day after spontaneous menstrual cycle and up till the seventh day after progesterone-induced withdrawal bleeding. Diagnosis of autoimmune thyroiditis was based on higher titers of the serum markers – antibodies against thyroperoxidase (TPOAb) >9 IU/L and antibodies against thyroglobulin (TgAb)>4 IU/L. ***Hormonal and Biochemical Measurements and Calculations.*** Fasting glucose (FPG), total cholesterol (TC), HDL-cholesterol (HDL-C), triglycerides (TG) were tested using a clinical chemistry analyzer Konelab 60i, Thermo Electron Corporation (Finland). Immunoreactive insulin (IRI), thyroid stimulating hormone (TSH), free thyroxine (FT4), TPOAb and TgAb, luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), estradiol (E2) androstenedione (Andro), testosterone (T), sex hormone binding globulin (SHBG), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S), 24-hour urinary cortisol and prolactin (PRL) were determined by chemiluminescence immunoassay (ECLIA) using the analyzer ACCESS, and 17-hydroxy progesterone (17 OHP) was assessed with the ELISA method. Serum levels of leptin, ghrelin, and galanin-like peptide (GALP) are measured using the ELISA method with the following characteristics: Human Leptin ELISA kit, Bio Vendor, EU - sensitivity – 0,156 pg/mL, intra-assay imprecision CV<7,6%, interassay imprecision CV <6,7%; Human Ghrelin ELISA Kit, CUSABIO BIOTECH CO., Ltd., China – Scope of the analysis – 0,625-40 pg/mL, sensitivity – 0,2 pg/ml, intra-assay imprecision CV<8%, interassay imprecision CV<10%; Human Galanin-like Peptide (GALP) ELISA Kit, CUSABIO BIOTECH CO., Ltd., China – Scope of analysis - 0,156-10 ng/mL, sensitivity - 0,039 ng/mL, intra-assay imprecision CV<8%, interassay imprecision CV<10%. The same tests were conducted on a control group of 22 age and BMI matched, clinically healthy women.

BMI, LDL-cholesterol (LDL-C), LH/FSH ratio, free androgen index (FAI) and HOMA-index were additionally calculated using generally accepted formulas.

Ultrasound investigation of ovaries and the thyroid gland were performed in all the study participants. Fat mass (kg and%) was determined by professional high capacity body composition analyzer (analyzer Tanita BC-420).

Absolute inclusion criteria were clinical and hormonal euthyroid state, lack of acute and chronic illnesses, as well as absence of medication affecting carbohydrate and lipid metabolism, body weight, and hormonal parameters for at least the last 3 months. The study participants were purposely questioned for iodine intake or contact. We excluded women with extreme body weight deviation (BMI under 18 and over 40 kg/m^2).

Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistic 20 for Windows. The data are presented as mean ± standard error of means (mean±SEM). The Kolmogorov-Smirnov test was used to test the normality of distribution. Odds ratio, 95% confidence interval and P-value less than 0,05 (P<0,05) were considered statistically significant. According to the distribution of the variables and the size of the groups parametric or nonparametric analyses were used.

Results

The study was composed of 70 PCOS women aged from 16 to 39 years (mean age 25,06±0,69 years) with BMI from 18,3 to 39,5 kg/m^2 (mean BMI 26,50±0,83 kg/m^2) and 22 age and BMI matched, clinically healthy women (aged from 20 to 34 years, mean age 26,78±1,7 years, P>0,05; BMI from18 to 28,1 kg/m^2, mean BMI 23,36±1,4 kg/m^2, P>0,05).

All investigated variables are presented in Table 1. The results from the parametric correlation analysis revealed significant correlations between markers of insulin resistance, lipid metabolism and biochemical

hyperandrogenism which are logical and consistent with our preliminary prediction. This also applies to the established significant correlation of *TSH* – negative with FT4 (R = -0,319; P<0,05) and positive with PRL (R = 0,418; P <0,01), TPOAb (R = 0,527; P<0,01) and TgAb (R=0,438; P <0,01). As concerns the typical PCOS hormonal markers, a significant negative correlation of TSH with T (R = -0,252; P<0,05) and a tendency to such a correlation with LH (R = -0,206; P=0,099) and LH/FSH (R =-0,220; P=0,081) was observed, the latter not reaching significance in this particular group of women. *FT4* correlated positively with IRI (R=0,310; P<0,05) and HOMA (R=0,292; P<0,05) and negatively with SHBG (R =-0,303; P<0,05). *TPOAb* in addition to the correlation with TSH, correlated negatively with T (R =-,350; P<0,05), DHEA-S (R=-0,349; P<0,05), and positively with age (R=0,361; P<0,01). Correlations of this antibody with TC (R=0,253; P=0,074) and LDL-C (R=0,264; P=0,067) were with borderline significance. Age correlated significantly with several of the investigated parameters – positively with BMI (R=0,260; P<0,05), TC (R=0,487; P<0,01), LDL-C (R=0,435; P<0,01), TG (R=0,313; P<0,05), and negatively with LH (R=-0,381; P<0,01), LH/FSH (R=-0,332; P<0,01) and DHEA-S (R=-0,285; P<0,05). It should be pointed out, however, that there was a trend towards significant correlations with most of the androgen markers – T (R=-0,216; P=0,079), FAI (R=-0,230; P=0,088), 17-OHP (R=-0,361; P=0,064), Andro (R=-0,292; P=0,094).

Positive serum markers for tAITD were detected in 14 (20%) of women with PCOS and only in 2 (9,09%) of the controls, but despite the marked differences, no significance was found when analysed by χ^2 (χ^2=1,39; P=0,24). All the investigated parameters were compared between PCOS women with and without AITD using the Mann-Whitney test (Table 2). Women with PCOS and AITD had a significantly higher mean age, higher levels of TSH and lower levels of T and DHEA-S as compared to PCOS women without AITD.

In PCOS women without AITD a Pearson correlation analysis was performed for all variables. A significant negative correlation of age with LH (R=-0,512; P<0,01), LH/FSH (R=-0,517; P<0,01) and most hormonal markers of hyperandrogenism: FAI (R= -0.338; P<0,05), DHEA-S (R= -0,388; P<0,05), 17OHP (R= -0,603; P<0,01), Andro (R= -0,441; P<0,05), and a positive one with TC (R= 0,322; P<0,05) were established. LH correlated positively with T (R= 0,389; P<0,01), 17OHP (R= 0,551; P<0,01) and Andro (R= 0,401; P<0,05). TSH correlated negatively with LH (R= -0,313; P<0,05) and LH/FSH (R= -0,342; P<0,05) and positively with FSH (R= 0,366; P<0,05). FT4 correlated positively with IRI (R=0,345; P<0,05) and negatively with SHBG (R=-0,413; P<0,05). The group of PCOS women with AITD was analysed using the? rank correlation coefficient of Spearman rho. TSH strongly correlated with PRL (R=0,817; P<0,01). Age correlated negatively with TgAb (R= -0.775; P<0.05), positively with LDL-C (R= 0,811; P<0,05) and with body fat % (R= 0,900; P<0,05).

We additionally studied 3 hormones that are not included in the routine diagnostic process for PCOS - GALP, leptin and ghrelin. GALP levels were significantly higher in the PCOS group ( ) compared to the control group. When the group with PCOS was divided into 2 subgroups, GALP levels in the PCOS women without AITD were 4 times higher than in controls, whereas in those with AITD – about 2 times, but these differences did not reach significance. All variables in the main groups and sub groups are presented in Table 1 and Table 2.

We received the following significant correlations in the whole group of PCOS women: for *GALP* - positive with FAI (R=0,291; P<0,05), negative with PRL (R= -0,315; P<,05), borderline with *ghrelin* (R= 0,250; P=0,05), T (R= ,237; P=0,064) and FT4 (R=0,245; P=0,086); for *leptin* - positive with BMI (R=0,675; P<0,001), T (R=0,323; P<0,01), FAI (R=0,462; P<0,01), TG (R=0,384; P<0,01), IRI (R=0,571; P<0,001), HOMA (R=0,500; P<0,001), fat mass % (R=0,474; P<0,01); negative with SHBG (R=0,488; P<0,01) and HDL-C (R= -0,309; P<0,05); for *ghrelin* – positive with LH (R=0,315; P<0,05), LH/FSH (R=0,254; P<0,05) and borderline negative with age (R= -0,204; P=0,097). In **PCOS women without AITD** the following significant correlations were found: for *GALP* - negative with PRL (R= -0,377; P<0,05), positive with ghrelin (R= 0,215; P<0.05); for l*eptin* – positive with BMI (R=0,637; P<0,001), TSH (R= 0,320; P<0,05), T (R=0,360; P<0,05), FAI (R=0,429; P<0,01), TG (R=0,331; P<0,05), IRI (R=0,484; P<0,01), HOMA (R=0,403; P<0,01), fat mass % (R=0.460; P<0.05), negative with SHBG (R= -0.436; P<0,01) and a borderline positive with ghrelin (R=0,215; P=0,075); for *ghrelin* (in addition to the above mentioned) negative with age (R= -0,304; P<0,05), positive with LH (R=0,515; P<0,01) and LH/FSH (R= 0,428; P<0,01), and borderline positive with FAI (R=0,284; P=0,076). In **PCOS women with AITD** the correlations were as follows: for *GALP* – negative with PRL (R= -0,828; P<0,05), TSH (R= -0,821; P<0,01), TPOAb (R= -0,752; P<0,05), and positive with FT4 (R=0,717; P<0,05); for *leptin* - positive with BMI (R=0,742; P<0,05), IRI (R=0,902; P<0,001), HOMA (R=0,902; P<0,001), negative with SHBG (R= -0,695; P<0,05); for *ghrelin* - positive borderline with FT4 (R=0,605; P=0,084).

Discussion

PCOS and AITD are independent risk factors for cardiovascular disease, ovarian failure and complications of pregnancy. Both diseases may represent with a similar clinical phenotype, which could impede accurate diagnosis. This is particularly important for autoimmune thyroiditis that is known to be oligo- or asymptomatic for

Table 1. Clinical, metabolic, hormonal and immunological characteristics of PCOS women and clinically healthy controls.

Features (mean ± SEM)	PCOS (n=70)	Control (n=22)	P
Age (y)	25,06±0,69	26,78±1,7	NS
BMI (kg/m2)	26,50±0,83	23,36±1,4	NS
Fat mass (%)	33,45±6,15	32,42±1,44	NS
FPG (mmol/l)	5,15±0,11	4,76±0,16	*P=0,074*
IRI (mIU/ml)	7,23±0,52	3,66±0,37	**P=0,0003**
HOMA-IR	1,68±0,15	0,79±0,09	**P=0,001**
TC (mmol/l)	4,71±0,11	4,31±0,21	*P=0,0837*
HDL-C (mmol/l)	1,35±0,04	1,49±0,07	*P=0,0890*
LDL-C (mmol/l)	2,89±0,09	2,93±0,23	NS
TG (mmol/l)	1,05±0,08	0,8±0,08	*P=0,0989*
TSH (mU/l)	2,46±0,25	1,73±0,11	NS
FT4 (pmol/l)	11,56±0,21	11,37±0,34	NS
TPO-Ab (IU/ml)	97,04±34,20	31,84±23,62	NS
Tg-Ab (IU/ml)	53,38±49,87	0,19±0,12	**P=0,0001**
LH (IU/l)	7,24±0,67	4,92±0,81	*P=0,073*
FSH (mIU/ml)	6,91±0,21	7,67±0,49	NS
LH/FSH	1,11±0,11	0,67±0,11	**P=0,035**
E2 (pmol/l)	274,94±22,47	221,75±28,33	NS
PRL (mU/l)	348,95±28,96	190,05±39,27	*P=0,058*
T (ng/ml)	0,63±0,03	0,34±0,04	**P=0,0001**
SHBG (nmol/l)	39,14±3,17	60,26±5,55	**P=0,001**
FAI	9,31±1,24	1,99±0,17	**P=0,014**
Andro (ng/ml)	4,82±0,38	2.52±0,20	**P=0,001**
17OHP (ng/ml)	1,0±0,08	0,73±0,09	*P=0,078*
DHEA-S (μg/dl)	269,30±17,7	175,5±20,35	**P=0,006**
Urinary cortisol (nmol/24h)	424,25±25,12	374,2±45,06	NS
Leptin (ng/ml)	27,54±1,98	15,63±4,12	**P=0,005**
Ghrelin (pg/ml)	6,14±0,3	5,56±0,43	NS
GALP (ng/ml)	2,37±0,48	0,64±0,17	**P=0,048**

many years and could be diagnosed only when an overthypothyroidism develops (10). There is a growing evidence that there is an association between AITD, infertility and negative impact on pregnancy, including recurrent miscarriages and premature birth (11). This is the reason why experts from various fields of medicine guide their patients more often to test AITD serum markers. Our study showed that the incidence of AITD in PCOS women is two times higher than in controls, but remains relatively low compared to most other studies from around the world with similar design (12, 13). These differences can be explained not only by regional and ethnic specificity of the study group, but also by the fact that the hospitalized patients had already undergone an initial selective medical examination. In addition, the study did not include women who were diagnosed as having AITD based only on ultrasound criteria. When comparing the data in the two subgroups of PCOS women with or without AITD to those in the control group 2 different phenotypes were clearly formed. According to the data and the established significant correlations, different trends of the disease progression in both groups are presumed:

1 In ***PCOS women with AITD***, metabolic disorders mainly associated with insulin resistance dominated. If high serum markers of AITD persist, they may lead to thyroid dysfunction and increase in TSH. In that case, LDL-C and the percentage of fat mass are expected to rise. The most strongly manifested positive correlation of TSH in this group was with PRL, whereas the correlation with androgens was negative. It should be taken into account that high PRL levels often result in PCOS-like phenotype, which can aggravate the clinical picture and can lead to diagnostic and therapeutic difficulties, respectively.

2 *In* ***PCOS women without AITD,*** high androgen levels prevailed and are expected to progress, while metabolic abnormalities were discreet. Particular attention to the dietary regimen should be paid in this population, because we found a marked insulin resistance, even in the absence of overweight, which can be aggravated with weight gain.

Leptin is secreted in small amounts in many tissues: gastric epithelium, placenta, muscle tissue, CNS, but it is believed that its main production and secretion is from adipose tissue (14). There is evidence that leptin is not only important for the regulation of energy balance and food intake, but that it also plays a role as a metabolic and neuroendocrine hormone. This hormone is

Table 2. Clinical, metabolic, hormonal and immunological characteristics of women with PCOS with and without AITD.

Features (mean ± SEM)	PCOS with AITD n - 14	PCOS without AITD n - 56
Age (y)	29,11±2,41	24,20±0,75 *
BMI (kg/m²)	28,28±3,05	26,23±0,99
Fat mass (%)	33,45±6,15	28,54±0,16
FPG (mmol/l)	5,3±0,15 †	5,22±0,14
IRI (mIU/ml)	7,97±1,53	6,99±0,61 †
HOMA-IR	1,91±0,39	1,67±0,18 ††
TC (mmol/l)	5±0,36	4,72±0,12
HDL-C (mmol/l)	1,28±0,1	1,39±0,06
LDL-C (mmol/l)	3,24±0,24	2,87±0,11
TG (mmol/l)	1,33±0,29	1,0±0,1
TSH (mU/l)	4,76±1,47	2,15±0,15 **
FT4 (pmol/l)	11,44±0,64	11,58±0,22
TPO-Ab (IU/ml)	520,8±112,8 ††	0,73±0,13 **†
Tg-Ab (IU/ml)	306,3±284,4 ††	0,13±0,04 **
LH (IU/l)	4,67±0,67	7,57±0,86
FSH (mIU/ml)	7,02±0,64	6,94±0,25
LH/FSH	0,76±0,17	1,15±0,14
PRL (mU/l)	396,1±102,11	345,31±33,50 †
E2 (pmol/l)	247,5±27,22	285,98±32,95
T (ng/ml)	0,39±0,06	0,65±0,04 **††
SHBG (nmol/l)	32,81±5,16	39,99±4,13 †
FAI	6,17±2,03	10,25±1,67 ††
Andro (ng/ml)	4,12±1,05	4,75±0,46 †
17OHP (ng/ml)	1,03±0,09 †	0,93±0,09
DHEA-S (µg/dl)	146,7±24,2	280,45±21,6 **†
Urinary cortisol (nmol/24h)	414,8±79,4	423,3±33,4
Leptin (ng/ml)	32,66±5,58 †	27,14±2,62
Ghrelin (pg/ml)	6,7±0,89	6,25±0,39
GALP (ng/ml)	1,51±1,07	2,57±0,63

* P <0,05;
** P <0,01 – significant differences between the two subgroups of PCOS women;
† P <0,05;
†† P <0,01 – significant differences compared to the control group (see Tabl.1).

involved in glucose metabolism, interacts with the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, thyroid gland and growth hormone, intervenes even in hematopoiesis and immune system as well as in reproductive processes (15). Leptin strictly interacts with parameters of insulin resistance, determined by a number of authors, as shown in our earlier study (16). According to our study leptin levels are highest in PCOS women with AITD. This can be explained by the assumption of its stimulating role in autoimmune processes, in our case in relation to AITD, leading to increased TSH (17, 18).

GALP is a neuropeptide isolated in 1999. Its expressing cells are limited and are found mainly in n.arcuatus and the posterior pituitary. GALP plays an important role as an intermediate neuroendocrine signal between leptin and hypothalamic-pituitary-gonadal axis (19). Administration of GALP in CNS stimulates gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-mediated secretion of LH. These observations indicate that GALP is a molecular signal, which connects metabolism to the neuroendocrine reproductive system and thus regulates reproductive activity as a function of the energy state (20). GALP levels in women with PCOS in our study were four times higher than in controls, but the differences did not reach statistical significance, possibly due to the heterogeneity of the clusters and the relatively small number of subjects. The highest levels were found in the subgroup with PCOS without AITD.

However, the highest levels of LH were found in the same subgroup, as well. The manifest interaction between GALP and the monitored markers, suggests a possible role of this hormone in gonadotropin secretion (syimulating one), as claimed by some other authors (20, 21).

Ghrelin is released from the gastrointestinal tract and circulates in two forms – acylated and unacylated, as the unacylated ghrelin is the stable one and is in the larger amount. By acylation, the hormone provides its endocrine function – stimulation of growth hormone secretion, induction of food intake, fat accumulation and regulation of energy homeostasis, and participation in the control of the reproductive function (22). All the data so far illustrate a complex mode of ghrelin action on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis with a predominantly inhibitory effect on central (hypothalamic) levels and GnRH-induced gonadotropin secretion and direct stimulating effect on the basal LH and FSH synthesis (23). There was no significant difference in ghrelin levels between PCOS subgroups and the control group in our study. However, considering the correlations we found between ghrelin and certain hormones, including leptin and GALP, we believe that ghrelin is involved in the regulation of gonadotropin and androgen secretion and might be related also to thyroid function. That is about to be clarified.

In conclusion, our results showed an upward spiral of interaction between age, TSH and anti-

TPO. These factors influence each other and through interaction with other hormones may enhance the symptoms of the underlying disease. Thus, they appear to be preconditions for earlier development of chronic complications. Thyroid function in PCOS should be accurately assessed and monitored even in clinically euthyroid states. And since AITD is the most common cause of hypothyroidism, the search for thyroid pathology should start with the diagnosis of PCOS.

References

1. **Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO.** The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2745-2749.

2. **Rotterdam ESHRE/ASRM -** Sponsored PCOS Consensus Workshop Group 2004 Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 2004 ; 81; 19-25.

3. **March WA, Moore VM, Willson KJ, Phillips DI, Norman RJ, Davies MJ.** The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Hum Reprod* 2010; 25: 544-551.

4. **Canaris GJ, Manowitz NR, Mayor G, Ridgway EC.** The Colorado thyroid disease prevalence study. *Arch Intern Med* 2000; 160: 526-534.

5. **Artini PG, Uccelli A, Papini F, Simi G, Di Berardino OM, Ruggiero M, Cela V.** Infertility and pregnancy loss in euthyroid women with thyroid autoimmunity. *Gynecol Endocrinol* 2013; 29: 36-41.

6. **Janssen OE, Mehlmauer N, Hahn S, Offner AH,Gartner R.** High prevalence of auto immune thyroiditis in patients with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 2004; 150, 36: 3-9.

7. **Van Gelderen CJ, Gomes dos Santos MI.** Polycystic ovarian syndrome. Evidence for an autoimmune mechanism in some cases. *J Reprod Med* 1993; 38:381-386.

8. **Gleicher N, Barad D, Weghofer A.** Functional autoantibodies, a new paradigm in autoimmunity? Autoimmun Rev 2007; 7: 42-45.

9. Dayan CM, Daniels GH. Chronic autoimmune thyroiditis. *N Engl J Med* 1996; 335: 99-107.

10. **Poppe K, Velkeniers B, Glinoer D.** The role of thyroid autoimmunity in fertility and pregnancy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008; 4(7): 394-405.

11. **Thangaratinam S, Tan A, Knox E, Kilby MD, Franklyn J, Coomarasamy A.** Association between thyroid autoantibodies and miscarriage and preterm birth: meta-analysis of evidence. *BMJ* 2011; 342: d2616.

12. **Garelli S, Masiero S, Plebani M, Chen S, Furmaniak J, Armanini D, Betterle C.** High prevalence of chronic thyroiditis in patients with polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013; 169: 248-251.

13. **Kachuei M, Jafari F, Kachuei A and Keshteli AH.** Prevalence of autoimmune thyroiditis in patients with polycystic ovary syndrome. *Arch Gynecol Obstet* 2012; 285: 853-856.

14. **Yan P, Liu D, Long M, Ren Y, Pang J, Li R.** Changes of serum omentin levels and relationship between omentin and adiponectin concentrations in type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2011; 119(4): 257-263.

15. **Baratta M. Leptin** - from a signal of adiposity to a hormonal mediator in peripheral tissues. *Med. Sci. Monit* 2002; 8(12): 282-292.

16. **Pehlivanov B, Mitkov M.** Serum leptin levels correlate with clinical and biochemical indices of insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2009; 14(2): 153-159.

17. **Duntas LH, Biondi B.** The interconnections between obesity, thyroid function, and autoimmunity: The multifold role of leptin. *Thyroid* 2013; 23: 646-653.

18. **Matarese G, Leiter EH, La Cava A.** Leptin in autoimmunity: Many questions, some answers. *Tissue Antigens* 2007; 70: 87-95.

19. **Seth A, Stanley S, Jethwa P, Gardiner J, Ghatei M, Bloom S.** Galanin-like peptide stimulates the release of gonadotropin-releasing hormone in vitro and may mediate the effects of leptin on the hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Endocrinology* 2004; 145(2): 743-750.

20. **Gottsch M.L., Clifton D.K., Steiner R.A.** Galanin-like peptide as a link in the integration of metabolism and reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15(5): 215-221.

21. **Fang P, Shi M, Yu M, Guo L, Bo P, Zhang Z.** Endogenous peptides as risk markers to assess the development of insulin resistance. *Peptides* 2014; 51: 9-14.

22. **Seim I, Herington AC, Chopin LK** New insights into the molecular complexity of the ghrelin gene locus. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009; 20: 297-304.

23. **Nyagolova PV, Mitkov MD, Orbetzova MM.** Energy balance and neuroendocrine control of reproduction. Endocrinologia 2014; 2: 75-80. (Няголова ПВ, Митков МД, Орбецова ММ. Енергиен баланс и невроендокринен контрол на репродукцията. *Ендокринология* 2014; 2: 75-80).

Основни клинично-химични характеристики на плъхове с метаболитен синдром след осем седмична немедикаментозна терапия

Ангелова, Пенка А.[1], Бояджиев, Николай П.[1], Георгиева, Катерина Н.[1], Атанасова, Пепа К.[2], Хрисчев, Петър Ив.[1], Терзиева, Дора Д.[3] Попов, Добрин Ив.[1]

[1.] Катедра по Физиология, Медицински Факултет, МУ, Пловдив

[2.] Катедра по Анатомия, хистология и ембриология, МФ, МУ, Пловдив

[3.] Катедра по Клинична лаборатория, Фармацевтичен факултет, Медицински Университет, Пловдив

Адрес за кореспонденция

Д-р Пенка Ангелова

Катедра по Физиология, Медицински Факултет, Медицински Университет, Пловдив

Бул. „Васил Априлов" № 15А, Пловдив 4002, България

e-mail: angelovapepa@abv.bg

Резюме

Поради голямата си социална значимост метаболитният синдром (МетС) привлича вниманието на много изследователи, с оглед на което са разработени различни модели при експериментални животни. Комбинираните високо липидни и високо въглехидратни диети се доближават до хранителните навици на хората със затлъстяване, дислипидемия, нарушения във въглехидратната обмяна и МетС.

Целта на настоящото проучване беше да изследваме възможността за подобряване на основни клинично-химични показатели при плъхове с диетично индуциран метаболитен синдром след осем седмично немедикаментозно лечение.

Материал и методи: В експеримента се използваха мъжки плъхове, порода Wistar (n=70) с начална телесна маса 160-180 g. С оглед индуциране на МетС, начално плъховете бяха разделени на две експериментални групи – здрава контролна група и диетично манипулирана (група Д за индуциране на МетС). За проучване на възможността за подобряване на някои клинично-химични показатели при плъхове с МетС чрез немедикаментозна терапия, на 16та експериментална седмица група Д беше разделена на четири подгрупи: група с нелекуван МетС (МС, n=10); хипокалорична група (ХК, n=10); тренировъчна група (Т, n=10) и група с комбиниран хранителен и двигателен режим (ТХК, n=10).

Резултати и изводи: Трите приложени немедикаментозни програми за лечение на МетС (хипокалорична диета, системно физическо натоварване и комбиниран режим с диета и тренировка) оказват положителен ефект върху основните клинично-химични показатели при плъхове, което кореспондира с намален сърдечно-съдов риск. Клинично-химичните характеристики са най-добри при плъховете, преминали осем седмична комбинирана програма с диетичен и двигателен режим.

Ключови думи: метаболитен синдром, хипокалорична диета, физическо натоварване, плъхове

Увод

Метаболитният синдром (МетС) се определя като комбинация от взаимно свързани рискови фактори за развитието на атеросклеротични сърдечносъдови заболявания и захарен диабет. Заради голямата си социална значимост МетС привлича вниманието на много изследователи, поради което са разработени различни модели при експериментални животни (1-4).

При плъхове има изработени различни диетични режими за индуциране на затлъстяване и МетС. Комбинираните високо липидни и високо въглехидратни диети се доближават до хранителните навици на хората със затлъстяване, дислипидемия, нарушения във въглехидратната обмяна и МетС (1, 3, 4). Прилагането на комбинирана високо липидна и високо въглехидратна диета с цел индуциране на МетС при плъхове води до сигнификантно нарастване нивото на кръвната захар на гладно, повишаване нивото на триглицеридите и намаляване концентрацията на HDL-холестерола (5). Животните, хранени с комбинирана високо липидна и високо въглехидратна храна, развиват и останалите компоненти на МетС (5, 6).

Лечението на МетС е комплексно. То включва медикаментозна и немедикаментозна терапия. Основните акценти на немедикаментозната терапия се обединяват в три категории – редуциране на телесната маса, повишена физическа активност и диета, намаляваща риска от атеросклеротични съдови заболявания (6-10).

Цел

Целта на настоящото проучване беше да изследваме възможността за подобряване на основни клинично-химични показатели при плъхове с диетично индуциран МетС след осем седмично немедикаментозно лечение. То е част от комплексно изследване на промяната на някои морфологични, функционални и клинично-химични показатели на различните етапи от диетичното индуциране на МетС при плъхове и възможността за обратимост на промените чрез диетично и тренировъчно повлияване.

Материали и методи

Материали

В експеримента се използваха мъжки плъхове, порода Wistar (n=70) с начална телесна маса 160-180 g, които бяха взети от вивариума на МУ – Пловдив. Плъховете имаха достъп до храна и вода *ad libitum* и бяха настанени в индивидуални метаболитни клетки. Те бяха отглеждани при температура 20°C±1°C, контролирана влажност и 12:12 h светло-тъмен фото-период. Целият експериментален протокол беше одобрен от Комисията по научна етика към МУ, Пловдив и от Комисията по етика към животните, към Българската агенция по безопасност на храните. Плъховете бяха отглеждани и всички експериментални процедури бяха извършени съобразно препоръките на Европейската комисия за защита и хуманно отношение към лабораторните животни. Всички плъхове бяха хранени със стандартна вивариумна храна за две седмици, докато се адаптират към условията в метаболитните клетки.

С оглед индуциране на МетС, начално плъховете бяха разделени на две експериментални групи – здрава контролна група (ЗК, n=20, приемаща стандартна храна) и диетично манипулирана (Д, n=50, приемаща комбинирана високо липидна и високо захарозна диета (ВЛВЗД) за индуциране на МетС). За доказване наличието на МетС на 16та експериментална седмица определихме телесната маса, BMI и обиколката корема на всички животни. По 10 плъха от група бяха евтаназирани за събиране на кръв за определяне нивото на кръвната захар на гладно и липиден профил.

За проучване на възможността за подобряване на някои клинично-химични показатели при плъхове с МетС чрез немедикаментозна терапия, на 16та експериментална седмица група Д беше разделена на четири подгрупи: група с нелекуван МетС (МС, n=10, продължи да приема ВЛВЗД); хипокалорична група (ХК, n=10, на 16та седмица премина към хипокалорична храна); тренировъчна група (Т, n=10, на 16та седмица започна системно физическо натоварване и премина към стандартна лабораторна храна) и група с комбиниран хранителен и двигателен режим (ТХК, n=10, на 16та седмица започна системно физическо натоварване и премина към хипокалорична храна). В края на проучването всички животни бяха евтаназирани за събиране на кръв за определяне на основни клинично-химични показатели.

Диети

Здравата контролна група през цялото време приемаше стандартна храна *ad libitum* за лабораторни плъхове, предоставена от вивариума на МУ - Пловдив (Протеини: Мазнини: Въглехидрати – 18,5: 10,5: 71 En%, енергийно съдържание 2908 kcal/kg). Групата с нелекуван МетС през цялото време приемаше ВЛВЗД *ad libitum* (Протеини: Мазнини: Въглехидрати – 12,51: 30,15: 57,34 En%, енергийно съдържание 4298 kcal/kg), приготвена на място. За период от 16 седмици групи ХК и ТХК приемаха ВЛВЗД, след това 8 седмици приемаха хипокалорична храна (с 30% намалено енергий-

но съдържание за сметка на фибри – 2035,6 kcal/kg), произведена по поръчка от „Амико А" ООД.

Системно физическо натоварване

За тестване на възможността за обратимостта на диетично индуциран МетС при плъхове с физическо натоварване оформихме групи Т и ТХК. Животните от тези групи бяха подложени на дозирано системно субмаксимално натоварване на тредмил със скорост на лентата 27 m/min, 5° наклон (около 70-75% VO2max), 5 дни седмично за 8 седмици. Първият ден продължителността на тренировката беше 20 min и постепенно нарастваше с 5 min през ден. В края на втората седмица тя достигна до 40 min и това натоварване се запази до края на експеримента.

Клинично-химични изследвания

За събирането на кръвта животните бяха декапитирани под наркоза с 30 mg/kg Thiopental i. p. с гилотина за малки опитни животни (HUGO SACHS ELECTRONIC D-79232 March F. R. Germany), съобразно ЗВМД (02. 05. 2005 г) и Наредба №15 (03. 02. 2006 г). Последният хранителен прием на плъховете беше 12 часа преди събирането на кръвта. Веднага след декапитацията събраната кръв беше центрофугирана и серумните концентрации на кръвната захар, холестерола, триглицеридите, LDL-холестерола, HDL-холестерола бяха определени с реактиви на Fortress Diagnostics (UK) с клинично-химичен анализатор Konelab 60 i (Thermophisher Scientific, USA).

Морфологични показатели

В края на 16^{та} експериментална седмица определихме индекс телесна маса (Body Mass Index, BMI) и обиколката на корема на плъховете. Претеглихме плъховете сутрин с циферблатна везна (ЗАВ, България). Един час преди това храната беше временно отнета и върната в метаболитните клетки след определянето на телесната маса.

За изчисляването на BMI, използвахме формулата:

BMI = телесна маса (g) / (назоанално разстояние (cm))^2, [g/cm^2]

Този начин за определяне на BMI е утвърден в изследванията върху затлъстяването и МетС при плъхове (11, 12).

Статистическа обработка

Резултатите са представени като X±SEM. Данните от експеримента бяха анализирани с one-way ANOWA за определяне на междугрупови различия. Използвахме статистическа програма SPSS v. 13.0. За сигнификантна се прие разликата при P<0,05.

Резултати и обсъждане

Индуциране на метаболитен синдром

На 16^{та} експериментална седмица животните хранени с ВЛВЗД бяха с развит МетС. Плъховете от Д бяха с по-висока телесна маса, по-висок BMI и по-голяма обиколка на корема спрямо здравата контролна група (P<0,05) (Табл. 1).

Серумните нива на кръвната захар, общия холестерол, триглицеридите при Д бяха по-високи спрямо ЗК. Здравата контролна група беше с по-високи серумни концентрации на HDL-холестерола в сравнение с Д (P<0,05) (Фиг. 1).

Сравнение между плъхове с нелекуван метаболитен синдром и здрави контроли след 24 седмично приложение на ВЛВЗД.

Стойностите на серумната глюкоза на гладно при здравите контролни животни бяха по-ниски в сравнение с диетично манипулираната група (P<0,001) (Фиг. 2). Общият холостерол, триглицеридите и LDL-холестерола бяха сигнификантно по-високи при плъховете с нелекуван МетС спрямо ЗК (P<0,05) (Табл. 2). Серумните стойности на HDL-холестерола бяха по-ниски при МС спрямо ЗК (P<0,05) (Табл. 2). Клинично-химичните данни на групата с нелекуван МетС кореспондират с висок риск от развитие на сърдечно-съдови заболявания и захарен диабет тип 2 (3, 4).

Влияние на немедикаментозната терапия при плъхове с диетично индуциран МетС.

Хипокалоричната диета, системната тренировка и комбинираният хранителен и двигателен режим при плъхове оказаха положително въздействие върху някои от компонентите на диетично индуцирания МетС при плъхове. Това съответства на данни от други авторски колективи (13-16).

Клинично-химични показатели на плъхове с МетС след осем седмично приложение на хипокалорична диета.

Серумното ниво на кръвната захар след края на осма седмица на група НС съответстваше на ЗК (P>0.05) и беше сигнификантно по-ниско спрямо МС (P<0,05), (Фиг. 2). Триглицеридите при хипокалоричната група бяха по-ниски спрямо МС (P<0,001) и съизмерими със стойностите при ЗС (P>0,05) (Табл. 2).

При определяне нивото на HDL-холестерола на групи НС и ЗК не установихме сигнификантни разлики (P>0,05). HDL-холестеролът беше по-висок при групата, подложена на хипокалорична диета в сравнение с МС (P<0.01) (Табл. 2). Стойностите на LDL-холестерола в серума на хипокалоричната група бяха по-ниски спрямо МС (P<0,001) и аналогични на група ЗК (P>0,05) (Табл. 2). Общият холестерол на НС беше по-нисък в сравнение с

нелекуваните плъхове (P<0,05), но по-висок спрямо здравите контролни животни (P>0,05) (Табл. 2).

Клинично-химични показатели на плъхове с МетС след осем седмично системно физическо натоварване.

Серумното ниво на кръвната захар след края на осма седмица на групата, подложена на системно физическо натоварване съответстваше на здравите контролни животни (P>0,05) и беше сигнификантно по-ниско спрямо МС (P<0,05), (Фиг. 2). Общият холестерол на Т група беше по-нисък в сравнение с МС (P<0,05) и без сигнификантна разлика спрямо ЗК (P>0,05) (Табл. 2). Триглицеридите при Т група бяха по-ниски спрямо МС (P<0,001) и съизмерими с нивата на ЗК (P>0,05) (Табл. 2).

При обработване на стойностите, които получихме при изследване на HDL-холестерола на групи Т и ЗК не установихме сигнификантни разлики (P>0,05). Нивото на HDL-холестерола при плъховете, подложени на системно физическо натоварване, беше по-висок в сравнение с МС (P<0,01) (Табл. 2). Стойностите на LDL-холестерола в серума на група Т бяха по-ниски спрямо МС (P<0,001) и по-високи в сравнение с група ЗК (P<0,05) (Табл. 2).

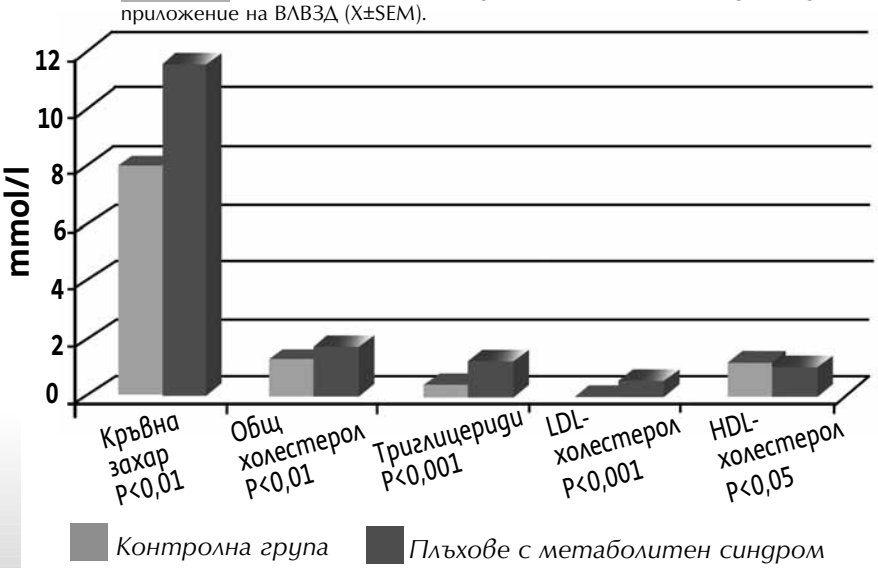
Клинично-химични показатели на плъхове с МетС след осем седмично приложение на комбиниран диетичен и двигателен режим.

Серумното ниво на глюкозата на групата, подложена на комбиниран диетичен и двигателен режим, беше по-ниско от това при нелекуваните плъхове (P<0,001) и без статистическа разлика със здравите контролни животни, (P>0,05) (Фиг. 2). Серумното ниво на общия холестерол на ТХК беше по-ниско от МС (P<0.05) и без статистическа разлика със ЗК (P>0,05) (Табл. 2). Триглицеридите на ТХК бяха сходни със ЗК (P>0,05) и по-ниски спрямо МС (P<0,001) (Табл. 2). HDL-холестеролът беше по-нисък при МС спрямо ТХК (P<0,05) и без разлика между ЗК и ТХК (P>0,05) (Табл. 2). Серумното ниво на LDL-холестерол на ТХК беше по-ниско от МС (P<0,001) и без статистическа разлика със ЗК (P>0,05) (Табл. 2).

Таблица 1. Морфологични показатели на плъховете след 16 седмично приложение на ВЛВЗД (X±SEM).

Показател	Телесна маса (g)	BMI (g/cm²)	Обиколка на корема (cm)
Здрава контрола, n=20	327,75 ±8,60	0,65 ±0,013	13,25 ±0,14
Метаболитен синдром, n=50	394,86 ±17,62	0,75 ±0,022	16,65 ±0,48
P	P<0,01	P<0,01	P<0,05

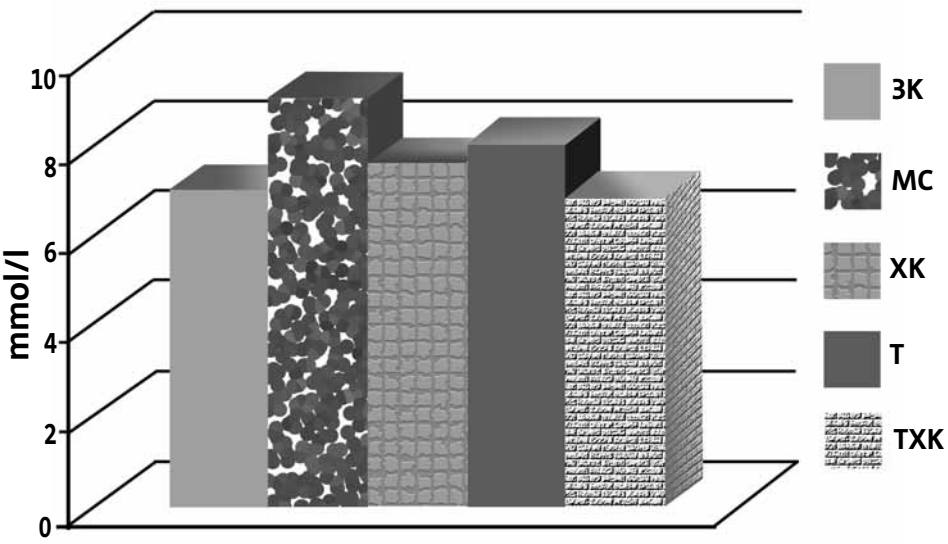
Фигура 1. Клинично-хичмични показатели на плъховете след 16 седмично приложение на ВЛВЗД (X±SEM).



ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ИЗВОДИ

При детайлното разглеждане на получените резултати можем да направим извода, че и трите приложени немедикаментозни програми за лечение на МетС оказват положителен ефект върху основните клинично-химични показатели, което съответства на намален сърдечно-съдов риск. Общият холестерол при групата приемала хипокалорична диета беше съизмерим с нивото при нелекуваните животни и по-висок от това на здравите. LDL-холестеролът при групата, подложена на системно физическо натоварване, и преминаването към стандартна храна без ограничение на количеството беше сигнификантно по-висок спрямо здравите животни. Клинично-химичните характеристики бяха най-добри при плъховете, преминали осем седмична комбинирана програма с диетичен и двигателен режим. Важно е да отбележим, че тези резултати са постигнати в лабораторни условия при стриктно спазване на диетичния и тренировъчния режим.

Фигура 2. Стойности на кръвната захар на гладно на експерименталните животни в края на проучването (X±SEM).



P<0,01 при ЗК/МС, МС/ТХК. P<0,05 при МС/ХК, МС/Т.

Таблица 2. Показатели на липидния профил (mmol/l) в края на проучването (X±SEM).

	Общ холестерол	Триглицериди	HDL-холестерол	LDL-холестерол
ЗК	1,16±0,06	0,40±0,04	1,15±0,04	0,03±0,003
МС	1,56±0,05	0,90±0,07	0,88±0,05	0,34±0,031
ХК	1,51±0,15	0,42±0,05	1,42±0,14	0,05±0,014
Т	1,24±0,10	0,41±0,07	1,18±0,08	0,08±0,018
ТХК	1,21±0,04	0,39±0,04	1,14±0,04	0,04±0,007
		P= ниво		
P, ЗК/МС	P<0,0001	P<0,001	P<0,01	P<0,001
P, ЗК/ХК	NS	NS	NS	NS
P, ЗК/Т	NS	NS	NS	P<0,05
P, ЗК/ТХК	NS	NS	NS	NS
P, МС/НС	NS	P<0,001	P<0,01	P<0,001
P, МС/Т	P<0,05	P<0,001	P<0,01	P<0,001
P, МС/ТХК	P<0,001	P<0,001	P<0,01	P<0,001
P, ХК/Т	NS	NS	NS	NS
P, ХК/ТХК	NS	NS	NS	NS
P, Т/ТХК	NS	NS	NS	P=0,055

Благодарности

Проучването е подкрепено от Медицински Университет – Пловдив, по вътреуниверситетски проект НО - 37 / 2012.

Авторите благодарят на д-р Валентин Василев за помощта при оформянето на ръкописа.

Basic Laboratory Characteristics in Rats with the Metabolic Syndrome After Eight Weeks of Nonpharmacological Treatment

Angelova, Penka A.[1], Boyadjiev, Nikolay P. [1], Georgieva, Katerina N.[1], Atanassova, Pepa K.[2], Hrischev, Petar Iv., [1], Terzieva, Dora D. [3], Popov, Dobrin Iv. [4]

[1] Department of Physiology;
[2] Department of Anatomy, histology and embryology;
[3] Department of Clinical Laboratory, Medical University, Plovdiv, Bulgaria

Address for correspondence:
Angelova Penka, MD
Department of Physiology, Medical University, Plovdiv, Bulgaria
Bul. Vasil Aprilov 15-A, Plovdiv 4002, Bulgaria
e-mail: angelovapepa@abv.bg

Abstract

The metabolic syndrome (MetS) is a socially important issue which has drawn the attention of many researchers and as a result different animal models of the MetS have been developed. Combined high-fat and high-carbohydrate diets successfully imitate dietary habits in people with obesity, dyslipidaemia, impaired carbohydrate metabolism and MetS

The aim of the study was to investigate some opportunities for improvement of the basic laboratory characteristics in rats with MetS after eight weeks of nonpharmacological treatment.

Material and methods: Male Wistar rats (n=70) with initial body mass of 160-180 g were used. For the inducement of MetS the rats were initially divided into two groups: a healthy control group, and a dietary manipulated group (group D, for the inducement of MetS). To investigate the opportunities for improvement of the basic laboratory characteristics in rats with MetS after nonpharmacological treatment, on the 16th week the rats of group D were divided into four groups: a group with MetS without treatment (MetS, n=10); hypocaloric group (HC, n=10); training group (T, n=10); and a complex treatment group (THC, n=10).

Results and conclusion: The analysis of the results showed that the three nonpharmacological programs for treatment of MetS for eight weeks improved the basic laboratory characteristics in rats. Dietary regimen, training and the complex therapy decreased the risk of cardiovascular diseases. The most significant improvement in the laboratory indices was achieved by a complex therapy with dietary regimen and training.

Key words: metabolic syndrome; hypocaloric diet; training; rats

Introduction

The metabolic syndrome (MetS) is a combination of interrelated risk factors which increase the risk of cardiovascular diseases and diabetes mellitus. MetS is a socially important issue which has drawn the attention of many researchers and for which different animal models of the MetS have been developed (1-4).

In order to induce obesity and MetS various rat models have been developed. Combined high-fat and high-carbohydrate diets successfully imitate dietary habits in people with obesity, dyslipidaemia, impaired carbohydrate metabolism and MetS (1, 3, 4). The application of a combined high-fat and high-carbohydrate diet for inducing the MetS in rats lead to increased fasting glucose, increased serum triglyceride and decreased HDL cholesterol levels (5). The animals fed a combined high-fat-carbohydrate diet develop the other elements of the MetS as well (5, 6).

The MetS therapy is complex. It includes pharma-

cological and nonpharmacological treatment. The main parts of nonpharmacological treatment are body mass reduction, increased physical activity and dietary modification which decrease the risk of atherosclerotic cardiovascular diseases (6-10).

The aim of the study was to investigate some opportunities for improvement of the basic laboratory characteristics in rats with MetS after eight weeks of non pharmacological treatment. It is a part of a complex study of the changes in certain functional, morphological, and laboratory indices at various stages of a metabolic syndrome inducement in rats with an analysis of the opportunities for improvement of the symptoms by a dietary regimen and exercises.

Materials and methods

Material

Male Wistar rats (n=70) with initial body mass of 160-180 g, taken from the vivarium of the Medical University - Plovdiv, were used. The rats were provided food and water ad libitum and housed in individual metabolic cages. They were kept at ambient temperature of 20±1°C, controlled humidity and a 12:12 h light-dark cycle. The experimental protocol was approved by the Commission of Science Ethics at the Medical University of Plovdiv and the Commission for the Ethical Treatment of Animals at the Bulgarian Food Agency. The rats were reared and all experimental procedures were performed according to the recommendations of the European Commission for the protection and humane treatment of laboratory animals.

All rats were initially fed standard rat chow in course of two weeks until they adapted to the metabolic cages.

For the inducement of MetS the rats were initially divided into two groups: a healthy control group (C, n=20, on a standard rat chow), and a dietary manipulated group (D, n=50, with free access to a combined high-fat-sucrose diet (HFSD) for the inducement of MetS). On the 16th week , the body weight, the body mass index (BMI), and abdominal circumference of each animal were measured in order to establish the development of MetS. Ten rats of each group were killed and blood was collected for analyzing the fasting glucose and lipid profile.

On the 16th week the rats of group D were divided into four groups in order to investigate the opportunitiy for improvement of the basic laboratory characteristics in rats with MetS after nonpharmacological treatment: a group with MetS without treatment (MetS, n=10, taking HFSD); low calorie group (HC, n=10, on 16th week started a hypocaloric dietary regimen); training group (T, n=10, on 16th week started exercises and the animals were fed standard rat chow); and a complex treatment group (THC, n=10, on 16th week started exercises and the animals were fed low calorie food). At the end of the study the rats were killed and blood was collected for analyzing the basic laboratory characteristics.

Diets

The healthy control group had free access to standard rat chow provided by the vivarium of the Medical University Plovdiv (Proteins: Fats: Carbohydrates – 18,5: 10,5: 71 En%, energy content of 2908 kcal/kg). The group with MetS without treatment had free access to HFSD prepared on-site (Proteins: Fats: Carbohydrates – 12,51: 30,15: 57,34 En%, energy content of 4298 kcal/kg). For 16 weeks the animals from groups HC and THC had free access to HFSD, then for eight weeks they were fed hypocaloric food produced by „AMICO A" Ltd., (reduced energy content – 2035,6 kcal/kg, with fiber).

Training

To investigate various opportunities for improvement of the dietary induced MetS in rats by training we formed groups T and THC. The animals from T and THC were submitted to controlled system submaximal loading (on a treadmill with a velocity 27 m/min, 5° incline (which corresponds to about 70-75% VO2max), five days a week, for eight weeks. The first day training session was 20 min. Every two days the duration was increased by 5 min. At the end of the second week it reached 40 min and was kept at that level until the end of the study.

Laboratory analysis

Blood for laboratory analysis was collected after decapitating the rats with a guillotine for small test animals (Hugo Sachs Electronic D-79232 March F.R. Germany) under narcosis with 30 mg/kg Thiopental i.p. following the veterinary laws in Bulgaria. The last food intake was 12 hours before the euthanasia. Blood was collected immediately following decapitation and centrifuged within one hour after the collection of the samples. The serum levels of fasting blood glucose, cholesterol, triglycerides, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol were analyzed with a biochemical analysis system Konelab 60i (Thermophisher Scientific, USA). Reagents of Fortress Diagnostics (United Kingdom) were used.

Morphological indices

The body weight, the BMI, and abdominal circumference of each animal were measured on the 16th week, in order to establish the development of MetS. The body mass of each animal was measured in the morning. An hour before the procedure the food was temporarily taken away from the animals, and returned right after the weighing.

The BMI was estimated by the established formula for calculation of BMI in rats in investigations of obesity and MetS (11, 12): *BMI = body mass (g) / (naso-anal distance (cm))², [g/cm²]*

Statistical analysis

The results are represented as X±SEM. The data of the experiments were analyzed with one-way ANOVA. Difference of P<0,05 was accepted as significant. The statistical package SPSS v. 13,0 was used.

Results and discussion

MetS inducement

On 16th week the rats fed with HFSD developed MetS. The body mass, BMI, and abdominal circumference in the animals from group D ware increased as compared with the healthy controls group (P<0,05) (Table 1).

The fasting blood glucose, cholesterol, and serum triglycerides in group D were higher as compared with C. The HDL-cholesterol levels were higher in the healthy control group as compared with D, (P<0,05) (Fig. 1).

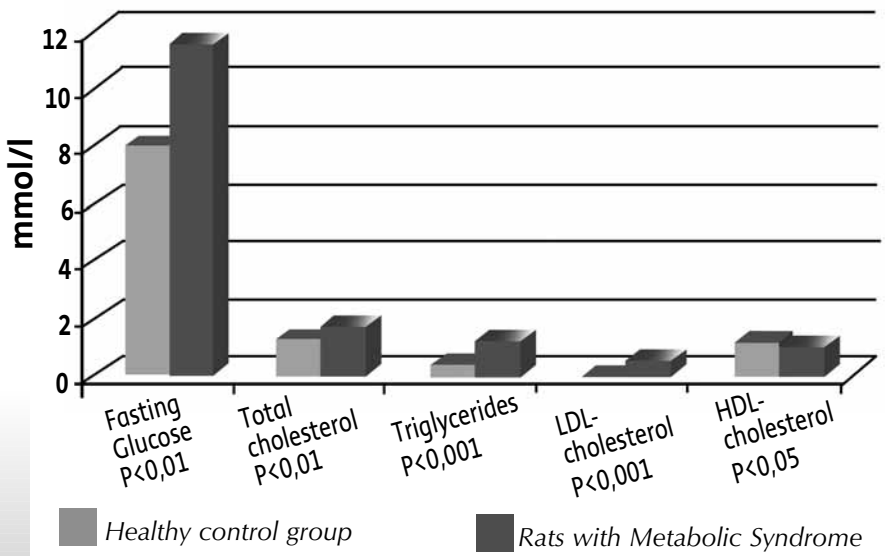
Comparison between the healthy control rats and the rats with MetS after 24 weeks of HFSD

The fasting glucose levels in the healthy controls were lower as compared with the dietary manipulated group, P<0,001 (Fig. 2).

Table 1. Morphological characteristics of the rats after 16 weeks of HFSD (X±SEM).

Variable	Body mass (g)	BMI (g/cm²)	Abdominal circumference (cm)
Healthy controls, n=20	327,75 ±8,60	0,65 ±0,013	13,25 ±0,14
Metabolic syndrome, n=50	394,86 ±17,62	0,75 ±0,022	16,65 ±0,48
P	P<0,01	P<0,01	P<0,05

Figure 1. Basic laboratory characteristics of the rats after 16 weeks of HFSD (X±SEM).



The levels of cholesterol, triglycerides and LDL-cholesterol were increased in the rats with MetS without treatment as compared with the healthy control group (P<0,05). The HDL-cholesterol levels were decreased in the group MetS as compared with C (P<0,05) (Table 2).

The basic laboratory characteristics in the rats with metabolic syndrome correspond to an increased risk of cardiovascular diseases and diabetes mellitus (3, 4).

The effects of nonpharmacological treatment in the rats with dietary induced MetS

The dietary regimen, the increased physical activity and the combined program with diet and training had positive effects on some components of the dietary induced MetS. The presented results support the data of other studies (13-16).

Basic laboratory characteristics in the rats with a metabolic syndrome after eight weeks of low calorie diet

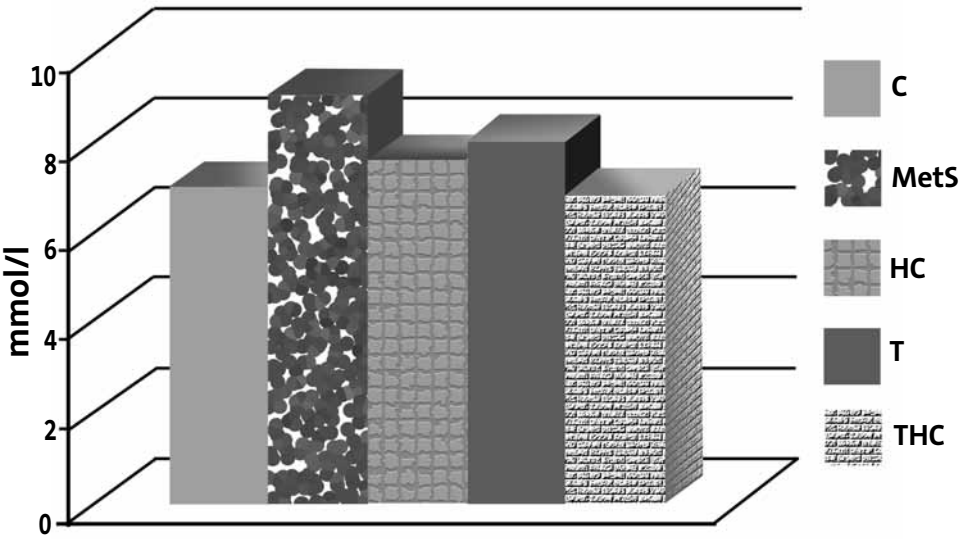
The fasting serum glucose after the end of the eihgth week in group HC was not significantly different from that of group C (P>0,05). The fasting glucose level was decreased in HC as compared with MetS (P<0,05) (Fig. 2).

The triglyceride levels in HC were lower as compared with MetS (P<0,001) and comparable to C (P>0,05) The HDL-cholesterol levels in HC and C did not show any significant difference (P>0,05). The levels of HDL-cholesterol in the hypocaloric group were higher as compared with MetS (P<0,05). The LDL-cholesterol in HC was lower as compared with MetS (P<0,001) and comparable to C (P>0,05). The level of total cholesterol in HC was lower as compared with MetS (P<0,001), but it was increased as compared with C (P<0,05) (Table 2).

Table 2. Serum lipid levels (mmol/l) at the end of the study (X±SEM) and the P-values for each pair of groups.

	Total cholesterol	Triglycerides	HDL-cholesterol	LDL-cholesterol
C	1,16±0,06	0,40±0,04	1,15±0,04	0,03±0,003
MetS	1,56±0,05	0,90±0,07	0,88±0,05	0,34±0,031
HC	1,51±0,15	0,42±0,05	1,42±0,14	0,05±0,014
T	1,24±0,10	0,41±0,07	1,18±0,08	0,08±0,018
THC	1,21±0,04	0,39±0,04	1,14±0,04	0,04±0,007
		P=values		
C/MetS	P<0,0001	P<0,001	P<0,01	P<0,001
C/HC	NS	NS	NS	P<0,05
C/T	NS	NS	NS	NS
P, C/THC	NS	P<0,001	P<0,01	P<0,001
MetS/T	P<0,05	P<0,001	P<0,01	P<0,001
MetS/THC	P<0,001	P<0,001	P<0,01	P<0,001
HC/T	NS	NS	NS	NS
HC/THC	NS	NS	NS	NS
T/THC	NS	NS	NS	P=0,055

Figure 2. Fasting glucose of the experimental animals at the end of the study (X±SEM).



P<0.01 in MetS/C, MetS/THC. P<0.05 in MetS/HC, MetS/T.

Basic laboratory characteristics in the rats with a metabolic syndrome after eight weeks of training

The serum fasting glucose after the end of the eihgth week in the training group was not significantly different than that of group C (P>0,05). The fasting glucose level was decreased in T as compared with MetS (P<0,05) (Fig. 2).

The serum cholesterol level was decreased as compared with MetS (P<0.05) and comparable to C (P>0,05). The serum triglyceride level was decreased as compared with MetS (P<0,05) and comparable to C (P>0,05). The HDL-cholesterol levels in T and C did no show any significant difference (P>0,05). The HDL-cholesterol levels in the training group were higher as compared with MetS (P<0,05). The serum LDL-cholesterol level was decreased as compared with MetS (P<0,05), but it was increased as compared with C (P<0,05) (Table 2).

Basic laboratory characteristics in the rats with a metabolic syndrome after eight weeks of complex nonpharmacological treatment

The serum level of fasting glucose after the end of the eihgth week in group THC was not significantly different from that of group C (P>0,05). The fasting glucose level was decreased in THC as compared with MetS (P<0,05) (Fig. 2).

The serum cholesterol level in THC was decreased as compared with MetS (P<0,05) and comparable to C (P>0,05). The serum triglyceride level was decreased as compared with MetS (P<0,05) and equal to C (P>0,05).

The HDL-cholesterol levels in THC and C did no show any significant difference (P>0,05). The levels of HDL-cholesterol in group THC was higher as compared with MetS (P<0,05). The level of LDL-cholesterol in THC was lower as compared with MetS (P<0,001) and commensurate with C (P>0,05) (Table 2).

Conclusion

The analysis of the results showed that the three nonpharmacological programs for the treatment of the MetS improved the basic laboratory characteristics in rats. The dietary regimen, the training and the complex therapy might all be expected to decrease the risk of cardiovascular diseases. The level of the total cholesterol in the hypocaloric group was lower as compared with the nontreated animals, but it was increased as compared with the healthy rats. The serum LDL-cholesterol level in the training group (with free access to standard rat chow) was decreased as compared with MetS, but it was increased as compared with the healthy animals. The most significant improvement in the laboratory indices was achieved by complex therapy with a dietary regimen and training.

The results are obtained in a laboratory with strict control of the dietary regimen and physical activity.

Acknowledgments

The study was supported by Medical University-Plovdiv grant NO 37 / 2012.
The authors are grateful to Valentin Vasilev MD for his help in preparing this manuscript.

References

1. **Deng J, Huang J, Lu L, Huang Li-Man.** Impairment of cardiac insulin signalingand myocardial contractile performance in high-cholesterol/fructose-fed rats. Am J Physiol - *Hearth and Circulatory Physiology* 2007; 293: H978-H987.

2. **Huang C, Lin Y, Chen G, Huang H, Chuang S. Chao P.** Upregulation of lipogenesis and protein tyrosine phosphatase-1 B expression in the liver of Wistar rats with metabolic syndrome chronically induced by drinking sucrose water. *Ann Nutr Metab* 2010; 57: 169-176.

3. **Panchal SK, Poudyal H, Iyer A, Nazer A, Alam A, Diwan V, et al.** High-carbohydrate high-fat diet - induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011; 57 (1): 51-64.

4. **Lene N A, Pedersen J, Petersen J, Holstein-Rathloh N H, Kjolbye A.** Metabolic and cardiac changes in cholesterol-fructose-fed rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2010; 61: 292-296.

5. **Angelova P, Boyadjiev N, Georgieva K, Terzieva D, Atanassova P, Hrischev P.** Effects of the application of a high-fat-carbohydrate diet without additional cholesterol for the inducement of metabolic syndrome in rats. *Am Intern J Contemp Res* 2013; 3 (9): 42-50.

6. **Lopez-Legarrea P, de la Iglesia R, Abete I, Boudia-Pons I, Navas-Garretero S, Forgal L., et al.** Short-term role of the dietary total antioxidant capacity in two hypocaloric regimens on obese with metabolic syndrome symptoms: the RESMENA randomized controlled trial. *Nutr Metab (Lond)* 2013; 10 (1): 22.

7. **Fung J, Rexrode U, Mantzoros Ch, Manson J, Willett W., Hu F.** Mediterranean Diet and Incidence of and Mortality From Coronary Hearth Disease and Stroke in Women. *Circulation* 2009; 119: 1093-1100.

8. **Christov Vl, Gocheva N, Petkova M, Zacharieva S, Tankova T, Orbetzova M, et al.** A consensus of the Bulgaran 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).

9. **Popova D.** New theurapeutical strategy in the treatment of obesity and related disease with Libramed- unical plant fiber combination. Nauka Dietetika 2013; 3: 5-11 (in Bulgarian) (Попова Д. Нова терапевтична стратегия за лечение на затлъстяване и асоциирани заболявания с приложение на Libramed - уникална комбинация от растителни фибри. *Наука Диететика* 2013; 3: 5-11).

10. **Popova D.** Nemedikamentozni podhodi pri dyslipidemii. In Profilaktika, diagnostika, terapia. Aktualni problemi 2012. Eds. Vlaskovska M, Tankova Tz, Popova D, Georgiev B Sofia „Havitis" 2012; pp. 59-77 (In Bulgarian). (Попова Д. Немедикаментозни подходи при дислипидемии. В Профилактика, диагностика, терапия. *Актуални проблеми* 2012. Ред. Власкова М, Танкова Ц, Попова Д, Георгиев Б. София „Хавитис" 2012., стр. 59-77).

11. **Wu-peng X S, Chua S, Okada N, Liu S, Nicolson M. Leibel R.** Phenotype of the obese Koletsky (f) rat due ot Tyr763Stip mutation in the extracellular domain of the leptin receptor (lepr). *Diabetes* 1997; 46: 513-518.

12. **Novelli E, Diniz Y, Galhardi C, Ebaid G, Rodrigues H, Mani F, et al.** Antropometrical parametes and markers of obesity in rats. *Lab Animals* 2007; 41: 111-119.

13. **Lira FS, Rosa J, Pimentel G, Tarini V, Arida R, Fallopa F., et al.** Inflammation and adipose tissue: effects of progressive load training in rats. *Lip Health Dis* 2010; 9:109.

14. **Uebanso T, Taketani Y, Fukaya M, Sato K, Takei Y, Sato T., et al.** Hypocaloric high-protein diet improves fatty liver and hypertriglyceridemia in sucrose-fed rats via two pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009, 297: E76-E84.

15. **Yamashita A, Lira FS, Rosa J, Paulina E, Brum P, Negrao C., et al..** Depot-specific modulation of adipokine levels in rat adipose tissue by diet-indused obesity: The effect of aerobic training and energy restriction. *Cytokine* 2010, 25(3): 168-174.

16. **Galisteo M, Duarte J, Zarzuelo A.** Effect of dietary fibers on disturbances clustered in the metabolic syndrome. *J Nutr Biochem* 2008, 19: 71-84.

Съвременни препоръки за контрол на хипергликемията при захарен диабет тип 2 - 2015

Танкова, Цветалина Ив.
Клиника по Диабетология, Клиничен Център по Ендокринология, Медицински Университет, София

Current Guidelines for the Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes - 2015

Tankova, Tsvetalina Iv.
Department of Diabetology, Clinical Center of Endocrinology, Medical University, Sofia

Резюме

В клиничната практика са въведени различни групи медикаменти за лечение на захарен диабет тип 2, като периодично се разработват препоръки, които играят важна роля при избора на най-подходящите между множеството налични терапевтични средства. През 2012 г. Американската диабетна асоциация (ADA) и Европейската асоциация за изучаване на диабета (EASD) публикуват становище за контрол на хипергликемията при захарен диабет тип 2, в което е поставен акцент върху разнообразния и прогресивен ход на заболяването, специфичната роля на всеки отделен медикамент, както и факторите, свързани с пациента и болестта, които са в основата на вземането на клинични решения. С оглед появата на нови медикаменти, както и на приключили клинични проучвания през последните години, през м. януари 2015 г. ADA и EASD публикуват актуализиран вариант на становището. В него е представена системна стратегия за медикаментозна терапия при захарен диабет тип 2, в която са включени всички налични терапевтични възможности, вкл. SGLT2 инхибитори. Отбелязано е, че метформин е оптимално средство на първи избор, освен в случаите с противопоказания или непоносимост. Комбинирана терапия с добавяне на перорални или инжекционни средства е оправдана, като целта е да се сведат до минимум страничните ефекти. Обичайно при започване на инсулинова терапия се

Abstract

A number of different classes of drugs have been introduced for the treatment of type 2 diabetes and clinical guidelines have been systematically developed to guide the clinicians in the selection of the most appropriate from the available therapeutic options. The American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD) published in 2012 a statement on the management of hyperglycemia in type 2 diabetes, focusing on the variable and progressive nature of type 2 diabetes, the specific role of each drug and the patient and disease factors that drive clinical decision making. In January 2015 ADA and EASD published an updated version of the position statement which was needed because of the introduction of new drugs and the completion of a number of clinical trials during the last years. A systematic implementation strategy in type 2 diabetes treatment is presented, including all available therapeutic options, including SGLT2 inhibitors. It is pointed out that metformin is the optimal first-line drug unless there are prevalent contraindications or intolerance. Combination therapy with additional oral or injectable agents is reasonable, aiming to minimize side effects where possible. Basal insulin is usually initiated when insulin therapy is needed. When basal insulin has been titrated to an acceptable fasting blood glucose but HbA_{1c} remains above target, consider proceeding to combination injectable therapy to cover post-

предпочита включване на базален инсулин. Когато базалният инсулин е титриран до приемливо ниво на кръвна захар на гладно, но HbA_{1c} остава над прицелното ниво, трябва да се премине на комбинирана инжекционна терапия, за да се контролират постпрандиалните глюкозни екскурзии. Има две възможности – GLP-1 рецепторен агонист или прандиален инсулин – една до три инжекции бързодействащ инсулин/аналог преди хранене.

Ключови думи:

захарен диабет тип 2, препоръки, хипергликемия, гликемичен контрол

prandial glucose excursions. There are two options – either a GLP-1 receptor agonist or prandial insulin – one to three premeal injections of fast-acting insulin/analogue.

Key words:

type 2 diabetes, guidelines, hyperglycaemia, glycemic control

Захарният диабет е признат за един от най-значимите здравни проблеми в световен мащаб. Засяга 3-10% от населението в различните държави, като честотата му прогресивно нараства. По данни на Международната Диабетна Федерация (IDF) в света има 382 млн. души със захарен диабет, като се очаква до 2030 г. броят им да достигне 592 млн. (1). Около 90% от пациентите страдат от захарен диабет тип 2, като техният брой нараства драматично и добива размерите на пандемия. За съжаление, болшинството от хората с диабет са с лош гликемичен контрол, а цената на лошия контрол е висока – усложнения, които водят до инвалидизиране на пациентите, намаляват продължителността и влошават качеството им на живот. Захарен диабет тип 2 е водеща причина за сърдечно-съдови заболявания, слепота, терминална бъбречна недостатъчност, ампутации и хоспитализации. Свързан е с повишен риск от злокачествени заболявания, когнитивни нарушения, хронични чернодробни заболявания и други инвалидизиращи състояния. Установено е, че поддържането на стойности на кръвната захар максимално близки до тези на хора без диабет има благоприятен ефект върху усложненията на заболяването. Ето защо, ефективните терапевтични стратегии за от огромно значение.

През 2012 г. Американската Диабетна Асоциация (ADA) и Европейската асоциация за изучаване на диабета (EASD) публикуват становище за контрол на хипергликемията при захарен диабет тип 2 (2). Разработването му, въпреки наличните множество препоръки на различни национални и международни организации (3-7), се налага поради появата на нови медикаменти на пазара, както и поради нарастващата несигурност по отношение на правилния им избор и последователност в терапевтичния подход при захарен диабет тип 2. Препоръките на ADA и EASD се оказаха по-малко прескриптивни и не така строго алгоритмични както предшестващите, като целта им е да се постави акцент върху разнообразния и прогресивен ход на захарния диабет, специфичната роля на всеки отделен медикамент, както и факторите, свързани с пациента и болестта, които са в основата на вземането на клинични решения (2). Подчертана е необходимостта от индивидуализиране както на терапевтичните цели, така и на терапевтичните стратегии с акцент върху грижите, в центъра на които е пациентът. С оглед появата на нови медикаменти, както и на приключили клинични проучвания през последните години, през януари 2015 г. ADA и EASD публикуват актуализиран вариант на становището за контрол на хипергликемията при захарен диабет тип 2 (8).

Какви са новите моменти в становището на ADA и EASD?

Цели на гликемичен контрол

Гликемичният контрол остава основна цел в лечението на захарен диабет тип 2. Той, обаче, трябва винаги да се има предвид в рамките на цялостния мултифакторен подход за снижение на риска, включващ спиране на тютюнопушенето, възприемане на здравословен начин на живот, контрол на артериалното налягане, контрол на липидите, даващ приоритет на приложение на статини, и в някои случаи антитром-боцитна терапия. Редица проуч-

вания категорично доказаха, че снижението на хипергликемията намалява изявата и прогресията на микросъдовите усложнения (9). Ефектът на гликемичния контрол върху сърдечно-съдовите усложнения, обаче, остава несигурен; вероятно е налице по-умерена полза, но тя настъпва след много години на подобрен контрол (10). Резултатите от големи проучвания доказаха също, че прекалено агресивният контрол при възрастни пациенти с по-напреднало заболяване, няма значими ползи и дори може да е свързан с известен риск (11). Ето защо е необходим не унифициран подход за всички пациенти със захарен диабет тип 2, а индивидуален подход, който да осигури баланс между ползите от гликемичния контрол и потенциалните рискове, свързани с него, като се имат предвид страничните ефекти на медикаментите (особено хипогликемия), възрастта на пациента, съпътстващите заболявания, усложненията на диабета.

Препоръчва се прицелно ниво на HbA_{1c} под 7,0%, с възможност за по-ниско или по-високо оптимално за конкретния пациент ниво, съобразно фактори, свързани със самия пациент или заболяването.

Новото в актуализирания вариант на становището на ADA и EASD е разделянето на факторите, свързани с пациента и болестта, които оказват влияние върху терапевтичните цели за гликемичен контрол (HbA_{1c}), на потенциално модифицируеми и немодифицируеми. Към потенциално модифицируемите фактори са посочени отношението и очакваните усилия на пациента за съблюдаване на терапията, финансовите възможности и достъпът до социална подкрепа, които могат да се променят с времето. Така, клиничният екип трябва посредством обучение да насърчава пациента да се придържа към терапията, и също да се опитва да оптимизира грижите за пациента в контекста на здравното му осигуряване и финансови възможности. Други фактори, като възраст на пациента, очаквана продължителност на живота, съпътстващи заболявания, установени съдови усложнения, рискове и последици за пациента, свързани със страничните ефекти на медикаментите, са до голяма степен фиксирани и не подлежат на промяна (8).

Съвременни терапевтични възможности

През последните 3 години на пазара се появиха нови медикаменти, натрупаха се допълнителни данни за известни и използвани преди това средства за контрол на кръвната захар. Какво е новото?

Инхибитори на натриево-глюкозен ко-транспортер 2

Основна промяна в терапията на захарен диабет тип 2 през последните години е навлизането в клиничната практика на нова група медикаменти – инхибитори на натриево-глюкозен ко-транспортер 2 (SGLT2 инхибитори) (12). Тези препарати снижават HbA_{1c} средно с 0,5-1,0% в сравнение с плацебо (12). При директно сравнение в клинични проучвания с повечето известни медикаменти за лечение на захарен диабет тип 2, се оказва, че те са най-общо със сходна ефективност по отношение на начално снижение на HbA_{1c} (13,14). Механизмът им на действие включва инхибиране на SGLT2 в проксималния нефрон, с което се намалява реабсорбцията на глюкоза и се увеличава екскрецията й с урината с до 80 g/дневно (15,16). Тъй като този ефект е независим от инсулин, SGLT2 инхибиторите могат да се прилагат във всеки етап от развитието на захарен диабет тип 2, дори след значимо изчерпване на инсулиновата секреция.

Допълнителни потенциални предимства са умерената редукция на тегло – с около 2 kg и стабилизирането му след 6-12 мес., трайно снижение на систолното и диастолното артериално налягане от порядъка съответно на около 2-4 и 1-2 mmHg (12,17), както и намаляване на пикочната киселина и албуминурията (18), въпреки че клиничното значение на тези промени във времето не е установено.

Страничните ефекти на терапията с SGLT2 инхибитори включват генитални микотични инфекции, като при жени са с около 11%, а при мъже – с 4% по-чести в сравнение с плацебо (19); в някои проучвания е наблюдавано и леко увеличение на честотата на инфекциите на пикочните пътища (12,13,19). Тези медикаменти имат и диуретичен ефект, поради което при приложението им могат да се наблюдават прояви, свързани с намален кръвен обем (12,20). SGLT2 инхибиторите трябва да се прилагат с повишено внимание при възрастни и при пациенти, които са на терапия с диуретик. Може да се наблюдава обратимо леко покачване на серумното ниво на креатинин (16,20). Наблюдавана е повишена уринна екскреция на калций (21) и FDA изисква задължително проследяване на пациенти, които се лекуват с канаглифлозин, по отношение на фрактури на горни крайници след съобще-

ни случаи в краткосрочни проучвания (22). В някои проучвания е наблюдавано леко повишение на нивото на LDL холестерол (с около 5%), клиничната значимост на което не е известна.

С оглед на механизма си на действие, SGLT2 инхибиторите са по-малко ефективни при снижена гломерулна филтрация (ГФ) < 45-60 mL/min/1,73m^2; наличните понастоящем представители на тази група имат различни ограни-чения за приложение при стойности под тази граница. Липсват данни относно ефекта на SGLT2 инхибиторите върху микросъдовите усложнения на диабета (както е и с повечето други медикаменти; налични са данни само по отношение на СУП и инсулин). Ефектите на SGLT2 инхибиторите върху макросъдовите усложнения също са неизвестни, но понастоящем са в ход клинични проучвания за оценка на сърдечно-съдовата им безопасност (23).

Тиазолидиндиони

Безпокойството относно връзка на тиазолидиндионите, особено на пиоглитазон, с карцином на пикочния мехур, до голяма степен се преодоля на базата на последвали доказателства (24). Приложението на тези медикаменти може да доведе до увеличение на теглото и периферни отоци; установено е, че те повишават честотата на сърдечна недостатъчност (25). Тиазолидиндионите са свързани и с повишен риск от костни фрактури, предимно при жени. Пиоглитазон понастоящем е наличен като генеричен медикамент, което значимо намалява цената му.

DPP-4 инхибитори

Голямо проучване с DPP-4 инхибитора саксаглиптин, с продължителност малко над 2 г., не установи сърдечно-съдов риск или полза от приложението му в сравнение с плацебо (26). Наблюдавани са, обаче, по-голям брой хоспитализации по повод на сърдечна недостатъчност в групата на саксаглиптин – 3,5% спрямо 2,8% с плацебо, p=0,007 (26,27). Друг DPP-4 инхибитор, алоглиптин, в проучване с по-малка продължителност (18 месеца), също не показа повишен сърдечно-съдов риск при пациенти с висок риск (28). В ход са няколко други дългосрочни проучвания за оценка на сърдечно-съдовата безопасност на DPP-4 инхибитори, и докато не станат ясни резултатите им, тези медикаменти вероятно трябва да се прилагат с повишено внимание при пациенти със сърдечна недостатъчност. Друг проблем при тази група медикаменти, както и при другата група инкретин-базирана терапия – GLP-1 рецепторните агонисти, се оказа безопасността им по отношение на панкреаса – възможен панкреатит и панкреасна неоплазия. Препоръките за предписване на тези медикаменти съдържат предупреждения относно приложението им при лица с анамнеза за панкреатит. Това изглежда разумно, но новопоявили се данни от големи обсервационни проучвания (29), както и от 2 големи проучвания за оценка на сърдечно-съдовата безопасност на DPP-4 иинхибитори (27,28), не са установили статистически значи-мо повишена честота на панкреасно заболяване.

Най-общо, всеки медикамент за лечение на захарен диабет тип 2 трябва да осигурява ба-ланс между глюкозо-понижаваща ефективност, странични ефекти, очаквани допълнителни ползи, и други практически аспекти, като дозов режим и необходимост от мониториране нивото на глюкозата. Решенията, свързани с терапевтичния подход, трябва да се вземат съвместно с пациента по отношение както на избор на медикамент, така и на интензивност на гликемичен контрол.

Стратегия за медикаментозна терапия при захарен диабет тип 2

Начална терапия

Метформин си остава оптималното и предпочитано средство на първи избор за монотерапия при захарен диабет тип 2 с оглед на ниската си цена, доказана безопасност, неутралност по отношение на телесното тегло, възможни ползи по отношение на сърдечно-съдовата система (2, 4-8). Обичайно се назначава непосредствено или скоро след поставяне на диагноза на заболяването.

Приложението на метформин налага съобразяване с бъбречната функция. Напоследък доста се облекчи назначаването на медикамента при леко до умерено, но стабилно, хронично бъбречно заболяване (7, 30). Метформин се елиминира през бъбреците и при пациенти с бъбречна недостатъчност са описани случаи на лактацидоза. Препоръките на NICE във Великобритания, базирани на медицина на доказателствата, позволяват приложение на метформин до ГФ 30 ml/min, като се препоръчва редуциране на дозата при спадане на ГФ под 45 ml/min (7). Тези препоръки се подкрепят и от ADA и EASD (2,8).

Ако поради наличие на противопоказания или непоносимост не може да се използва

метформин, трябва да се избере друг медикамент от втора линия – сулфонилуреен препарат, тиазолизиндион, DPP-4 инхибитор, GLP-1 рецепторен агонист, SGLT2 инхибитор, като възможностите стават по-ограничени, ако причината за избягване на метформин е влошаване на бъбречната функция. В тези случаи не е разумно да се използва СУП, особено глибенкламид, поради повишен риск от хипогликемия. DPP-4 инхибиторите са предпочитано средство на избор, като при всички препарати, с изключение на линаглиптин, се налага редуциране на дозата (31).

В становището на ADA и EASD са представени медикаментите, които се използват в САЩ и Европа. Има, обаче, и други медикаменти, които се прилагат при захарен диабет тип 2. Бързодействащите секретагози (меглитиниди) могат да се използват вместо СУП при пациенти с нередовен режим на хранене, или с късна постпрандиална хипогликемия на фона на тера-пия със СУП. Алфа-глюкозидазните инхибитори могат да бъдат прилагани при определени случаи, но трябва да се имат предвид умерената им ефективност, честият прием и странични ефекти.

Преминаване към двойна и тройна комбинирана терапия

Ако само с монотерапия не се постигнат и поддържат прицелните нива на HbA_{1c} за период от около 3 мес., трябва да се добави второ перорално (сулфонилуреен препарат, тиазолидиндион, DPP-4 инхибитор, SGLT2 инхибитор) или инжекционно (GLP-1 рецепторен агонист или базален инсулин) средство (2, 4-6, 8). SGLT2 инхибиторите са одобрени като монотерапия, но те се използват основно в комбинация с метформин и/или други медикаменти (20). На базата на доказаната им ефективност и натрупан клиничен опит, те са разумна възможност като средство на втори и трети избор (32). Подобно на повечето комбинации, ефективността може да е по-малка от адитивната при комбиниране на SGLT2 инхибитори с DPP-4 инхибитори. Няма налични данни за приложение на SGLT2 инхибитори с GLP-1 рецепторни агонисти, поради което на този етап не може да се направи препоръка за тази комбинация, базирана на медицина на доказателствата.

При пациенти с висок изходен HbA_{1c} (>9,0%) е малка вероятността да се постигнат целите на гликемичен контрол с монотерапия. Ето защо, в такива случаи е оправдано започване директно с комбиниране на метформин с друг медикамент. Тъй като липсват дългосрочни сравнителни клинични проучвания относно ефективността на различните медикаменти, не могат да се дават препоръки за най-добро средство, което да се комбинира с метформин. Изборът на медикамент се базира на предпочитанията на пациента, както и на характеристиките му, заболяването и медикаментите, като целта е да се намали нивото на кръвната захар с минимални странични ефекти, особено хипогликемия. Няма, обаче, доказателства за предимства при бързо постигане на целите на гликемичен контрол в рамките на седмици и дори месеци. Ето защо, при осигуряване на стриктно наблюдение на пациента, стъпаловидният подход е разумна алтернатива, дори при пациенти с висок изходен HbA_{1c}.

Инсулинът има предимството да е ефективен, когато другите медикаменти не са, и трябва да се прилага като част от комбинирана терапия при изразена хипергликемия, особено ако пациентът има оплаквания, или са налице катаболни прояви – загуба на тегло, кетоза. При кръвна захар > 16,7-19,4 mmol/l и/или HbA_{1c} > 10-12%, трябва да се има предвид инсулинова терапия с комбинация на базален и прандиален инсулин. При преодоляване на глюкозната токсичност, режимът може да се опрости.

Комбинирана инжекционна терапия

При някои пациенти гликемичният контрол остава незадоволителен въпреки приложението на комбинация от 3 хипогликемизиращи медикамента. При дългогодишен захарен диабет се наблюдава значимо снижение на инсулиновия секреторен капацитет на панкреаса, което доминира в клиничната картина на заболяването. При всеки пациент, който не постига прицелните нива на HbA_{1c} въпреки интензивна терапия, трябва да се има предвид включване на инсулин като важен елемент в терапевтичната стратегия.

Обичайно при започване на инсулинова терапия при захарен диабет тип 2 се предпочита включване на базален инсулин, освен в случаите, когато пациентът е с изразена хипергликемия и/или клинични признаци на хипергликемия. Базалният инсулин осигурява равномерно покритие с инсулин през цялото денонощие и контролира кръвната захар предимно чрез потискане на ендогенната чернодробна глюкозна продукция между храненията и през нощта. Режимът с базален инсулин е удобен за пациента. Може да се прилага интермедиерен инсулин или дългодействащ инсулинов

аналог, като аналозите са свързани с по-нисък риск от хипогликемия през нощта и с по-малко наддаване на тегло, но са по-скъпи. Обичайно се започва с ниска дневна доза на базален инсулин – 10 IU или 0,1-0,2 IU/kg в зависимост от степента на хипергликемия. Дозата се титрираа с 2-4 IU или с 10-15% от общата доза 1-2 пъти седмично до постигане на прицелното ниво на кръвната захар на гладно. При прояви на хипогликемия дозата трябва да се редуцира с 4 IU или с 10-20%.

Обичайно се назначава в комбинация с метформин и още един неинсулинов медикамент. Болшинството от пациентите със захарен диабет тип 2, които се нуждаят от инсулин, се лекуват успешно само с базален инсулин.

Когато базалният инсулин е титриран до постигане на приемливо ниво на кръвна захар на гладно, но HbA_{1c} остава над прицелното ниво, или когато дозата му надвиши 0,5 IU/kg, трябва да се премине на комбинирана инжекционна терапия, за да се контролират постпрандиалните глюкозни екскурзии. Има две възможности – GLP-1 рецепторен агонист или прандиален инсулин – една до три инжекции бързодействащ инсулин/аналог непосредствено преди хранене.

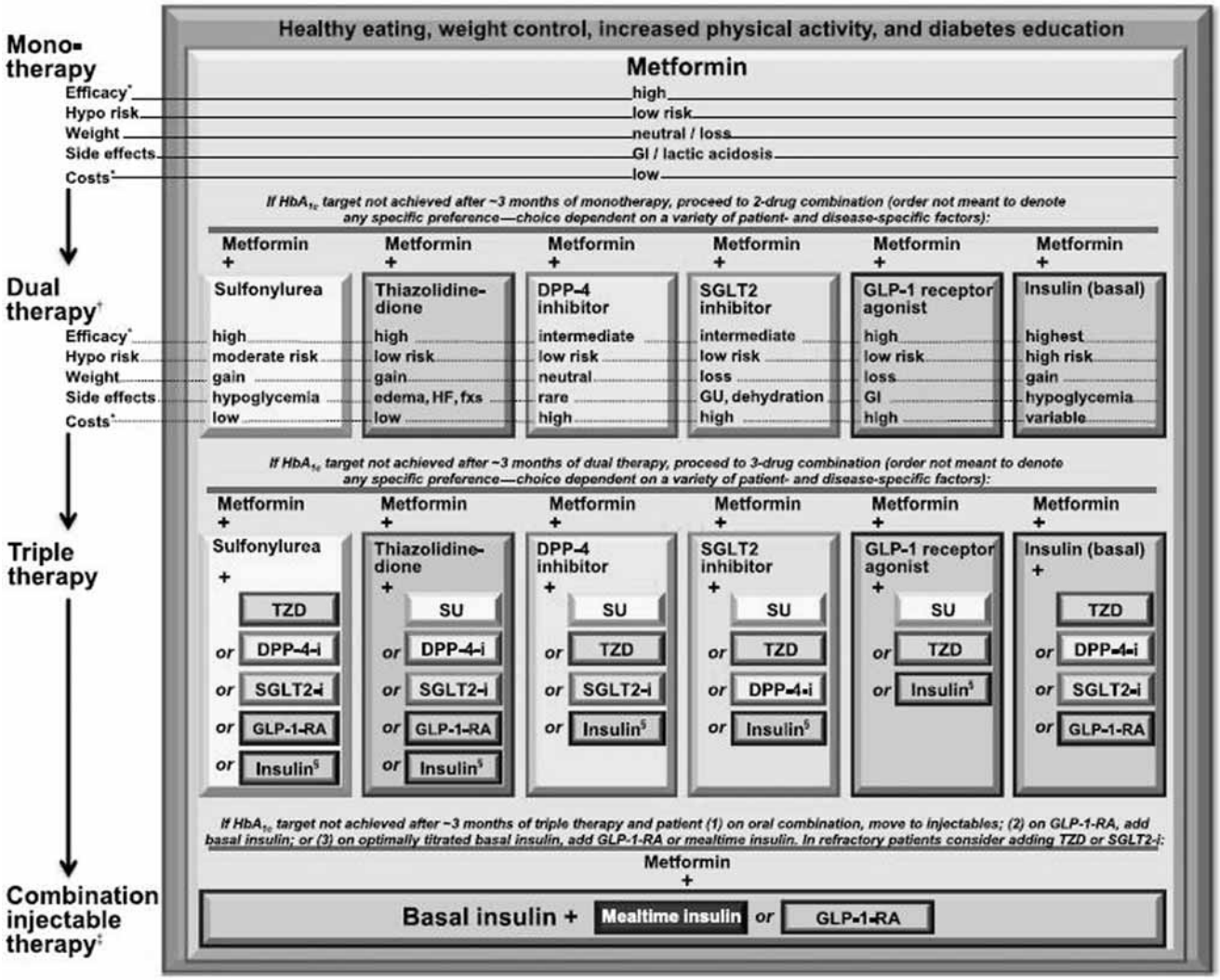
Прандиалният инсулин може да се приложи в стъпаловиден подход, при който първоначално се добавя само една инжекция прандиален инсулин преди храненето, което води до най-голямо покачване на постпрандиалната кръвна захар. Назначава се в доза 4 IU или 0,1 IU/kg или 10% от базалната доза. Дозата се титрира с 1-2 IU или 10-15% 1-2 пъти седмично до постигане на прицелните нива на кръвната захар при самоконтрол. При хипогликемия трябва да се има предвид редуциране на дозата с 2-4 IU или с 10-20%. Впоследствие може да се добави и втора инжекция преди друго хранене, свързано с по-изразено покачване на кръвната захар, а по-късно може да се има предвид и трета инжекция на бързодействащ инсулин/аналог. Друга алтернатива при подбрани пациенти е преминаването от базален инсулин на двукратни апликации на инсулинова смес, които са по-прости за употреба, но по-малко гъвкави. При преминаването може да се раздели дозата на базалния инсулин в отношение $^2/_3$ сутрин и $^1/_3$ вечер или $^1/_2$ сутрин и $^1/_2$ вечер. Дозата се титрира с 1-2 IU или 10-15% 1-2 пъти седмично до постигане на прицелните нива на кръвната захар при самоконтрол. При хипогликемия трябва да се има предвид редуциране на дозата с 2-4 IU или с 10-20%. След включването на какъвто и да е инсулинов режим, е важно титрирането на дозата както на прандиалния, така и на базалния инсулин съобразно с нивото на кръвната захар при познаване на фармакодинамичния профил на всеки препарат. Приемът на неинсулиновите медикаменти може да продължи, въпреки че СУП, DPP-4 инхибиторите и GLP-1 рецепторните агонисти обичайно се преустановяват след включване на по-сложен инсулинов режим след схемата с базален инсулин.

При трудно повлияващи се пациенти, особено при тези, които се нуждаят от покачващи се инсулинови дози, комбинирането с метформин или SGLT2 инхибитор може да помогне за подобряване на контрола и намаляване на инсулиновите нужди. Обучението относно провеждане на самоконтрол на кръвната захар, хранене и физическа активност и относно избягване на хипогликемия и поведение при хипогликемия са от изключителна важност при всеки пациент, който провежда лечение с инсулин. Човешкият бързодействащ инсулин и човешките смеси са по-евтини от бързодействащите аналози и аналоговите смеси, но фармакодинамичните им профили не им позволяват оптимален контрол на постпрандиалните глюкозни екскурзии. По-рядко използвана и по-скъпа алтернатива на интензифицираната базално-болусна инсулинова терапия при захарен диабет тип 2 е продължителната подкожна инсуинова инфузия с инсулинова помпа.

През последните години е установена ефективността на комбинирането на GLP-1 рецепторни агонисти с базален инсулин, като повечето проучвания показват еднаква или малко по-добра ефективност в сравнениие с добавянето на прандиален инсулин към базален инсулин, съпроводена със загуба на тегло и помалко хипогликемии (33). Наличните данни показват, че в тези случаи може да се използва или GLP-1 рецепторен агонист или прандиален инсулин, като първата възможност се оказва по-безопасна, поне в краткосрочен план (33, 34). Ето защо при пациенти с незадоволителен контол на терапия с базален инсулин в комбинация с едно или повече перорални средства, добавянето на GLP-1 рецепторен агонист или прандиален инсулин представлява логично развитие на терапевтичния режим, като първата възможност се оказва по-атрактивна при пациенти със затлъстяване или такива, които не могат да се справят със сложните интензифицирани инсулинови режими. Натрупват се доказателства в подкрепа на този подход (35). При пациенти, които не реагират адекватно на добавянето на GLP-1 рецепторен агонист към базален инсулин, трябва да се премине на базално-

Фигура 1. Антихипергликемична терапия при захарен диабет тип 2 – общи препоръки (8).

Figure 1. Antihyperglycemic therapy in type 2 diabetes – general recommendations (8).



Представена е потенциална последователност на антихипергликемична терапия вертикално, въпреки че е възможно и хоризонтално движение в рамките на определен етап, в зависимост от обстоятелствата. При повечето пациенти се започва с промяна в начина на живот, към който се добавя още при диагнозата или скоро след това метформин, освен в случаите с противопоказания. Ако не се постигне прицелното ниво на HbA_{1c} след 3 мес., трябва да се има предвид 1 от 6 възможности в комбинация с метформин – СУП, тиазолидиндион, DPP-4 инхибитор, SGLT2 инхибитор, GLP-1 рецепторен агонист или базален инсулин. Медикаментите са подредени според появата им в исторически план и начина на приложение, като инжекционните форми са вдясно, а най-вдясно е инсулинът. При пациенти, които не понасят или имат противопоказания за метформин, трябва да са има предвид медикамент, представен на втора линия в схемата.

болусен инсулинов режим (36).

При подбрани пациенти на този етап на заболяването добавянето на SGLT2 инхибитор може допълнително да подобри контрола и да намали нуждите от инсулин (37). Това е особено подходящо при пациенти със затлъстяване, с инсулинова резистентност и с високи дози инсулин.

Клиницистите трябва да имат предвид значителните разходи и допълнителната сложност и цена на комбинациите от глюкозопонижаващи средства. Прекалено сложните

терапевтични режими трябва да се избягват.

Невъзможността за постигане на целите на гликемичен контрол с нарастване на сложността на терапевтичния режим налага прагматична преоценка на прицелното ниво на HbA_{1c}, или, при високостепенно затлъстяване, насочване към нефармакологична интервенция, например бариатрична хирургия. Разбира се, обучението относно хранене и самоконтрол са интегрална част от всеки терапевтичен подход в хода на развитие на заболяването.

Трябва да се имат предвид пациентите с LADA (латентен автоимунен диабет при възрастни), който се установява чрез изследване на островноклетъчни антитела, като например антитела срещу GAD65, IA2, ZnT8 (38). Въпреки че е възможен контрол с перорални средства за определен период от време, тези пациенти, които обичайно, но не винаги са слаби, развиват нужда от инсулин по-бързо от тези с типичен захарен диабет тип 2 (39) и прогресивно изявяват метаболитни промени, сходни на наблюдаваните при захарен диабет тип 1. В крайна сметка, те се лекуват оптимално с интензифициран базално-болусен режим (или с инсулинова помпа).

Други съображения при избор на терапия

Оптималната терапия на захарен диабет тип 2 трябва да е съобразена с редица съпътстващи заболявания, които се срещат често, особено с напредване на възрастта - коронарна болест на сърцето, сърдечна недостатъчност, бъбречни и чернодробни заболявания, деменция, повишена склонност към хипогликемия. Трябва да се съобразява връзката на DPP-4 инхибитори със сърдечна недостатъчност, както и приложението на SGLT2 инхибитори и бъбречен статус (27). Цената също трябва да се има предвид при избора на медикаменти, и тъй като цените на новите медикаменти продължават на нарастват, клиницистите трябва винаги да се съобразяват с възможностите на пациента и да определят кога е подходящо да се назначават по-евтини, генерични препарати.

В заключение, разполагаме с разнообразни съвременни терапевтични възможности при захарен диабет тип 2, които винаги трябва да бъдат прилагани в рамките на подход, в центъра на който е пациентът. През следващите 1-3 г. ще са налични повече данни относно дългосрочните ефекти на глюкозопонижаващите медикаменти върху сърдечно-съдовата система. Информацията от тези проучвания ще помогне за оптимизиране на терапевтичните стратегии. В ход е голямо проучване в САЩ, сравняващо ефективността в дългосрочен план при приложение на множество медикаменти след монотерапия с метформин, но резултатите се очакват не по-рано от 2020 г. (40).

Книгопис

References

1. **International Diabetes Federation.** *IDF Diabetes Atlas, 6th* edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2013.

2. **Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al.** Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Patient-Centered Approach. Position Statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care* 2012; 35(6):1364-1379.

3. IDF Clinical Guidelines Task Force. *Global Guideline for Type 2 Diabetes.* Brussels, International Diabetes Federation, 2005

4. **Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Heine RJ, Holman RR, Sherwin R, et al.** Professional Practice Committee, American Diabetes Association; European Association for the Study of Diabetes. Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy. A consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia* 2006; 49(8): 1711-1721.

5. **Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, et al.** Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: a Consensus Algorithm for the Initiation and Adjustment of Therapy. Update regarding thiazolidinediones: a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 2008; 31(1): 173-175.

6. **Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, et al.** American Diabetes Association; European Association for the Study of Diabetes. Medical management of hyperglycaemia in type 2 diabetes mellitus: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the *Study of Diabetes. Diabetologia* 2009; 52(1): 17-30.

7. **NICE.** Type 2 Diabetes: The Management of Type 2 Diabetes: *NICE Clinical Guideline* 87. National Institute for Health and Clinical Excellence, 2011.

8. **Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al.** Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2015: A Patient-Centered Approach. Update to a Position Statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 2015;38:140-149.

9. **Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, et al.** Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ 2000;* 321:405-412.

10. **Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA.** 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008;359:1577-1589.

11. **Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, Goff DC Jr, Bigger JT, Buse JB, et al.** Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; 358:2545-2559.

12. **Vasilakou D, Karagiannis T, Athanasiadou E, Mainou M, Liakos A, Bekiari E, et al.** Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors for type 2 diabetes: a systematic review and metaanalysis. *Ann Intern Med* 2013;159:262-274.

13. **Schernthaner G, Gross JL, Rosenstock J, Guarisco M, Fu M, Yee J, et al.** Canagliflozin compared with sitagliptin for patients with type 2 diabetes who do not have adequate glycemic control with metformin plus sulfonylurea: a 52-week randomized trial. *Diabetes Care* 2013;36:2508-2515.

14. **Roden M, Weng J, Eilbracht J, Delafont B, Kim G, Woerle HJ, et al.** EMPAREG MONO trial investigators. Empagliflozin monotherapy with sitagliptin as an active comparator in patients with type 2 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2013; 1:208-219.

15. **Bakris GL, Fonseca VA, Sharma K, Wright EM.** Renal sodium-glucose transport: role in diabetes mellitus and potential clinical implications. *Kidney Int* 2009;75:1272-1277.

16. **Ferrannini E, Solini A.** SGLT2 inhibition in diabetes mellitus: rationale and clinical prospects. *Nat Rev Endocrinol* 2012; 8: 495-502.

17. **Rosenstock J, Seman LJ, Jelaska A, Hantel S, Pinnetti S, Hach T, et al.** Efficacy and safety of empagliflozin, a sodium glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor, as add-on to metformin in type 2 diabetes with mild hyperglycaemia. *Diabetes Obes Metab* 2013;15:1154-1160.

18. **Chino Y, Samukawa Y, Sakai S, Nakai Y, Yamaguchi J, Nakanishi T, et al.** SGLT2 inhibitor lowers serum uric acid through alteration of uric acid transport activity in renal tubule by increased glycosuria. *Biopharm Drug Dispos* 2014;35:391-404.

19. **Nyirjesy P, Sobel JD, Fung A, Mayer C, Capuano G, Ways K, et al.** Genital mycotic infections with canagliflozin, a sodium glucose co-transporter 2 inhibitor, in patients with type 2 diabetes mellitus: a pooled analysis of clinical studies. *Curr Med Res Opin* 2014; 30:1109-1119.

20. **Monami M, Nardini C, Mannucci E.** Efficacy and safety of sodium glucose co-transport-2 inhibitors in type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes Obes Metab* 2014; 16: 457-466.

21. **Weir MR, Kline I, Xie J, Edwards R, Usiskin K.** Effect of canagliflozin on serum electrolytes in patients with type 2 diabetes in relation to estimated glomerular filtration rate (eGFR). *Curr Med Res Opin* 2014; 30: 1759-1768.

22. FDA briefing document. Invokana (canagliflozin) tablets. [NDA 204042], *U.S. Food and Drug Administration,* 2013.

23. **Neal B, Perkovic V, de Zeeuw D, Mahaffey KW, Fulcher G, Stein P, et al.** Rationale, design, and baseline characteristics of the Canagliflozin Cardiovascular Assessment Study (CANVAS)-a randomized placebo-controlled trial. *Am Heart* J 2013; 166: 217-223.

24. **Wei L, MacDonald TM, Mackenzie IS.** Pioglitazone and bladder cancer: a propensity score matched cohort study. *Br J Clin Pharmacol* 2013; 75: 254-259.

25. **Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, et al.** PROactive investigators. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet* 2005; 366: 1279-1289.

26. **Scirica BM, Bhatt DL, Braunwald E, Steg PG, Davidson J, Hirshberg B, et al.** SAVOR-TIMI 53 Steering Committee and Investigators. Saxagliptin and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2013; 369: 1317-1326.

27. **Scirica BM, Braunwald E, Raz I, Cavender MA, Morrow DA, Jarolim P, et al.** SAVOR-TIMI 53 Steering Committee and Investigators. Heart failure, saxagliptin and diabetes mellitus: observations from the SAVOR – TIMI 53 randomized trial. *Circulation* 2014; 130(18): 1579-1588.

28. **White WB, Cannon CP, Heller SR, Nissen SE, Bergenstal RM, Bakris GL, et al.** EXAMINE Investigators. Alogliptin after acute coronary syndrome in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2013; 369: 1327-1335.

29. **Egan AG, Blind E, Dunder K, de Graeff PA, Hummer BT, Bourcier T, et al.** Pancreatic safety of incretin-based drugs - FDA and EMA assessment. *N Engl J Med* 2014; 370: 794-797.

30. **Nye HJ, Herrington WG.** Metformin: the safest hypoglycaemic agent in chronic kidney disease? *Nephron Clin Pract* 2011; 118: c380-c383.

31. **Groop PH, Del Prato S, Taskinen MR, Owens DR, Gong Y, Crowe S, et al.** Linagliptin treatment in subjects with type 2 diabetes with and without mild-to-moderate renal impairment. *Diabetes Obes Metab* 2014; 16: 560-568.

32. **Phung OJ, Sobieraj DM, Engel SS, Rajpathak SN.** Early combination therapy for the treatment of type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. *Diabetes Obes Metab* 2014; 16: 410-417.

33. **Eng C, Kramer CK, Zinman B, Retnakaran R.** Glucagon-like peptide-1 receptor agonist and basal insulin combination treatment for the management of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2014; 384(9961): 2228-2234.

34. **Balena R, Hensley IE, Miller S, Barnett AH.** Combination therapy with GLP-1 receptor agonists and basal insulin: a systematic review of the literature. *Diabetes Obes Metab* 2013; 15: 485-502

35. **LaneW, Weinrib S, Rappaport J, Hale C.** The effect of addition of liraglutide to high-dose intensive insulin therapy: a randomized prospective trial. *Diabetes Obes Metab* 2014; 16: 827-832.

36. **Davidson MB, Raskin P, Tanenberg RJ,Vlajnic A, Hollander P.** A stepwise approach to insulin therapy in patients with type 2 diabetes mellitus and basal insulin treatment failure. *Endocr Pract* 2011; 17: 395-403.

37. **Rosenstock J, Jelaska A, Frappin G, Salsali A, Kim G, Woerle HJ, et al.** EMPA-REG MDI Trial Investigators. Improved glucose control with weight loss, lower insulin doses, and no increased hypoglycemia with empagliflozin added to titrated multiple daily injections of insulin in obese inadequately controlled type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2014; 37: 1815-1823.

38. **Hawa MI, Buchan AP, Ola T, Wun CC, DeMicco DA, Bao W, et al.** LADA and CARDS: a prospective study of clinical outcome in established adult-onset autoimmune diabetes. *Diabetes Care* 2014; 37: 1643-1649.

39. **Zampetti S, Campagna G, Tiberti C, Songini M, Arpi ML, De Simone G, et al.** High GADA titer increases the risk of insulin requirement in LADA: a 7-years of follow-up (NIRAD Study 7). *Eur J Endocrinol* 2014; 171(6): 697-704.

40. **Nathan DM, Buse JB, Kahn SE, Krause-Steinrauf H, Larkin ME, Staten M, et al.** GRADE Study Research Group. Rationale and design of the glycemia reduction approaches in diabetes:a comparative effectiveness study (GRADE). *Diabetes Care* 2013; 36: 2254-2261.

Address for correspondence:

Проф. Д-р Цветалина Танкова

Клиника по Диабетология, Клиничен Център по Ендокринология
Ул. „Здраве“ № 2, София 1431, България
E mail: tankova@iname.com

Prof. Tsvetalina Tankova

Department of Diabetology, Clinical Center of Endocrinology
2, Zdrave str., Sofia 1431, Bulgaria
E mail: tankova@iname.com

Геренова, Жулиета Б. [1], Матеева, Веселина М.[1], Проданова, Доника И.[1], Вълканова, Грета П.[1], Митев, Митко Ат. [2], Обретенов, Евелин Д. [3]

[1] Клиника по Ендокринология и болести на обмяната
[2] Отделение по Образна диагностика
[3] Клиника по Гръдна хирургия
УМБАЛ „Проф. д-р Ст. Киркович", Медицински Факултет,
Тракийски Университет, гр. Ст. Загора

КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ №1:

Представя се случай на 67 годишен мъж, който 10-12 дни преди хоспитализация в Клиника по Ендокринология при престой в санаториум получил внезапно тремор на горни и долни крайници, придружен с мускулна слабост, загубил контрол и паднал. Не е губил съзнание. Запазен контрол на тазовите резервоари. Няколко дни по-късно по повод на подобен епизод е хоспитализиран по спешност в Неврологична клиника с работна диагноза -епилептичен статус. Приема Конвулекс 3х300мг. От проведен КАТ – данни за множество вкалцявания в мозъчния паренхим, от ЕЕГ – дифузни леки промени, без данни за пароксизмални епизоди. Проведена консултация с кардиолог и изключени ритъмнопроводни нарушения. Установени: Са – 1,55 mmol/l; P – 2,05 mmol/l; TSH – 1,62 mIU/ml; FT_4 – 15,06 pg/ml. В миналото имал епизоди на тръпнене по крайниците, на които не отдавал значение. Преживяна фрактура на VII и VIII ребро.

Придружаващи заболявания: Хипертонична болест II-ри стадий, умерена степен, кардиална форма; лечение: Тарка 1т сутрин. ХОББ – установена преди 1 $^1/_2$ г., провежда инхалаторно лечение при нужда - Симбикорт 2х1инх.

Минали заболявания: Хепатит „А". Фамилна обремененост: отрича ендокринни заболявания.
По време на стационарното пролежаване е установена видима възраст, отговаряща на действителната, незадоволително общо състояние. Пациентът е брадипсихичен, брадимимичен с положителни симптоми на Хвостек и Трусо.

Лабораторни изследвания: общ Са – 1,90; 1,95; 1,88 mmol/l (норма 2,20-2.60 mmol/l); йонизиран Са – 0,88; 0,98 mmol/l l (норма 1,1-1,3 mmol/l); Mg – 0,46; 0,66; 0,51 mmol/l (норма 0,73-1,06 mmol/l); P – 1,68; 1,50 mmol/l (норма 0,80-1,45 mmol/l); общ белтък 65 g/l (норма 60-80 g/l); албумин 42 g/l (норма 38-51 g/l); PTH – 8,61 pg/ml (норма 15-65 pg/ml). Урина: диуреза 2000 мл; Са – 1,01 mmol/l (норма 2,12-2,62 mmol/l); P – 6,60 mmol/l (норма 0,81-1,62 mmol/l).

Инструментални изследвания:

ЕКГ – синусов ритъм, ляв патологичен тип, левокамерна хипертрофия
Абдоминална ехография – Черен дроб - 0,5мм, увеличен, с нормоехогенен паренхим, хомогенна структура.

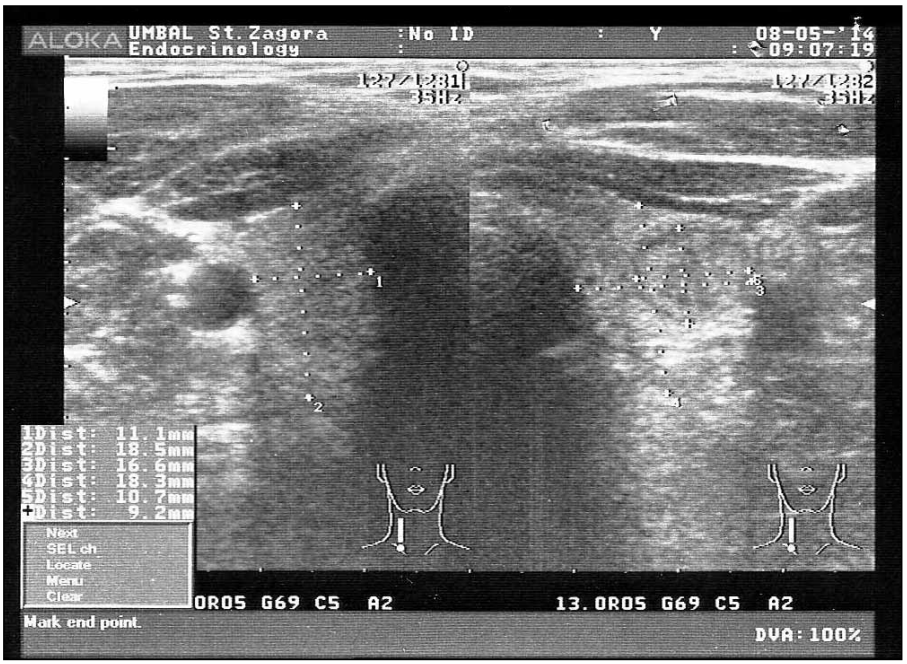
Ехография на щитовидна жлеза (Фиг.1): Щитовидна жлеза с нормална топика и форма, резки контури и дифузна хомогенна нормоехогенна структура. Десен лоб 11,1/18,5мм (напречен срез). Ляв лоб 16,6/18,3мм (напречен срез), срединно наличие на солидно образувание с изоехогенна, нехомогенна структура, симптом на „ореола", периферна васкуларизация и размерири 10,7/9,6мм. Ехографски данни за аденом в левия лоб на щитовидна жлеза.

КТ на главен мозък - нативно (Фиг. 2, Фиг. 3) Субарахноидните пространства по конвекситета са леко разширени. Двустранно симетрично наличиие на неправилни калцификати в областта на базални ядра, таламус, нуклеус каудатус, нуклеус лентиформис, нуклеус дентале и субкортикална бяла материя. Селарни и параселарни структури – в норма.

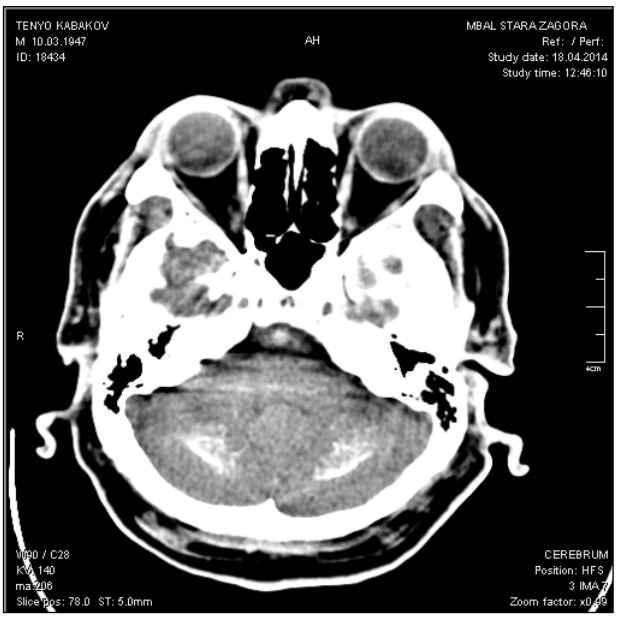
Консултативни прегледи :

Консултация с офталмолог: OD хиперматурна катаракта.
Консултация с дерматолог: Дерматитис себороидес.
Консултация с невролог: Касае се за пациент със симптоматична епилепсия, хоспитализиран за уточняване на ендокринологично заболяване.

Фигура 1. Ехография на щитовидната жлеза.



Фигура 2. **КТ на главен мозък** – *нативно.*



Фигура 3. **КТ на главен мозък** – *нативно.*

КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ №2:

Представя се случай на 60 годишен мъж, който през м. декември 2013 г. по време на сън прави припадък с характеристика на Гранд мал със загуба на съзнание, тонично-клоничен гърч и изпускане на тазовите резервоари. Приет е в общинска болница, поставена е диагноза Епилепсия и е изписан с противогърчова терапия, но въпреки лечението гърчовете зачестили. При извършен КАТ на главен мозък визуализирани калцификати на базални ганглии. От 2-3 години има схващане на устата, долни и горни крайници тип „акушерска ръка“, скованост, тремор и хипокинетична походка. Поставена диагноза Паркинсонова болест и препоръчано лечение. Поддържа нормално артериално налягане. Съобщава за периодично стягане в областта на гърдите и наличие на окологлезенни отоци.

Минали заболявания: Преживян исхемичен мозъчен инсулт през 2006 г.

Фамилна обремененост: Леля с „епилепсия“, майка оперирана за „гуша“. Оценката на обективното състояние установява синдром на Хвостек (-), синдром на Трусо (-/+), синдром на Шлезингер (-). Черен дроб – на 2-3 см под ребрена дъга, слезка – неувеличена. Сукусио реналис – двустранно отрицателно. Крайници – отоци около глезените, силно отслабени до липсващи периферни артериални пулсации.

Лабораторни изследвания: *общ белтък* – 53; 54,3 g/l; *албумин* – 28,4 g/l; *общ Ca* – 1,08; 1,12; 1,87 mmol/l (норма 2,20-2,60 mmol/l); *йонизиран Ca* – 0,54; 0,45; 0,56 mmol/l (норма 1,1-1,30 mmol/l); P –2,28; 2,07; 1,99 mmol/l (норма 0,80-1,45 mmol/l); *Mg* – 0,44; 0,53 (норма 0,73-1,06 mmol/l);
PTH 5,18 pg/ml (норма 15-65 pg/ml); TSH – 3,11 mIU/ml (норма 0,27-4,20 mIU/ml);
IgA – 2,93 g/l (норма 0,4-4,5 g/l); IgM – 0,64 g/l (норма 0,3-2,8 g/l);
IgG – 8,50 g/l (норма 6,0-16,0 g/l); *C3 комплемент* – 1,21 g/l (норма 0,8-1,75 g/l);
Антинуклеарни антитела (-) отр.
Урина: Ca - 0,14 mmol/l; P 32,88 mmol/l преди лечение.
Плеврален пунктат: количество – 350 ml; относително тегло – 1,005; проба на Ривалта – отрицателна; количество белтък – 26,5g/l; ед. еритроцити на поле, 96% лимфоцити; 4% сегментоядрени левкоцити; амилаза – 101 U/l; глюкоза – 6,02 mmol/l; LDH -560 U/l; Цитология: лимфоцити, мезотелни клетки.

Инструментални изследвания

ЕКГ: синусов ритъм, хоризонтална сърдечна позиция.

Ретенография на бял дроб и сърце: (Фиг. 4) Двустранни плеврални изливи. Маркиран интерлоб в дясно. Удължена левокамерна дъга.

Проба на Манту – отрицателна.

Ретенография на череп: Наблюдават се остеосклеротични промени в ламина интерна и ламина екстерна.

КТ на главен мозък – нативно (Фиг. 5 и Фиг. 6) Двустранно симетрично наличие на неправилни калцификати в областта на базални ядра, таламус, неклеус каудатус, нуклеус лентиформис, нуклеус дентале и субкортикална бяла материя. Селарни и параселарни структури – в норма.

Ехокардиография на сърце: Лекостепенна левокамерна хипертрофия. Нискостепенна митрална регургитация. Запазена систолна функция на лява камера.

Ехография на щит. жлеза: Нормална ехографска находка.

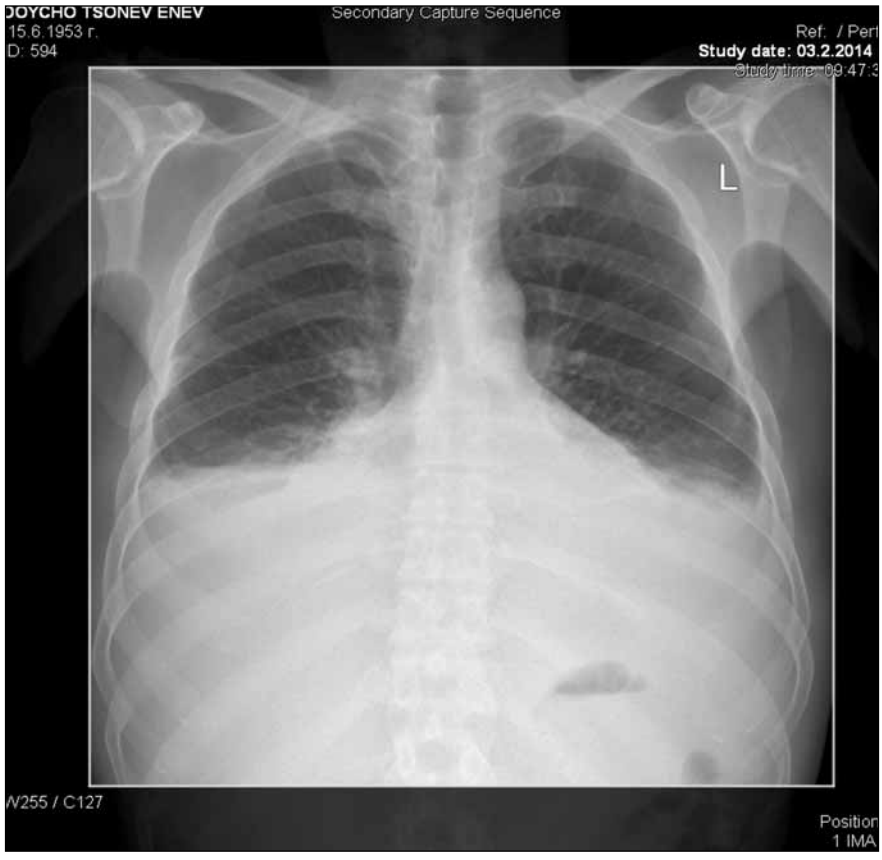
Ехография на коремни органи: липсват отклонения

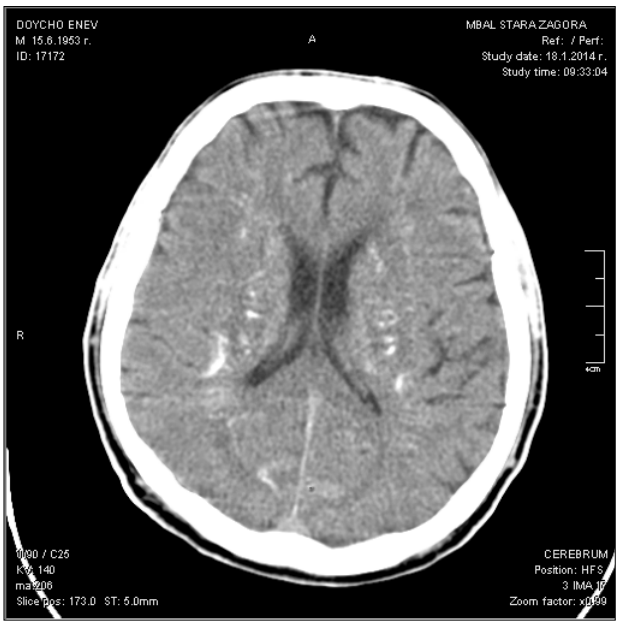
Консултативни прегледи:

Съдов хирург: Тромбозис аа. круралис. ХАНК -IIАст.

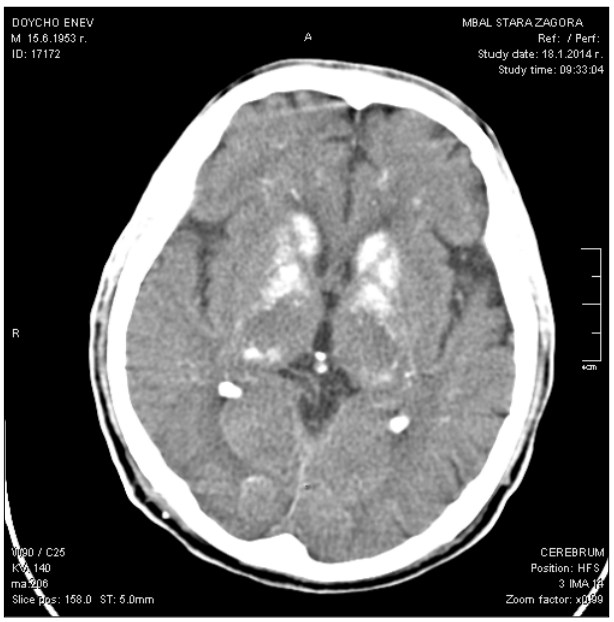
Офталмолог: Склерозис вазорум.

Фигура 4. Рентгенография на бял дроб и сърце.





Фигура 5. **КТ на главен мозък –** *нативно.*



Фигура 6. **КТ на главен мозък –** *нативно.*

Въпроси

1. Към какво най-вероятно ендокринно заболяване се насочвате при двата казуса?
2. Съществува ли връзка между неврологичния статус и лабораторните отклонения при пациентите?
3. Придружаващите сърдечни и белодробни заболявания имат ли връзка с основното заболяване?
4. Каква терапевтична схема предлагате?
5. Какви възможни усложнения могат да се наблюдават при липса на адекватно лечение?

Изпратете вашият отговор до 30. 04. 2015г. 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.**

Address for correspondence:

Проф. Д- р Жулиета Геренова, дм,

Клиника по Ендокринология/ УМБАЛ „Кирковић“
Медицински Факултет, Тракийски Университет, гр. Стара Загора
e-mail:jgerenova@abv.bg

Prof. J. Gerenova, MD, PhD,

Department of Endocrinology/UMHAT „Prof. Kirkovich“, Medical Faculty, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria
e-mail:jgerenova@abv.bg

Българско дружество по ендокринология
Bulgarian Society of Endocrinology

Списание
ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ISSN 1310-8131

Journal
ENDOCRINOLOGIA ISSN 1310-8131

Адрес на редакционната колегия:

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

Editorial Board addres 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. Оригиналните 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 информация 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 of 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.

Таблици и илюстрации

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

Книгопис

Книгописът се представя на отделна страница. Броят на цитираните източници е препоръчително да не надхвърля 25 (за обзорните статии 40) като следва да включва актуални източници от последните 5 години, както и публикации от български автори, работили по съответния проблем. 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/ PMC 3142758/). 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/ PMC 3142758/). 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 abreviated 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 off 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 Vl, Gocheva N, Petkova M, Zacharieva S, Tankova Tz, Orbetzova M, et al.** A consensus of the Bulgaran 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 оргиналните 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 Vl, Gocheva N, Petkova M, Zacharieva S, Tankova Tz, Orbetzova M, et al.** A consensus of the Bulgaran 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: Braveman 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: Braveman 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

ISSN 1310-8131

ЕНДОКРИНОЛОГИЯ
ENDOCRINOLOGIA

Списание на Българското дружество по ендокринология към СНМД в България

Journal of the Bulgarian Society of Endocrinology (BSE)

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 Scientiic and Technical Information,** *Ottava*
- **ВИНИТИ/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; Мобилен: 0887771322 (проф. Орбецова), email: morbetzova@abv.bg, Маргарита Славчева – технически секретар (mobile 0889 295884) email: mora4a2@abv.bg

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