



ISSN 1310-8131

ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ENDOCRINOLOGIA

Списанието се индексира от/The journal is indexed by:

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

Editorial Board/Редакционна колегия и съвет

Editor-in-Chief: Maria ORBETZOVA

Гл. редактор: Мария ОРБЕЦОВА

Honorary Editor-in-chief Bojan LOZANOV

Почетен главен редактор Боян ЛОЗАНОВ

Anna-Maria Borissova/

Анна-Мария Борисова

Vladimir Christov/Владимир Христов

Георги Кирилов

Dragomir Koev/Драгомир Коев

Julieta Gerenova/Жулиета Геренова

Zdravko Kamenov/Здравко Каменов

Ivan Tzinlikov/Иван Цинликов

Iliana Atanassova/Илиана Атанасова

Kalinka Koprivarova/Калинка Коприварова

Kiril Hristozov/Кирил Христозов

Lidia Koeva/Лидия Коева

Malina Petkova/Малина Петкова

Mihail Boyanov/Михаил Боянов

Roussanka Kovatcheva/Русанка Ковачева

Sabina Zacharieva/Сабина Захариева

Philip Kumanov/Филип Куманов

Tsvetalina Tankova/Цветалина Танкова

International Scientific Board/ Международен научен съвет

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

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

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

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

A. Isidori (Rome) / А. Изидори (Рим)

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

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

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

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

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

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

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

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

Българско дружество по ендокринология

Том XX / Volume XX

Bulgarian Society of Endocrinology 4/2015

Съдържание**Обзори**

- *Шинков, Александър Д.*
Тумор индуцирана хиперкалциемия 181

- *Сидерова, Мира В., Христозов, Кирил Х.*
Връзката между тиреоидита на Хашимото и тиреоидния карцином – мит или реалност? 189

Оригинални статии

- *Димова, Румяна Б., Танкова, Цветалина Ив., Кирилов, Георги Г., Чакърова, Невена Я., Грозева, Грета Г., Даковска, Лилия Н.*
Връзка между серумния васпин и сърдечно-съдовата автономна функция при еугликемични лица с и без метаболитен синдром 197

- *Димова, Румяна Б., Танкова, Цветалина Ив., Чакърова, Невена Я., Грозева, Грета Г., Даковска, Лилия Н.*
Оценка на сърдечно-съдовата автономна функция при предиабет и корелацията и с някои метаболитни и инфламаторни маркери 206

- *Еленкова, Атанаска П., Василев, Владимир В., Въндева, Силвия Ж., Димитров, Христо А., Чаръкчиев, Димитър Д., Захариева, Сабина З.*
Пациентите с пролактином са предразположени към автоимунен хипотиреоидизъм: данни от крос-секционен ретроспективно проучване в един специализиран клиничен център 222

Указания за авторите

232

Journal ENDOCRINOLOGIA volume XX, number 4, 2015**Contents****Reviews**

- *Shinkov, Alexander D.*
Hypercalcemia of Malignancy 181

- *Siderova, Mira V., Hristozov, Kiril H.*
The Association Between Hashimoto's Thyroiditis and Thyroid Cancer – Myth or Reality? 189

Original articles

- *Dimova, Romyana B., Tankova, Tsvetalina Iv., Kirilov, Georgi G., Chakarova, Nevena Y., Dakovska, Lilia N., Grozeva, Greta G.*
Serum Vaspin Relation to Cardiovascular Autonomic Function in Euglycemic Subjects With and Without Metabolic Syndrome 201

- *Dimova, Romyana B., Tankova, Tsvetalina Iv., Chakarova, Nevena Y., Grozeva, Greta G., Dakovska, Lilia N.*
Assessment of Cardiovascular Autonomic Function in Prediabetes and its Correlation with Metabolic and Inflammatory Markers 214

- *Elenkova, Atanaska P., Vasilev, Vladimir V., Vandeva, Silvia Zh., Dimitrov, Hristo A., Tcharaktchiev, Dimitar D., Zacharieva, Sabina Z.*
Patients with Prolactinomas are Predisposed to Autoimmune Hypothyroidism: Data from a Cross-sectional Retrospective Study in a Single Tertiary Centre 227

Instructions to authors

232



Тумор индуцирана хиперкалциемия

Шинков, Александър Д.

Трета Клиника по Ендокринология, Университетска Специализирана Болница за Активно Лечение по Ендокринология, Медицински университет, София

Hypercalcemia of Malignancy

Shinkov, Alexander D.

Third Clinic of Endocrinology, University Specialized Hospital for Active Treatment in Endocrinology, Medical University of Sofia

Резюме

Редица туморни заболявания могат да повлияят различни елементи от калциево-фосфорната обмяна и да предизвикат отклонения в лабораторните показатели и разнообразни клинични прояви. И докато обичайно се мисли за метастазирание в костите от солидни тумори - карциноми на бял гроб, млечна жлеза, простата, щитовидна жлеза, нарушенията в калциево-фосфорната обмяна по-често се развиват по други механизми.

Настоящият обзор разглежда специфичните патогенетични механизми, които обуславят тези нарушения. Най-честата причина за хиперкалциемия при тумори е хуморалната хиперкалциемия - активиране на остеокластната костна резорбция от секретирани от тумора фактори. Остеолитичните костни метастази при някои тумори също могат да обусловят хиперкалциемия - най-често от рак на гърдата или простатата. Мултипленият миелом предизвиква сложни промени в клетъчните взаимодействия в костта и бъбреците, които също водят до повишаване на серумните калциеви нива. Някои лимфоми индуцират усилена експресия на 1-алфа хидроксилаза и формиране на активен витамин Д (калцитриол). Състоянието наподобява ендегенна „интоксикация“ с витамин Д.

Въпреки значителното познание в тази област, сложността и разнообразието от механизми зад хиперкалциемията при злокачест-

Abstract

A number of malignant tumors affect various aspects of the mineral metabolism and cause laboratory abnormalities and clinical signs and symptoms. Though the bone metastases of breast, prostate, lung or thyroid cancer are the first to come in mind, the calcium homeostasis is more often disturbed by other mechanisms.

The review addresses the specific mechanisms in the pathogenesis of these disturbances. The most prevalent cause for hypercalcemia of malignancy is the humoral hypercalcemia - a process of activation of the bone resorption by tumor-secreted humoral factors. Osteolytic metastases might also underlie hypercalcemia - typically from breast or prostate cancer. The multiple myeloma is a disorder that induces very typical and complex changes in the bone microenvironment and in the kidneys that lead to elevation of serum calcium levels. Some lymphomas induce the expression of 1- α hydroxylase and the increased formation of the active vitamin D metabolite calcitriol. The condition in essence is equivalent to endogenous vitamin D „intoxication“.

Despite the immense accumulation of knowledge, the complexity of the mechanisms triggering hypercalcemia of malignancy still poses a serious therapeutic challenge. The current therapeutic approach to hypercalcemia of malignancy includes hydration, aggressive diure-

вени тумори все още представляват значително терапевтично предизвикателство. Съвременният терапевтичен подход включва хигратация, форсирана диуреза и потискане на остеокластна костна резорбция. Прогнозата на пациента с хиперкалциемия, обаче, остава сериозна, ако отстраняването на тумора не е възможно.

Ключови думи:

хиперкалциемия, хиперкалциемия при злокачествени заболявания, мултиплен миелом, PTHrP, 1-алфа хидроксилаза.

Въведение

Калциево-фосфорната обмяна представлява сложна система от регулаторни фактори, осигуряващи фино равновесие на движението на калция и фосфатните йони между клетките, междуклетъчното пространство и околната среда. Редица туморни заболявания могат да повлияят различни елементи от това равновесие и да предизвикат отклонения в лабораторните показатели и разнообразни клинични прояви. И докато най-често се описва метастазиране в костите от солидни тумори – карциноми на бял дроб, млечна жлеза, простата, щитовидна жлеза, нарушенията в калциево-фосфорната обмяна по-често се развиват по групи механизми. Още през 1889 г. Paget наблюдава и описва костни метастази от рак на млечната жлеза и щитовидната жлеза, както и „... увреждане на костите при рак на млечната жлеза без видимо отлагане на туморна тъкан в тях“ (1). Петдесет години по-късно Albright описва малигнена хиперкалциемия, предизвикана от фактор, подобен на паратхормона (PTH) (2). Чак през 80-те години на миналото столетие беше izolирана „виновната“ молекула – протеин, свързан с PTH (PTHrP) и синдромът наречен хуморална хиперкалциемия (3).

Днес списъкът с нарушенията на калциево-фосфорната обмяна е значително по-голям. Освен метастазиращи солидни тумори, костите могат да бъдат директно засегнати от мултиплен миелом, който води също до хиперкалциемия, но най-често по PTHrP-независим механизъм (4). По групи механизми индуцират хиперкалциемия и някои групи миело- и лимфопротиферативни заболявания. Освен това, някои тумори могат да предизвикат хипофосфатемия и остео-малакия, а в редки случаи – тумор-индуцирано

and inhibition of osteoclastic bone resorption. If no definitive cure for the cancer can be achieved however, the prognosis of the hypercalcemic patient is grave.

Key words:

hypercalcemia, hypercalcemia of malignancy, multiple myeloma, PTHrP, 1- α hydroxylase

отлагане на калциеви соли, т.е. калциноза.

Тумор-индуцираните нарушения в минералната обмяна са свързани със значителна болестност, инвалидизация, разходи за допълнително лечение и здравни грижи, и често се асоциират с лоша прогноза на основното заболяване (5, 6). Не са обект на настоящия обзор възможни нарушения в калциево-фосфорната и костната обмяна, които могат да настъпят вследствие на лечението на някои злокачествени заболявания.

Целта на настоящия обзор е да представи съвременните схващания в тази област и да разгледа диагностичните и терапевтични трудности, с които се сблъсква лекарят при грижата за тези пациенти.

Хиперкалциемия, свързана с малигнени тумори – общи характеристики

Хиперкалциемията е едно от най-честите усложнения при злокачествени заболявания и се развива по някое време в хода на болестта при 3-30% от болните. Най-често се наблюдава при пациенти с мултиплен миелом, карцином на белия дроб (най-често плоскоклетъчен), карцином на гърдата и простатата, карциноми в областта на главата и шията, бъбречноклетъчен и уротелен рак, лимфоми и по-рядко други. Появата на хиперкалциемия е лош прогностичен белег, свързан с преживяемост средно 30-90 дни след нейната изява (7). Обикновено хиперкалциемията се развива сравнително бързо и поради тази причина не е безсимптомна – изявява се с полидипсия, полиурия, констипация, гадене и повръщане, обърканост. Болните се дехидратират и промените в съзнанието могат да еволюират бързо до кома. Диагнозата на хиперкалциемията може да се затрудни поради съпътстващата симптоматика, предизвикана от напредващата

тумор. Ако е налице и хипоалбуминемия, нивата на общия калций остават в или близо до горната граница на референтния интервал и допълнително затрудняват диагнозата.

Поставянето на диагнозата хиперкалциемия, свързана с тумор, се основава на повишени калциеви нива с най-често потиснат паратхормон и анамнеза/клиника за злокачествено заболяване. Хиперкалциемията при ракови-болни трябва да се приеме като симптоматична до категорично доказване на противното. Неорганични фосфати при тези болни не винаги са информативни, тъй като нивата им зависят от точните механизми, по които настъпва хиперкалциемията. Има описани случаи, обаче, на съчетание на злокачествено заболяване и първичен хиперпаратиреоидизъм.

Описани са четири основни механизма за възникване на хиперкалциемията при малигнени заболявания (Таблица 1), но при един и същ пациент може да допринесе повече от един механизъм. Например, при значителна част от случаите на хуморална хиперкалциемия може да са налице и остеолитични костни метастази. С изключение отчасти на последния, всички те делят една обща особеност – ключова роля играе активирането на остеокластите в костта. Разликите се състоят в пътя, по който става това активиране.

поетичната стъклова клетка. В резултат от няколко стъпки на диференциация и узряване се получава зрелият остеокласт - многоядрена недеяща се клетка, чиято функция е резорбция на костта. Диференциацията на плюрипотентната костномозъчна клетка изисква последователно въздействие от макрофагеалния колони-стимулиращ фактор (M-CSF) и лиганда на рецептора на активатора на транскрипционния фактор NFκB (RANKL) (8). Разнообразни фактори, като например IL-1, IL-6, IL-11, TNF-alfa, EGF, Activin A, лиганди на RXR и други, модифицират техния ефект и допринасят за активирането на остеокластите (9, 10). Експресивна продукция на RANKL или разнообразни цитокини могат да предизвикат аберантно привличане, узряване и активиране на остеокласти извън физиологичното костно ремоделиране. Физиологично RANKL се експресира като мембранен протеин и се секретира в екстрацелуларната течност от костномозъчните стромни клетки, остеобластите и остеоцитите. Фактори, които увеличават продукцията на RANKL, са (PTH, PTHrP, IL-6, IL-11. В същото време IL-6, IL-11, TNF-alfa усилват ефекта от активирането на RANK, а в някои случаи могат да доведат до узряване на остеокласта независимо от RANK. Wnt5a се експресира от остеобластите, активира бета-катенин-независим

Таблица 1. Типове хиперкалциемия, свързана с малигнени тумори, по Steward et al. 2005 (39).

Хиперкалциемия при малигнени заболявания	Механизъм	Тип тумор
Хуморална хиперкалциемия от фактори, секретирани от солидни тумори	PTHrP	Плоскоклетъчни карциноми с различен произход, бъбречноклетъчен, овариален, ендометриален на млечна жлеза, HTLV-свързан и други лимфоми
Хиперкалциемия от локални остеолитични фактори, секретирани от туморните клетки		
От остеолитични костни метастази	Локални фактори	Млечна жлеза, простата,
От ангажиране на костния мозък	PTHrP, цитокини, хемокини	Млечна жлеза, мултиплен миелом, лимфоми
От аберантна секреция на 1,25(OH)2D (лимфоми).	1,25(OH)2D	Лимфоми

Нормалната костна обмяна изисква спрегнатата активност на остеоцити, остеокласти и остеобласти. Последната се осигурява чрез сложна междуклетъчна и хуморална регулация на клетъчната диференциация, съзряване, активиране, функция и преживяване или програмирана смърт. Остеокластът произхожда от хемато-

транскрипционен път чрез един подобен на тирозин-киназа рецептор сирак върху остеокластните прекурсори и по този начин засилва експресията на RANK на повърхността им (11).

Хуморална хиперкалциемия

Хуморалната хиперкалциемия се дължи на активиране на остеокластната костна резорбция от секретирани от тумора фактори. За първи път е описана през двадесетте години на 20 век, когато става възможно измерването на серумните нива на калция. През 1941 г. F. Albright излага хипотезата, че състоянието се дължи на PTH. В следващите десетилетия става ясно, че това не е така и през 1987 г. се изолира PTHrP от клетки от карцином на белия гроб, а в следващите години и от такъв на млечната жлеза (12, 13). Хуморална хиперкалциемия се описва при редица тумори, най-вече от епителен произход - плоскоклетъчни тумори на устна кухина, хранопровод, бял гроб, вулва, кожа, млечна жлеза, бъбрек и уротел (7). Има съобщения за продукция на PTHrP от феохромоцитом и карциноидни тумори. Единственото хематологично злокачествено заболяване, обичайно продуциращо PTHrP, е агресивният лимфом, свързан с инфекция с HTLV-1.

PTHrP представлява протеин със 70% хомоложност с PTH в N-края на полипептидната верига. Останалата част от молекулата на PTHrP е уникална за него. Въпреки различията, двата хормона свързват един и същи рецептор (PTH/PTHrP-R) и имат сходно биологично действие (1). PTHrP се експресира както от разнообразни туморни типове, така и от редица нормални клетки. Сега се знае, че хормонът играе роля за растежа на хрущяла и костите, развитието на кожата, млечната жлеза, зъбите, отпускането на гладката мускулатура на матката, пикочния мехур и съдовете. PTHrP се секретира в значителни количества от плацентата и особено от лактиращата млечна жлеза, което осигурява независимост на калциевия внос към плода и кърмата от нормалната физиологична регулация (14). Някои изследователи съобщават за PTHrP в гранулоцитите на пациенти със саркоидоза (15).

Повишени нива на PTHrP се установяват при около 80% от пациентите със свързана с малигни тумори хиперкалциемия. Освен че е причина за хиперкалциемия, хормонът участва в остеолитата при костни метастази и в регулацията на растежа на туморните клетки, и вероятно играе роля като фактор за оцеляването им (16). Подобно на PTH, PTHrP стимулира костната резорбция чрез остеобласт-медицирано активиране на системата RANKL-RANK. Лабораторното изследване доказва висок серумен калций, ниски серумни неорганични фосфати, висок уринен

цикличен аденозинмонофосфат, но нисък серумен интактен PTH. Същевременно се установяват редица разлики в биологичното действие на двата хормона, които все още не намират пълно обяснение. PTHrP нарушава спрягането на остеобластите и остеокластите с недовусмислено превалиране на костната резорбция. Причината за това не е ясна. Подозира се въздействие на други туморни фактори или на фрагменти от молекулата на PTHrP. Нивата на 1,25(OH)₂D при болните с малигна хиперкалциемия остават ниски за разлика от тези при първичен хиперпаратиреоидизъм, а инфузия с PTHrP стимулира 1-алфа хидроксилазата в бъбрека, макар и по-слабо, отколкото PTH. Вероятно ниските калцитриол се обуславя от високата калциемия, от други фактори, произхождащи от тумора или непознати страни на действието на PTHrP (17). За разлика от първичния хиперпаратиреоидизъм, при който се наблюдава метаболитна ацидоза, при хуморалната хиперкалциемия се описва метаболитна алкалоза.

Има съобщения за туморна хиперкалциемия с висок PTH. В повечето случаи се отнася за едновременно наличие на злокачествен тумор и първичен хиперпаратиреоидизъм (18). Има обаче няколко документирани случаи на същинска продукция на PTH от гребноклетъчен и плоскоклетъчен карцином на бял гроб, папиларен карцином на щитовидната жлеза, нискодиференциран невроектодермален тумор, рак на яйчника и тимом.

Хиперкалциемия от локални остеолитични фактори, секретирани от туморните клетки. Остеолитични костни лезии

Метастазирането е основно свойство на солидните злокачествени тумори. Веднъж проникнал в костта, туморът става практически нелечим. Има данни, че туморните клетки понякога остават в спящо състояние в костта с години (19). Костните метастази засягат по-често аксиалния скелет и водят до болка, фрактури и деформации, притискане на гръбначния мозък и нервни коренчета. Костта осигурява среда за развитие на тумора, предоставя резервоар от стволови клетки и клетъчни прекурсори, растежни фактори и цитокини и се намира в сложно взаимодействие с колонизиращите туморни клетки. Най-често костни метастази се откриват при рак на млечната жлеза, белия гроб, простатата, бъбрека, щитовидната жлеза и други. Доминират остеолитичните костни метастази и като усложнение на масивна остеолитиза

може да се развие хиперкалциемия. Хиперкалциемия се наблюдава най-често във връзка с костни метастази от карцином на млечната жлеза като около 10% от жените с рак на гърдата ще развият хиперкалциемия на някакъв етап от заболяването. Практически винаги хиперкалциемията при това заболяване е пропорционална на метастатичното засягане на костите.

Разрушаването на костния матрикс и оформянето на туморната метастаза изисква наличието на редица фактори. Привличат се остеокластни прекурсори посредством хемотаксис, зрелите остеокласти, заобикалящи туморната клетка, се активират и настъпва остеокластна костна резорбция. Метастазиращите в костта туморни клетки секретират разтворим вариант на фактор 1 на междуклетъчното взаимодействие (sICAM1), който провокира продукцията на специфични микро-РНК от остеокластите. Те от своя страна поддържат под формата на положителна обратна връзка остеокластогенезата (20). От резорбиращия костен матрикс се освобождават растежни фактори (TGF-beta), които подпомагат пролиферацията на тумора (21). Има данни, че клетките от рака на млечната жлеза, които метастазират в костите, секретират PTHrP. Последният играе роля на локален стимул за системата RANKL-RANK и промяна в съотношението RANKL/остеопротегерин с усилено зреење и активиране на остеокластите. Освободените от костния матрикс TGF-beta, а вероятно и IGF-1 и IGF-2 от друга страна осигуряват преживяването и стимулират експресията на IL-6, IL-11 и VEGF в туморните клетки. В резултат настъпва допълнителна, независимо от PTHrP и RANK стимулация на остеокластите и неоваскуларизация на нарастващия тумор. Освен това, метастатичните клетки експресират на мембраната си калциев рецептор (CaSR). Високата концентрация на освободения при остеолитата калций активира рецептора и осъществява положителна обратна връзка, стимулирайки транскрипцията на гена за PTHrP. Така се поддържа порочен кръг между туморните клетки и костната микросреда, осигуряващ нарастването на метастазите и прогресивно разрушаване на костта и хиперкалциемия.

Локална стимулация на остеолитата от костномозъчни фактори

Едно от заболяванията, най-често асоциирани с хиперкалциемия, е мултиплиеният миелом (ММ). Той представлява клонална неоплазма с плазмоцитен произход и е едно от най-честите хематологични малигнени заболявания. Уникална

особеност на заболяването е предизвикваната от него дифузна остеолитоза като при 80% от болните е налице тежко и прогресиращо засягане на костния скелет (4). Хиперкалциемия се наблюдава при част от болните с мултиплиен миелом, по-често при настъпване на плазмоклетъчна левкемия – генерализирана напреднала форма на заболяването. Хиперкалциемията не винаги съответства на степента на костно засягане. Доказателство за това е фактът, че при плазмоклетъчната левкемия костното засягане е по-слабо, а хиперкалциемията – по-честа, отколкото при класическия миелом (22).

За разлика от хуморалната хиперкалциемия, която почти винаги се дължи на продукцията на PTHrP, механизмите при мултиплиения миелом са по-разнообразни и все още не напълно изяснени.

При миеломно-болни с хиперкалциемия почти неизменно е налице и намалена гломерулна филтрация. Характерно за ХБЗ при миелом е едновременно увеличаване на тубулната реабсорбция на калций и намален клирънс на фосфати. На фона на увредена бъбречна функция, засиленото мобилизиране на калций от костите води до хиперкалциемия.

Миеломните клетки индуцират костна резорбция по няколко механизма. Те стимулират продукцията на RANKL от костномозъчните стромални клетки и от активирани Т-лимфоцити и същевременно потискат продукцията на остеопротегерин (OPG), т.е. нарушават съотношението RANKL/OPG и по този начин индуцират остеокластна експанзия (23). В резултат костното ремоделиране се разпръга, с активирана остеокластна диференциация и активиране, и липсващо активиране на остеобластите. Бъбречната недостатъчност допълнително повлиява това равновесие (24). Неотдавна беше описан и друг механизъм за потискане на костното изграждане – миеломните клетки секретират DKK1 – молекула, която свързва LRP5 и блокира Wnt пътя за диференциране на остеобластните прекурсори в крайни остеобласти (25). Тези данни са потвърдени от Gunn WG и сътр., които доказват по-нататък, че секретираният от миеломните клетки DKK1 едновременно с потискането на остеобластната диференциация на костномозъчните стволови клетки, стимулира продукцията на IL6 от тях. IL6 от своя страна осигурява преживяването на миеломните клетки. Загълбочавайки тези изследвания, Qiang YW и сътр. предлагат хипотезата, че по описаните механизми DKK1 е ключов фактор, осигуряващ микросредата за развитие на заболяването (26). Миеломните клетки секретират конституционално IL1 и TNF-alfa. Освен че създават подходя-

ща среда за диференциация на остеокластите, те индуцират секреция на макрофагелен инфламаторен протеин 1 (MIP-1 α) от активираните макрофаги и остеобластоподобни клетки. MIP-1 α се открива във високи концентрации в костния мозък на пациенти с ММ, като се оказва, че и самите миеломни клетки могат да го секретират. MIP-1 стимулира остеокластната диференциация и костната резорбция по RANKL/ RANK-зависим механизъм и нивата му корелират с активността на заболяването и тежестта на костното засягане (27). Освен това, MIP-1 α свързва повърхностните рецептори CCR-1 и CCR-5 върху костномозъчните стромални клетки и медира адхезията на миеломните клетки към тях (28). В резултат нараства експресията на RANKL и IL-6, което допълнително засилва остеолитичния процес.

Има съобщения, че клетките на мултиплен миелом могат в някои случаи да секретират PTHrP.

Хиперкалциемия от аберантна секреция на 1,25(OH) $_2$ D

С термина витамин Д се обозначава съвкупност от стероидни молекули, синтезирани в организма в няколко стъпки, крайният продукт от които, 1,25(OH) $_2$ D или още калцитриол, се свързва със специфичен ядрен рецептор от фамилията на стероидните рецептори и повлиява множество транскрипционни пътища (29). Основната функция на витамин Д е да стимулира чревната резорбция на калций и фосфати и да модулира костното ремоделиране. Тъй като рецептори за витамин Д се откриват в почти всички клетъчни типове, вероятно той има много по-широко биологично значение и разнообразни функции, включително модулиране на имунологичната реактивност (30, 31). Последната стъпка от синтеза на калцитриол се осъществява от 25ОН-холекалциферол-1-алфа хидроксилаза (CYP27B1) в бъбрека. Редица клетки и тъкани като лимфоцити, моноцити/макрофаги, остеобласти, кератиноцити, дебелочревни епителни клетки, простата, плацентата, млечна жлеза също експресират този ензим, което вероятно е част от локална витамин Д система с абакринно и/или паракринно значение (32).

Туморна експресия на 25ОН-холекалциферол-1-алфа хидроксилаза е описана класически при лимфопротлиферативни заболявания (33, 34).

Приблизително при половината от пациентите с хиперкалциемия и лимфоми се установява повишено ниво на 1,25(OH) $_2$ D. И докато логичното обяснение би трябвало да е свързано с масивната лимфоидна пролиферация, Hewison M и сътр.

демонстрират експресия на 1-алфа хидроксилаза в тъканните макрофаги, но не в лимфомните клетки (35). Тези данни налагат извод, че в тези случаи се отнася до паракринна регулация на тумор-активираните макрофаги.

Въпреки ясното разграничаване на няколко механизма за възникване на хиперкалциемия при злокачествени заболявания, в редица случаи е описано съчетание от няколко механизма – най-често продукция на PTHrP с остеолитично костно засягане и/или цитокин-индуцирана костна резорбция, и/или експресия на 25ОН-холекалциферол-1-алфа хидроксилаза (36, 37). Също така, един тип тумор може при различни пациенти да изяви хиперкалциемия по различни механизми. Лимфомите са типичен пример за това, както е описано по-горе.

Терапевтично поведение

Лечението на хиперкалциемията при злокачествени заболявания е все още нерешен проблем. Дефинитивното излекуване на основното заболяване е ключово, но често невъзможно. Още повече, че хиперкалциемията често е проява на авансирал тумор.

В Таблица 2 са представени най-често прилаганите средства за лечение на хиперкалциемия (38, 39). Най-общо, лечението се състои от три ключови елемента – масивно заместване на екстрацелуларния обем, форсирана диуреза след осигуряване на нормоволемиа и блокиране на остеокластната костна резорбция. Конкретният избор на средства зависи от механизма на възникване на хиперкалциемията, състоянието на болния и прогнозата по отношение на живота.

Добрата хидратация е важна при всички пациенти, тъй като хиперкалциемията индуцира функционален нефрогенен инсипиден диабет и повечето болни са дехидратирани в някаква степен. Приложението на бримкови диуретици се основава на калциуретичния им ефект. При повечето болни с хуморална хиперкалциемия може да е налице хипофосфатемия. Последната изисква включване на фосфатен препарат. За съжаление, понастоящем у нас не разполагаме с регистриран такъв.

Бифосфонатите и деносумаб повлияват калциевите нива при повечето пациенти независимо от механизма на хиперкалциемията, тъй като усилена костна резорбция – огнищна или дифузна - е налице практически винаги. Ефектът на антирезорбтивните препарати настъпва в рамките на 2-3 дни и е възможно впоследствие да се изяви хипокалциемия. Глюкокортикоидите

Таблица 2. Подходи за лечение на хиперкалциемия свързана със злокачествени заболявания (38, 39).

Подход/Медикамент	Доза/особености
Хидратация	
Физиологичен разтвор, орална хидратация	Според сърдечносъдовия статус и бъбречната функция – при всички пациенти
Форсирана диуреза	
Бримков диуретик	20-40 мг венозно при адекватна хидратация
Фосфати	
Фосфонеурол или друг препарат	Според серумните фосфатни нива. Прилагат се само за коригиране на тежка хипофосфатемия.
Препарати на първи избор	
Венозни бифосфонати	
Памидронат	60-90 мг в 8-часова инфузия
Золедронат	4 мг в 15-30-минутна инфузия
Деносумаб	120 (280) мг подкожно
Препарати на втори избор	
Глюкокортикоиди	20-60 мг орално или парентерално (виж текста)
Калцитонин	4-8 Е/кг на 12 часа подкожно или мускулно
Митрамицин	Не е регистриран в България
Галиев нитрат	Не е регистриран в България

са ефективни при цитокин-индуцираната хиперкалциемия и при тази, свързана с експресия на 1-алфа хидроксилаза, но не и при PTHrP-зависимата, т.е. тяхното приложение е най-ефективно при пациенти с мултиплен миелом или други лимфопрлиферативни заболявания. Ефектът им е по-бавен от този на антирезорбтивните.

Калцитонинът е един от най-старите хипокалциемизиращи медикаменти и все още се използва за целта. Ефектът му е бърз, но значително по-скромен от този на парентералните антирезорбтивни препарати.

При пациенти, при които изброените средства не могат да се приложат или нямат ефект, и при тези със значително намалена гломерулна филтрация, може да се пристъпи към хемодиализа с разтвор с ниско калциево съдържание.

В заключение, хиперкалциемията при злокачествени заболявания е честа, със сложна патогенеза и със значителен ефект върху общото състояние на пациентите. Нейното овладяване е трудно, а шансът за излекуване зависи от възможностите за отстраняване на първичното заболяване.

References

1. Clines, GA, Guise, TA. Hypercalcaemia of malignancy and basic research on mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic metastasis to bone. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12: 549-583.
2. Case 27461. *New England Journal of Medicine*. 1941; 225: 789-791.
3. Burtis, WJ, Wu, T, Bunch, C, Wysolmerski, JJ, Inogna, KL, Weir, EC, et al. Identification of a novel 17,000-dalton parathyroid hormone-like adenylate cyclase-stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *J Biol Chem* 1987; 262: 7151-7156.
4. Oyajobi, BO. Multiple myeloma/hypercalcemia. *Arthritis Res Ther* 2007; 9 Suppl 1: S4.
5. Carter, JA, Ji, X, Botteman, MF. Clinical, economic and humanistic burdens of skeletal-related events associated with bone metastases. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res* 2013; 13: 483-496.
6. Zhang, SJ, Hu, Y, Cao, J, Qian, HL, Jiao, SC, Liu, ZF, et al. Analysis on survival and prognostic factors for cancer patients with malignancy-associated hypercalcemia. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 14: 6715-6719.
7. Donovan, PJ, Achong, N, Griffin, K, Galligan, J, Pretorius, CJ, McLeod, DS. PTHrP-Mediated Hypercalcemia: Causes and Survival in 138 Patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100: 2024-2029.
8. Soysa, NS, Alles, N, Aoki, K, Ohya, K. Osteoclast formation and differentiation: an overview. *J Med Dent Sci* 2012; 59: 65-74.
9. Kim, JH, Jin, HM, Kim, K, Song, I, Youn, BU, Matsuo, K, et al. The mechanism of osteoclast differentiation induced by IL-1. *J Immunol* 2009; 183: 1862-1870.
10. Kudo, O, Sabokbar, A, Pocock, A, Itonaga, I, Fujikawa, Y, Athanasou, NA. Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone* 2003; 32: 1-7.

11. Maeda, K, Kobayashi, Y, Udagawa, N, Uehara, S, Ishihara, A, Mizoguchi, T, et al. Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nat Med* 2012; 18: 405-412.
12. Moseley, JM. Parathyroid hormone-related protein of humoral hypercalcemia of malignancy. *Adv Clin Chem* 1990; 28: 219-242.
13. Grill, V, Ho, P, Body, JJ, Johanson, N, Lee, SC, Kukreja, SC, et al. Parathyroid hormone-related protein: elevated levels in both humoral hypercalcemia of malignancy and hypercalcemia complicating metastatic breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73:1309-1315.
14. Sato, K. Hypercalcemia during pregnancy, puerperium, and lactation: review and a case report of hypercalcemic crisis after delivery due to excessive production of PTH-related protein (PTHrP) without malignancy (humoral hypercalcemia of pregnancy). *Endocr J* 2008; 55: 959-966.
15. Krikorian, A, Shah, S, Wasman, J. Parathyroid hormone-related protein: an unusual mechanism for hypercalcemia in sarcoidosis. *Endocr Pract* 2011; 17: e84-86.
16. Chen, HL, Demiralp, B, Schneider, A, Koh, AJ, Silve, C, Wang, CY, et al. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein exert both pro- and anti-apoptotic effects in mesenchymal cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 19374-19381.
17. Horwitz, MJ, Tedesco, MB, Sereika, SM, Hollis, BW, Garcia-Ocana, A, Stewart, AF. Direct comparison of sustained infusion of human parathyroid hormone-related protein-(1-36) [hPTHrP-(1-36)] versus hPTH-(1-34) on serum calcium, plasma 1,25-dihydroxyvitamin D concentrations, and fractional calcium excretion in healthy human volunteers. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1603-1609.
18. Gomes Lda, S, Kulak, CA, Costa, TM, Vasconcelos, EC, Carvalho, M, Borba, VZ. Association of primary hyperparathyroidism and humoral hypercalcemia of malignancy in a patient with clear cell renal carcinoma. *Arch Endocrinol Metab* 2015; 59: 84-88.
19. Luzzi, KJ, MacDonald, IC, Schmidt, EE, Kerkvliet, N, Morris, VL, Chambers, AF, et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol.* 1998; 153:865-73.
20. Waning, DL, Mohammad, KS, Guise, TA. Cancer-associated osteoclast differentiation takes a good look in the miR(NA)ror. *Cancer Cell* 2013; 24: 407-409.
21. Weilbaecher, KN, Guise, TA, McCauley, LK. Cancer to bone: a fatal attraction. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 411-425.
22. Garcia-Sanz, R, Orfao, A, Gonzalez, M, Taberner, MD, Blade, J, Moro, MJ, et al. Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood* 1999; 93: 1032-1037.
23. Giuliani, N, Bataille, R, Mancini, C, Lazzaretti, M, Barille, S. Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood* 2001; 98: 3527-3533.
24. Goranova-Marinova, V, Goranov, S, Pavlov, P, Tzvetkova, T. Serum levels of OPG, RANKL and RANKL/OPG ratio in newly-diagnosed patients with multiple myeloma. Clinical correlations. *Haematologica.* 2007; 92:1000-1001.
25. Haaber, J, Abildgaard, N, Knudsen, LM, Dahl, IM, Lodahl, M, Thomassen, M, et al. Myeloma cell expression of 10 candidate genes for osteolytic bone disease. Only overexpression of DKK1 correlates with clinical bone involvement at diagnosis. *Br J Haematol* 2008; 140: 25-35.
26. Qiang, YW, Chen, Y, Stephens, O, Brown, N, Chen, B, Epstein, J, et al. Myeloma-derived Dickkopf-1 disrupts Wnt-regulated osteoprotegerin and RANKL production by osteoblasts: a potential mechanism underlying osteolytic bone lesions in multiple myeloma. *Blood* 2008; 112: 196-207.
27. Hashimoto, T, Abe, M, Oshima, T, Shibata, H, Ozaki, S, Inoue, D, et al. Ability of myeloma cells to secrete macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta correlates with lytic bone lesions in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 2004; 125: 38-41.
28. Oba, Y, Lee, JW, Ehrlich, LA, Chung, HY, Jelinek, DF, Callander, NS, et al. MIP-1alpha utilizes both CCR1 and CCR5 to induce osteoclast formation and increase adhesion of myeloma cells to marrow stromal cells. *Exp Hematol* 2005; 33: 272-278.
29. Jones, G. Metabolism and biomarkers of vitamin D. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2012; 243: 7-13.
30. Candido, FG, Bressan, J. Vitamin D: link between osteoporosis, obesity, and diabetes? *Int J Mol Sci* 2014; 15: 6569-6591.
31. Holick, MF. Vitamin D, sunlight and cancer connection. *Anticancer Agents Med Chem* 2013; 13: 70-82.
32. Adams, JS, Hewison, M. Extrarenal expression of the 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase. *Arch Biochem Biophys* 2012; 523: 95-102.
33. Peter, SA, Cervantes, JF. Hypercalcemia associated with adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL). *J Natl Med Assoc* 1995; 87: 746-748.
34. Martos, A, Niubo, R, Novell, V, Pinyol, M. Hypercalcemia as the form of presentation of lymphoma. *Rev Clin Esp* 1992; 190: 334-335.
35. Hewison, M, Kantorovich, V, Liker, HR, Van Herle, AJ, Cohan, P, Zehnder, D, et al. Vitamin D-mediated hypercalcemia in lymphoma: evidence for hormone production by tumor-adjacent macrophages. *J Bone Miner Res* 2003; 18: 579-582.
36. Shivnani, SB, Shelton, JM, Richardson, JA, Maalouf, NM. Hypercalcemia of malignancy with simultaneous elevation in serum parathyroid hormone-related peptide and 1,25-dihydroxyvitamin D in a patient with metastatic renal cell carcinoma. *Endocr Pract* 2009; 15: 234-239.
37. Shimizu, H, Monden, T, Tomotsune, T, Nakatani, Y, Domeki, N, Matsumura, M, et al. A case of myeloma with hypercalcemia caused by high serum concentrations of both parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) and macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha). *Intern Med* 2011; 50: 2993-2996.
38. Ciccì, JD, Buie, L, Bates, J, van Deventer, H. Denosumab for the management of hypercalcemia of malignancy in patients with multiple myeloma and renal dysfunction. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2014; 14: e207-11.
39. Stewart, AF. Clinical practice. Hypercalcemia associated with cancer. *N Engl J Med* 2005; 352: 373-379.

Address for correspondence:

Д-р Александър Шинков

Трета Клиника по Ендокринология,
 Университетска Специализирана Болница
 за Активно Лечение по Ендокринология,
 МУ, София, България, ул. „Здраве“ №2, 1431,
 E-mail: shinkovs@abv.bg

Dr Alexander Shinkov

Third Clinic of Endocrinology, University
 Specialized Hospital for Active Treatment in
 Endocrinology, Medical University, Sofia,
 2 Zdrave Str, 1431 - Sofia, Bulgaria
 E-mail: shinkovs@abv.bg

Връзката между тиреоидита на Хашимото и тиреоидния карцином – мит или реалност?

Сигерова, Мира В., Христозов, Кирил Х.

Клиника по Ендокринология, Университетска Болница „Св. Марина“, Варна

The Association Between Hashimoto's Thyroiditis and Thyroid Cancer – Myth or Reality?

Siderova, Mira V., Hristozov, Kiril H.

Clinic of Endocrinology, University Hospital „St. Marina“ Varna

Резюме

Асоциацията между тиреоидита на Хашимото (ТХ) и диференцирания тиреоиден карцином (ДТК) отдавна се разглежда в литературата, но наличието на взаимовръзка между тях все още е спорен въпрос. „Съжителството“ на тези две заболявания се докладва в до 30% от случаите, предполагайки патофизиологична и причинно-следствена връзка между тях. От друга страна, наличието на съпътстващ аутоимунен тиреоидит може да е свързано с по-ниска честота на рецидиви и с по-добра прогноза на тиреоидния карцином. Диагнозата и проследяването на тези случаи са предизвикателство дори за експерти и изискват използването на широк набор от лабораторни, ултразвукови и морфологични критерии, както и индивидуален подход.

Целта на настоящия обзор е да обобщи наличните до момента доказателства за връзката между тиреоидита на Хашимото и диференцирания тиреоиден карцином с акцент върху епидемиологичните, клиничните и прогностични особености на щитовидния рак на фона на тиреоидит. Разгледани са също биологичното обяснение на връзката между ТХ и ДТК, както и биомолекуларният профил на двете заболявания.

Ключови думи:

тиреоидит на Хашимото, тиреоиден карцином, RET/PTC транслокации

Abstract

The association between Hashimoto's thyroiditis and differentiated thyroid cancer has been discussed in the literature, but the relationship is still controversial. The coexistence of these two diseases is reported in up to 30% of cases, suggesting that there might be a pathophysiological and causative link between them. On the other hand, the presence of thyroiditis may indicate a lower recurrence rate and a better prognosis of thyroid cancer. The diagnosis and follow-up in these cases may be challenging even for experts and requires a wide range of laboratory, ultrasound, and morphology criteria in addition to an individualized approach.

The aim of the present review is to summarize the available evidence for the link between Hashimoto's thyroiditis and differentiated thyroid cancer with the emphasis on epidemiology, clinical manifestation and prognostic outcome of thyroid carcinoma associated with autoimmune thyroiditis. The biological explanation of the link between HT and DTC, as well as the biomolecular profiles of the two conditions are also discussed.

Key words:

Hashimoto's thyroiditis, thyroid carcinoma, RET/PTC rearrangements

Въведение

Тиреоидитът на Хашимото (ТХ), известен още като хроничен лимфоцитарен или аутоимунен тиреоидит (АИТ) е най-честото аутоимунно щитовидно заболяване и най-честата причина за хипотиреоидизъм (1). Характеризира се с типичен ултразвуков образ и циркулиращи антители срещу тиреоидни антигени – тиреопероксидази (ТПО-АТ) и тиреоглобулинови антители (ТГ-АТ). Заболяването е описано за първи път през 1912 г. като хистологична находка от Хакару Хашимото, японски хирург и патолог (2). В световен мащаб честотата на АИТ се оценява на 1,2%-2%, а годишната заболеваемост – на 0,8 до 3,5 случая на 1000 души, като жените са засегнати 10-15 пъти по-често от мъжете, с пик във възрастта между 30 и 50 г. (3). Тиреоидните възли са много честа клинична находка с установена на базата на палпация честота между 3% и 7% от населението (4). Широкото навлизане на УЗ през последните десетилетия доведе до драматично повишаване честотата на възлестата гуша, достигнала от 20% до 76% от общата популация (3). Голяма част от тези възли са т.нар. „инциденталомии“ – открити случайно при образно изследване по друг повод. Тиреоидният карцином се открива в 5,4% до 7,7% от непалпируемите възли и тази честота е сходна с разпространението на карцинома сред палпируемите възли – 5,0-6,5% (5). Тиреоидитът на Хашимото и тиреоидните възли често „съжителстват“ заедно, което налага провеждането на тънкоиглена аспирационна биопсия (ТАБ) за диференцирането на тези две патологии. Връзката между аутоимунния тиреоидит и тиреоидния карцином отдавна е обект на научна дискусия с противоречиви резултати от големи студии, някои предполагащи положителна връзка между двете заболявания, докато други я отхвърлят.

„Съжителство“ между тиреоидита на Хашимото (ТХ) и диференцирания тиреоиден карцином (ДТК)

Едновременното наличие на ТХ и ДТК е описано за първи път от Dailey и съавт. през 1955 (6). Впоследствие множество колективни изследват връзката между двете заболявания, докладвайки честота на ко-екзистенция, варираща от 0,5% до 30% (7-12, 15, 16, 18, 19, 21, 42). Таблица 1 обобщава някои от най-големите проучвания, принадлежащи към две основни групи: ретроспективни проучвания на хистологични материали (тиреоидектомии) и проспективни цитологични студии.

Връзката между аутоимунния тиреоидит и щитовидния рак остава „гореща точка“ в тиреодологията, повдигайки разгледаните по-долу въпроси.

Кой хистологичен тип карцином се свързва с аутоимунния тиреоидит?

Установено е, че пациентите с хроничен лимфоцитарен тиреоидит имат повишен риск за развитие на папиларен тиреоиден карцином (ПТК) и тиреоиден лимфом (13,14). Lee и съавт. анализират 16 проучвания, изследващи честотата на ТХ при пациенти с ПТК, както и при пациенти с други хистологични типове като фоликуларен и медуларен карцином (13). В този мета-анализ ТХ се среща при 797 (17,1%) от 4664 пациенти с ПТК и само в 57 (7,9%) от 725 пациенти с друг тиреоиден рак (13). Едновременното наличие на ТХ и карцином е значимо по-често при ПТК в сравнение с другите хистологични типове (OR 2,432; 95% CI 1,614-3,665; P<0,001).

В проучване на Repplinger и сътр. папиларният карцином е преобладаващата малигненост и съставлява 94% от карциномите на фона на аутоимунен тиреоидит (8). Въпреки че ПТК е най-честият хистологичен тип и у пациентите без ТХ (76%), той е значимо по-чест при тези с тиреоидит (P=0,001), което предполага патогенетична връзка между двете заболявания (8).

Вoi и съавт. сравняват малигнения риск за тиреоидни възли у пациенти, които са съответно с положителни или отрицателни антители (АТА) (15). По отношение на типа на тиреоиден карцином, резултатите сочат, че при АТА негативните пациенти ПТК съставлява 81,8% от злокачествените случаи, а фоликуларният карцином – 18,2%. В групата на АТА позитивните пациенти болшинството от малигнените случаи (96,3%) са папиларни карциноми, допускателно специфична връзка между ТХ и ПТК (15).

Тиреоидният лимфом е рядко заболяване (1-5% от тиреоидните карциноми, съотв. 1-2,5% от всички лимфони) и почти винаги възниква на фона на хроничен лимфоцитарен тиреоидит. Макар че рискът от развитие на тиреоиден лимфом е 60 пъти по-голям при пациенти с ТХ в сравнение с тези без тиреоидит, еволюция на ТХ до лимфом се наблюдава в по-малко от 0,5% от случаите, често след 30-годишна давност на тиреоидита (16). В световен мащаб честотата на лимфома на щитовидната жлеза се оказва висока в регионите с по-висока честота на тиреоидит. Тиреоидният лимфом е едно хетерогенно заболяване, най-често с В-клетъчен произход, като се различават две различни в клинично и прогностично отношение подгрупи (17). С по-добра прогноза е подгрупата на мукоза-асоциираните лимфони (MALT-лимфони), съставляващи 6% до 27% от тиреоидните лимфони. MALT-лимфомите, ограничени само в щитовидната жлеза, са с отличен терапевтичен отговор на

Таблица 1. Обобщение на ретроспективни и проспективни проучвания върху честотата на ко-екзистенция на ТХ и ДТК.

Table 1. Summary of retrospective and prospective studies on the coexistence of Hashimoto Thyroiditis (HT) and differentiated thyroid carcinoma (DTC).

Първи автор/ година/книгопис First author/year/ref.	Тип проучване Study design	Материал и методи на проучването Material and methods of the study	Брой Number (n)	Съотношение жени: Мъже Female-to-male ratio	Честота на ТХ при пациентите с ДТК/ Frequency of HT in the DTC patients (%)
Kebebew, 2001 (10)	Ретроспективно/ Retrospective	Тиреоидектомии/ Thyroidectomy	136	2,32:1	30
Cipolla, 2005 (9)	Ретроспективно/ Retrospective	Тиреоидектомии/ Thyroidectomy	178	3:1	26,7
Replinger, 2008 (8)	Ретроспективно/ Retrospective	Тиреоидектомии/ Thyroidectomy	1198	3:1	29,0
Mazakopakis, 2010 (7)	Ретроспективно/ Retrospective	Тиреоидектомии/ Thyroidectomy	140	6:1	28,57
Ahn, 2011 (42)	Ретроспективно/ Retrospective	Тиреоидектомии/ Thyroidectomy	303	5,3:1	21,6
Jeong, 2012 (21)	Ретроспективно/ Retrospective	Тиреоидектомии/ Thyroidectomy	1357	6,5:1	26,5
Holm, 1985 (16)	Проспективно/ Prospective	ТАБ/ FNAB	1658	15:1	0,12
Boi, 2005 (15)	Проспективно/ Prospective	ТАБ/ FNAB	590	9,4:1	13,7
Erdogan, 2009 (18)	Проспективно/ Prospective	ТАБ/ FNAB	769	16:1	0,52
Matesa-Anic, 2009 (19)	Проспективно/ Prospective	ТАБ/ FNAB	10508	9:1	1,95

тотална тиреоидектомия или лъчетерапия в повече от 90% от случаите, поради което мнозина автори препоръчват хирургията като лечение на първи избор в тези случаи (17). За съжаление, по-голямата подгрупа, представляваща до 70% от случаите, са дифузните едроклетъчни В-лимфоми. Те се характеризират с агресивен клиничен ход, като 60% от тях се диагностицират при вече дисеминирано заболяване (17). Лечението в тези случаи включва химио- и лъчетерапия, но 5-годишната преживяемост в тази подгрупа е по-малка от 50%.

Каква е честотата на пациентите с ТХ сред тези с тиреоиден карцином?

Отговор на този въпрос дават проучванията с т. нар. архивни тиреоидектомии, които анализират хистологичните резултати при оперирани пациенти с тиреоиден рак и калкулират честотата на ТХ при тях. Голям метаанализ на

Lee, включващ 38 проучвания върху 10648 ПТК, установява хистологично доказан ТХ при 23,2% от папиларните карциноми (13). Тиреоидитът на Хашимото е по-често срещан при папиларните карциноми в сравнение с другите хистотипове карциноми, както и в сравнение с бенигните лезии (OR=2,4 и 2,8; P<0,001). Папиларните карциноми със съпътстващ тиреоидит са значимо свързани с женския пол (OR=2,7; P<0,001) и мултифокално разпространение (OR=1,5; P=0,010). От друга страна, наличието на ТХ при ПТК се асоциира с по-дълъг период без рецидив (HR=0,6; P=0,001) (13). Основното предимство на ретроспективните проучвания с архивни тиреоидектомии е, че диагнозата както на карцинома, така и на ТХ се основава на строги хистологични критерии. Съществен техен недостатък е, че не оценяват риска от развитие на ПТК при пациентите с тиреоидит, защото ТХ като повечето доброкачествени щитовидни болести е рядка индикация за оперативно лечение.

Каква е честотата на пациентите с малигнитет сред тези с тиреоидит на Хашимото?

В последните десетилетия по-голяма част от проучванията на връзката между ТХ и ДТК се базира на цитологичните данни от подложени на ТАБ пациенти и се счита се, че те по-точно отразяват типичната популация с ТХ (15, 18, 19). В скорошен обзор на Janjovic и съавт. се акцентира, че честотата на ПТК при пациентите с ТХ е значително по-ниска в цитологичните препарати в сравнение с хистологичните от тиреоидектомии (20). Средната честота на ПТК при пациентите с ТХ е 1,2% (варира от 0,0 до 2,95) в 8 студии с ТАБ на 18,023 пациента, и съответно 27,6% (варира от 9,5 до 36,6) в 8 хистологични студии с 9884 архивни тиреоидектомии (20). Релативният риск за откриване на ПТК при ТХ варира от 0,39 до 1,0 при цитологичните резултати (средно RR 0,69) в контраст с този от 1,15 до 4,16 при хистологичните студии (средно RR 1,59). Авторите заключават, че наличните досега данни са противоречиви по отношение на причинно-следствена връзка между ТХ и ПТК (20). Популационните проучвания, използващи цитологии от ТАБ, не показват повишен малигнен риск при пациентите с тиреоидит, докато хистологичните серии категорично сочат завишен риск от развитие на ПТК. Най-вероятно, и при двата вида проучвания има грешка от селекцията и затова дебатите за връзката между ТХ и ДТК продължават. Независимо от разнопосочните резултати, се препоръчва внимателно наблюдение и проследяване на пациенти с ТХ, особено при нодозните му варианти (20).

Клинични особености и прогноза при съчетание на ПТК с ТХ

Мнозина автори считат, че наличието на хроничен лимфоцитарен тиреоидит при пациенти с ПТК е свързано с различни клинично-патологични характеристики и може да повлияе прогнозата на злокачественото заболяване (13, 21-24). Основните разлики в клиничната презентация на ПТК на фона или при липсата на тиреоидит са представени в Таблица 2 и се отнасят до възраст и пол на пациентите, размер на първичния тумор, наличието на капсулна инвазия, екстра-тиреоидна инвазия и метастазиране в лимфните възли (21).

Сред пациентите с ПТК и съпътстващ ТХ превесът на женския пол е по-силно изразен в сравнение с ПТК без ТХ (96,7% спрямо 83,1%, $P < 0,0001$) (21). Към времето на оперативното

лечение пациентите с ПТК и ТХ са по-млади от тези само с ПТК (44,5 спрямо 45,9 г., $P = 0,047$). Средният размер на тумора също е по-малък при карциномите на фона на тиреоидит (17,9 спрямо 21,2 mm, $P = 0,01$) (23). Според няколко проучвания до 69% от ПТК със съпътстващ ТХ са микрокарциноми (< 1 cm), а до 77% са под 2 cm в диаметър (24, 25). Въпреки по-малките си размери, карциномите на фона на тиреоидит показват тенденция към мултифокално разпространение в щитовидната жлеза (10, 24, 26, 27). От друга страна, едновременното наличие на ТХ при ПТК се свързва с по-нисък риск от екстра-тиреоидна инвазия ($OR = 1,295$; 95% CI 1,098-1,527; $P = 0,002$) и по-рядко лимфно метастазиране ($OR = 1,287$; 95% CI 1,010-1,639; $P = 0,041$), което би могло да преопределя по-малко агресивния ход на заболяването и по-добрата прогноза в тези случаи (13).

Наличието на ТХ при ПТК значимо се асоциира с по-продължителен период без рецидив и по-ниска честота на рецидиви при 5-годишно проследяване (1,5% спрямо 5% при пациенти без ТХ, $P = 0,042$) (21). Според Dvorkin и съавт. при пациентите с ПТК и ТХ е по-малко вероятно да се наложи допълнително лечение с радиойод (23) в хода на проследяването. В противоположност, други проучвания не показват съществен благоприятен ефект на ТХ върху еволюцията на ДТК (10, 25, 28).

Какво е патолофизиологичното обяснение на връзката на ПТК с ТХ?

Патолофизиологичната връзка между лимфоцитарния тиреоидит и диференцирания тиреоиден карцином, в частност ПТК, е все още неясна, като се предлагат три хипотези: (1) ТХ предразполага и ускорява развитието на ПТК; (2) ТХ е част от имунния отговор срещу възникналия тумор – може да обясни по-добрата прогноза и по-малките размери на туморите; (3) Случайно съвпадение на двете заболявания.

Хроничните инфекции и възпалението стоят в основата на около 25% от карциномите в световен мащаб. Докато за някои злокачествени заболявания, напр. на гастро-интестиналния тракт, е установена директна връзка с хроничното възпаление, то въпросът за инфламаторна индукция на папиларния карцином на щитовидната жлеза е спорен. На молекулярно ниво връзката между хроничното възпаление и карциногенезата се крие в RET-RAS-BRAF-MAPK каскадния път, чиято активация индуцира както проинфламаторна, така и протуморна програма в тиреоидита (30). Фигура 1 илюстрира първата теория, че хроничното възпаление представлява прекаncerоза.

Местата на хронично възпаление се характеризират с богат инфилтрат от лимфоцити, плазмоцити, неутрофили и макрофаги, с продукцията на големи количества цитокини, хемокини, растежни фактори, както и с отделянето на реактивни кислородни и азотни съединения (29, 31). Последните в условията на продължаващо възпалителен процес могат да доведат до образуването на силно мутагенни агенти като пероксинитрит, който причинява точкови мутации, разкъсвания на двойноверижната ДНК и транслокации в пролифериращите клетки (29). Този феномен се свързва с повишен риск от активация на онкогени и загуба на функцията на тумор-супресорни гени, което може да доведе до неопластична трансформация на клетката (29, 32). Така, първата хипотеза предполага причинно-следствена връзка, при която активираното при ТХ възпаление създава благоприятна среда за малигнена трансформация на тиреоидния епител.

В пълна противоположност, според втората теория, лимфоцитната инфилтрация при ТХ може да представлява имунологичен отговор със забавящ ефект върху малигнения процес, допринасящ за по-добрата прогноза на ПТК на фона на тиреоидит. Наличието на интра- и перитуморна лимфоцитна инфилтрация е доказателство за реакция на имунната система срещу малигнената трансформация. Важно е разграничаването между дифузна (истински ТХ) и фокална лимфоцитна инфилтрация около тумора (24). Независимо от това разграничаване, Kebebew и сътр. намират положителна корелация между перитуморната лимфоцитна инфилтрация и дифузните промени от тиреоидита (10). Това би могло да обясни „протективния“ ефект на ТХ върху еволюцията на ПТК.

Последни проучвания показват, че по-високите серумни нива на тиреостимулиращия хормон (ТСХ) се свързват с по-висока честота на малигненост у пациенти с възлеста гуша (33, 34). Нивото на ТСХ, обаче, се повлиява от много условия, включително наличието на аутоимунен тиреоидит, чиято естествена еволюция води до отпадане функцията на жлезата. Възможната причинно-следствена връзка между ТХ и ДТК би могла да се търси с по-високите нива на ТСХ при субклиничен и явен хипотиреоидизъм при пациентите с ТХ, които стимулират клетъчната пролиферация (34).

Молекулярни изследвания

В търсене на връзката между ПТК и ТХ много изследователски екипи са проучвали биомолекулярния профил на двете състояния. Генетичната основа на възникване и прогресия на ПТК се

крие в активацията на RAS-BRAF-MAPK каскадния път (35). MAPK каскадата представлява еволюционно съхранен вътреклетъчен сигнален път, участващ в регулацията на клетъчната пролиферация, диференциация, апоптоза и клетъчно оцеляване, отговорен за множество злокачествени заболявания, включително тиреоидния рак (29). В норма, различни растежни фактори могат физиологично да стимулират тирозинкиназия мембранен рецептор RET, който активира мембранно-свързания G-протеин RAS. RAS от своя страна взаимодейства и активира протеинкиназа RAF, която има три изоформи: A-RAF, B-RAF (BRAF) and C-RAF. В тиреоидните фоликуларни клетки BRAF се явява най-силният активатор на MAPK каскадния път (35). Активираният BRAF фосфорилира и по този начин активира MEK, който на свой ред активира ЕРК. Задействаната каскада модифицира експресията на различни гени, регулиращи ключови клетъчни функции като пролиферация, диференциация и апоптоза (35). Патологична активация на целия каскаден път и съответно малигнена трансформация на тиреоидита може да се осъществи по два сценария: 1) чрез генна транслокация – по-често при радиационно индуцирания ПТК и 2) чрез точкови мутации (в BRAF и RAS гените) – по-често при спорадичния ПТК (36).

Генните транслокации *RET/PTC* представляват хромозомно преустройство, при което след разкъсване на двойноверижната ДНК настъпва сливане между 3' участъка на RET гена и 5' участъка на различни други гени. Тази структурна хромозомна мутация води до продукцията на аберантен *RET/PTC* протеин и постоянна активация на MAPK каскадния път. Идентифицирани са повече от десет различни транслокации, касаещи RET гена, като най-разпространени са *RET/PTC1* and *RET/PTC3*. Те се срещат в 20-40% от папиларните карциноми, с по-висока честота при децата и пограстващите, както и при пациенти, изложени на радиация (37).

Няколко авторски колектива установяват *RET/PTC* транслокации в не-неопластични тиреоидни лезии, като хроничния лимфоцитарен тиреоидит (38-40). Mizza и съавт. изследват и сравняват клинично-патологичните и молекулярните характеристики при 128 пациента с ПТК и съпътстващ ТХ, както и при 215 пациента с ПТК без тиреоидит (39). Двете групи не показват значими различия в клиничните и прогностичните показатели, но се различават в своята генетична основа, като *RET/PTC1* транслокацията е по-разпространена при ПТК в асоциация с тиреоидит, а *BRAF*

(V600E) точковата мутация – при ПТК без тиреоидит. Интересна находка е, че транслокацията *RET/PTC1* присъства и в 41% от не-неопластичните тиреоцити в контралатералния на тумора щитовиден дял. Силната връзка между *RET/PTC1* и автоимунния тиреоидит подсказва критичната роля на този онкопротеин в модулацията на имунния отговор (39).

Rhoden и сътр. изследват материали от ПТК и ТХ чрез два вида техника – интерфазна флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH) и чрез полимеразна верижна реакция в реално време (RT-PCR) (40). И двете методики установяват *RET/PTC* транслокация както в ПТК, така и в не-неопластичните фоликуларни клетки при ТХ. Според авторите това предполага наличието на припокриващи се молекулярни механизми в ранните стадии на туморно развитие и на възпаление в щитовидната жлеза (40). Според други, обаче, свръхчувствителните методики като RT-PCR могат да генерират много фалшиво-положителни резултати и следва да се интерпретират с внимание като се препоръчва cut-off от поне 5-10% от позитивни на мутацията клетки (37).

Най-честата от *BRAF* мутациите е точкова мутация в кодон 600, водеща до замяна на валин с глутамин в съответния протеин. Тази *BRAF(V600E)* мутация се среща в около 45% от пациентите с ПТК. Въпреки че ролята ѝ като

прогностичен фактор е спорна, скорошни проучвания показват, че пациентите с тази мутация се представят с по-агресивен ход на папиларния карцином, като екстратиреоидна инвазия и метастазирание в лимфните възли. Корейско проучване на Kim и съвт. установява, че при пациентите с ПТК и *BRAF(V600E)* мутация честотата на автоимунен тиреоидит в околния перенхим е по-ниска (41). Фактът, че при ПТК в асоциация с автоимунен тиреоидит се срещат често *RET/PTC* транслокации и по-рядко *BRAF*-активиращите точкови мутации, може да обясни по-добрата прогноза на ПТК на фона на тиреоидит.

В заключение, връзката между автоимунния тиреоидит и щитовидния рак остава спорна. Популационните проучвания, базирани на хистологични серии, показват висока честота на съпътстващ ТХ при ПТК, докато цитологичните студии не демонстрират повишен малигнен риск у пациентите с тиреоидит. При съчетанието на двете заболявания пациентите са по-често жени, в по-млада възраст, с по-малки, но мултифокални тумори, с по-благоприятна прогноза. Предполага се, че съществуват някои припокриващи се молекулярни механизми в ранните стадии на туморно развитие и възпаление, но са необходими допълнителни проучвания за доказване на причинно-следствена връзка между тях.

References

1. Pearce EN, Farwell AP, Braveman LE. Thyroiditis. *N Engl J Med* 2003; 348(26):2646-2655.
2. Hashimoto H. Zur Kenntniss der lymphomatösen Veränderung der Schilddrüse (Struma lymphomatosa). *Arch Klin Chir* 1912; 97: 219-248.
3. Vanderpump MPJ. The epidemiology of thyroid disease. *British Medical Bulletin* 2011; 99: 39-51.
4. Hegedüs L. Clinical practice. The thyroid nodule. *N Engl J Med* 2004; 351(17):1764-1771.
5. Gharib H, Papini E, Paschke R, Duick DS, Valcavi R, Hegedüs L, Vitti P. AACE/AME/ETA Medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules. *Endocr Pract* 2010; 16 (Suppl 1): 1-42.
6. Dailey ME, Lindsay S, Skahan R. Relation of thyroid neoplasms to Hashimoto disease of the thyroid gland. *AMA Arch Surg* 1955; 70(2): 291-297.
7. Mazokopakis EE, Tzortzinis AA, Dalieraki-Ott EI, Tsartsalis AN, Syros PK, Karefilakis CM, et al. Coexistence of Hashimoto's thyroiditis with papillary thyroid carcinoma. A retrospective study. *Hormones* 2010; 9(4): 312-317.
8. Replinger D, Bargren A, Zhang YW, Adler J, Haymart M, Chen H. Is Hashimoto's thyroiditis a risk factor for papillary thyroid cancer? *J Surg Res* 2008; 150(1):49-52.
9. Cipolla C, Sandonato L, Graceffa G, Fricano S, Torcivia A, Vieni S, et al. Hashimoto's thyroiditis coexistent with papillary thyroid carcinoma. *Am Surg* 2005; 71(10): 874-878.
10. Kebebew E, Treseler PA, Ituarte PH, Clark OH. Coexisting chronic lymphocytic thyroiditis and papillary thyroid cancer revisited. *World J Surg* 2001; 25(5): 632-637.
11. Konturek A, Barczyński M, Wierchowski W, Stopa M, Nowak W. Coexistence of papillary thyroid cancer with Hashimoto thyroiditis. *Langenbecks Arch Surg* 2013; 398(3): 389-394.
12. Singh B, Shaha AR, Trivedi H, Carew JF, Poluri A, Shah JP. Coexistent Hashimoto's thyroiditis with papillary thyroid carcinoma: impact on presentation, management, and outcome. *Surgery* 1999; 126(6): 1070-1076; discussion 1076-1077.
13. Lee JH, Kim Y, Choi JW, Kim YS. The association between papillary thyroid carcinoma and histologically proven Hashimoto's thyroiditis: a meta-analysis. *Eur J Endocrinol* 2013; 168 (3): 343-349.
14. Moshynska OV, Saxena A. Clonal relationship between Hashimoto thyroiditis and thyroid lymphoma. *J Clin Pathol* 2008; 61(4): 438-444.
15. Boi F, Lai ML, Marziani B, Minerba L, Faa G, Mariotti S. High prevalence of suspicious cytology in thyroid nodules associated with positive thyroid autoantibodies. *European Journal of Endocrinology* 2005; 153 (5) 637-642.

16. Holm L-E, Blomgren H, Lowhagen T. Cancer risks in patients with chronic lymphocytic thyroiditis. *N Engl J Med* 1985; 312(10): 601-604.
17. Widder S, Pasiaka JL. Primary thyroid lymphoma. *Curr Treat Options Oncol* 2004; 5(4): 307-313.
18. Erdogan M, Erdem N, Cetinkalp S, Ozgen AG, Saygili F, Yilmaz C, et al. Demographic, clinical, laboratory, ultrasonographic, and cytological features of patients with Hashimoto's thyroiditis: a result of a university hospital of 769 patients in Turkey. *Endocrine* 2009; 36(3):486-490.
19. Matesa-Anic' D, Matesa N, Dabelic' N, Kusic' Z. Coexistence of papillary carcinoma and Hashimoto's thyroiditis. *Acta Clin Croat* 2009; 48(1): 9-12.
20. Jankovic B, Le KT, Hershman JM. Clinical Review: Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid carcinoma: is there a correlation? *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(2): 474-482.
21. Jeong JS, Kim HK, Lee CR, Park S, Park JH, Kang SW, et al. Coexistence of Chronic Lymphocytic Thyroiditis with Papillary Thyroid Carcinoma: Clinical Manifestation and Prognostic Outcome. *J Korean Med Sci* 2012; 27(8): 883-889.
22. Hershman JM. Patients with Differentiated Thyroid Cancer and Coexistent Hashimoto's Thyroiditis Have a Better Prognosis Than Those without Thyroiditis. *Clin Thyroidol* 2013; 25(10): 225-226.
23. Dvorkin S, Robenshtok E, Hirsch D, Strenov Y, Shimon I, Benbassat CA. Differentiated thyroid cancer is associated with less aggressive disease and better outcome in patients with coexisting Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(6):2409-2414.
24. Hristozov KH, Siderova MV, Krasnaliev IJ, Nenkov R, Radev R. Is there a difference in tumor size and number of foci in Hashimoto's associated thyroid cancer? *Eur Thyroid J* 2012; 1(suppl 1): 145.
25. Zhang Y, Ma XP, Deng FS, et al. The effect of chronic lymphocytic thyroiditis on patients with thyroid cancer. *World J Surg Oncol* 2014; 12(1): 277; doi:10.1186/1477-7819-12-277
26. Kim KW, Park YJ, Kim EH, Park SY, Park do J, Ahn SH, et al. Elevated risk of papillary thyroid cancer in Korean patients with Hashimoto's thyroiditis. *Head & Neck* 2011; 33(5): 691-695.
27. Consorti F, Loponte M, Milazzo F, Potasso L, Antonaci A. Risk of malignancy from thyroid nodular disease as an element of clinical management of patients with Hashimoto's thyroiditis. *European Surgical Research* 2010; 45(3-4): 333-337.
28. Kim HG, Kim EK, Han KH, Kim H, Kwak JY. Pathologic Spectrum of Lymphocytic Infiltration and Recurrence of Papillary Thyroid Carcinoma. *Yonsei Med J* 2014; 55(4):879-885.
29. Bozec A, Lassalle S, Hofman V, Ilie M, Santini J, Hofman P. The Thyroid Gland: A Crossroad in Inflammation-Induced Carcinoma? An Ongoing Debate with New Therapeutic Potential. *Current Medicinal Chemistry* 2010; 17(30):3449-3461.
30. Russell JP, Engiles JB, Rothstein JL. Proinflammatory mediators and genetic background in oncogene mediated tumor progression. *J Immunol* 2004; 172(7): 4059-4067, doi: 10.4049/jimmunol.172.7.4059.
31. Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer* 2007; 121(11): 2373-2380.
32. Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res* 2006; 4(4): 221-233.
33. Boelaert K, Horacek J, Holder RL, Watkinson JC, Sheppard MC, Franklyn JA. Serum thyrotropin concentration as a novel predictor of malignancy in thyroid nodules investigated by fine-needle aspiration. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(11):4295-4301.
34. Fiore E, Vitti P. Serum TSH and risk of papillary thyroid cancer in nodular thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(4):1134-1145.
35. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev* 2007; 28(7): 742-762.
36. Kovacheva R, Baltadjieva D. BRAF^{T1796A} point mutations in thyroid tumors - a new diagnostic and prognostic perspective for papillary thyroid cancer. *Endocrinologia* 2005, 10(4): 183-189 (in Bulgarian) (Ковачева Р, Балтаджиева Д. BRAF^{T1796A} мутация при тиреоидните тумори - нова перспектива за диагноза и прогноза на папиларния тиреоиден карцином. *Ендокринология* 2005, 10(4): 183-189).
37. Nikiforov Y. RET/PTC rearrangement - a link between Hashimoto's thyroiditis and thyroid cancer...or not. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(6): 2040-2042.
38. Wirtschafter A, Schmidt R, Rosen D, Kundu N, Santoro M, Fusco A, et al. Expression of the RET/PTC fusion gene as a marker of papillary carcinoma in Hashimoto's thyroiditis. *Laryngoscope* 1997; 107(1): 95-100.
39. Muza M, Degl'Innocenti D, Colombo C, Perrino M, Ravasi E, Rossi S, Cirello V. The tight relationship between papillary thyroid cancer, autoimmunity and inflammation: clinical and molecular studies. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010; 72(5): 702-708.
40. Rhoden KJ, Unger K, Salvatore G, Yilmaz Y, Vovk V, Chiappetta G, et al. RET/papillary thyroid cancer rearrangement in nonneoplastic thyrocytes: follicular cells of Hashimoto's thyroiditis share low-level recombination events with a subset of papillary carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(6): 2414 -2423.
41. Kim SK, Song KH, Limet SD, Lim YC, Yoo YB, Kim JS, Hwang TS. Clinical and pathological features and the BRAF^{V600E} mutation in patients with papillary thyroid carcinoma with and without concurrent Hashimoto thyroiditis. *Thyroid* 2009; 19(2): 137-141.
42. Ahn D, Heo SJ, Park JH, Kim JH, Sohn JH, Park JY, et al. Clinical relationship between Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid cancer. *Acta Oncol* 2011; 50(8): 1228-1234.

Address for correspondence:

Д-р Мира Сигерова

Клиника по Ендокринология
МБАЛ „Св. Марина“ Варна
Бул. „Хр. Смирненски“ 1, 9010 Варна
Тел. 0035952/978334
e-mail: mirasiderova@abv.bg

Dr. Mira Siderova

Clinic of Endocrinology
University Hospital „St. Marina“ Varna
9010 Varna, bul. Hr. Smirnenski 1
Tel. 0035952/978334
e-mail: mirasiderova@abv.bg

Връзка между серумния васпин и сърдечно-съдовата автономна функция при еугликемични лица с и без метаболически синдром

Димова, Румяна Б.¹, Танкова, Цветалина Ив.¹, Кирилов, Георги Г.², Чакърба, Невена Я.¹, Грозева, Грета Г.¹, Даковска, Лилия Н.¹

¹ Клиника по Диабетология, Клиничен Център по Ендокринология, Медицински Университет, София

² Лаборатория по Радиоимунология, Клиничен Център по Ендокринология, Медицински Университет, София

Адрес за кореспонденция:

Д-р Румяна Димова

Клиника по Диабетология,
Клиничен Център по Ендокринология
ул. Здраве № 2, София 1431, България
e-mail: dr.roumyana.dimova@gmail.com

Резюме

Цел: Настоящото изследване има за цел да оцени връзката между нивата на серумния васпин и параметрите, характеризиращи автономния тонус, при лица с нормален глюкозен толеранс (НМГТ) с и без данни за метаболически синдром (МС).

Материали и методи: 74 еугликемични лица (30 мъже и 44 жени), на средна възраст $44,4 \pm 13,7$ г. и среден ИТМ $29,0 \pm 6,5$ кг/м², разделени в 2 групи според наличието на МС, са включени в настоящото срезово изследване. Глюкозният толеранс е оценен посредством ОГТТ, според критериите на СЗО от 2006 г. Измерени са антропометрични параметри, артериално налягане, серумни липиди и серумен васпин. МС е дефиниран според критериите на Международната Диабетна Федерация от 2005 г. Сърдечно-съдовата автономна функция е оценена чрез методиката ANX-3.0.

Резултати: Не се установява разлика в нивата на серумния васпин между групите според наличието на МС. Васпин корелира негативно със симпатиковата и парасимпатиковата активност в цялата кохорта и само с парасимпатиковия тонус при липса на МС.

Заключение: Наличието на МС не повлиява серумните нива на васпин при нормогликемия. Васпин корелира негативно с показателите на автономния тонус при НМГТ.

Ключови думи: васпин, нормален глюкозен толеранс, сърдечно-съдова автономна функция

Въведение

Васпин е серин протеазен инхибитор, синтезиран от висцералната мастна тъкан, притежаващ инсулин очувствителни ефекти, открит във висцералната мастна тъкан на Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty плъхове, животински модел, характеризиращ се с централно затлъстяване и захарен диабет тип 2 (ЗД тип 2) (1). Тъй като декомпенсираният захарен диабет и редукцията на телно понижават експресията на васпин, докато приложението на инсулинови очувствителни

ли нормализира неговата експресия и серумна концентрация, както и приложението на рекомбинантен васпин при животински модел диетирандуцирани мишки със затлъстяване сигнификантно подобрява техния глюкозен толеранс и инсулинова чувствителност, се приема, че васпин служи като инсулинов очувствител и притежава противовъзпалително действие, активира се в отговор на намалена инсулинова чувствителност (1, 2).

Мета-анализ, обхващащ 6 проучвания, включващи 1826 лица със затлъстяване и 11 проучва-

ния, включващи 1570 лица със ЗД тип 2, представя доказателства за по-високи нива на васпин при наличие на затлъстяване и подчертава неговата ключова роля в прогресията на метаболитните отклонения (3).

Резултатите от голям брой проучвания при различни етнически групи предполагат многофакторна обусловеност на сърдечно-съдовата автономна дисфункция (САД) (4, 5), включително централно затлъстяване (6), тъй като висцералната мастна тъкан се приема за ендокринен орган, синтезиращ и секретиращ редица адипокени.

Тъй като ролята на васпин за развитието на метаболитен синдром (МС) не е напълно изяснена и влиянието на васпин върху автономната функция все още е слабо проучено, целта на настоящото проучване е да изследва серумните нива на васпин при лица с нормален глюкозен толеранс (НмГТ) с и без данни за МС, и да оцени връзката на нивата на серумния васпин и сърдечно-съдовата автономна функция в тази кохорта.

Материали и методи

Общо 74 лица с НмГТ – 30 мъже и 44 жени, средна възраст $44,4 \pm 13,7$ г., среден ИТМ $29,0 \pm 6,5$ kg/m^2 са включени в настоящото срезово изследване. Те са разделени на 2 групи според наличието на МС. Основните характеристики на групите са представени в Таблица 1.

Участниците са набрани в Клиника по Диабетология, Клиничен Център по Ендокринология, Медицински Университет, София в рамките на скринингова програма за захарен диабет.

Всички участници в изследването са подписали информирано съгласие и са запознати с целите, методите и рисковете при вземане на участие в изследването съгласно Декларацията от Хелзинки и съобразно правилата за Добра Клинична Практика, като проучването е одобрено от Етичната комисия на Медицински Университет, София.

Измерени са антропометрични показатели – ръст, тегло и обиколка на талия, и е изчислен ИТМ. Глюкозният толеранс е оценен посредством стандартен орален глюкозо-толерансен тест и е определен според критериите на СЗО от 2006 г. При всички участници на гладно са изследвани: липиден профил (общ холестерол, HDL холестерол и триглицериди по ензимен колориметричен метод (Roche Diagnostics) и серумен васпин по ELISA метод (BioVendor). Артериалното налягане е измерено при стандартни условия. Метаболитният синдром е дефиниран според критериите на Международната Диабетна Фе-

дерация от 2005 г.

Функцията на автономната нервна система е оценена посредством ANS-3.0 мониторинговата система (ANSAR Medical Technologies, Inc., Philadelphia, PA) чрез прилагане на стандартните клинични тестове: 1. Тест с дълбоко дишане; 2. Валсалва проба; 3. Изпращане от сигнала позиция. Изследването е извършено поне 24 ч. след последния прием на медикаменти, имащи отношение към автономната функция – антихипертензивни, трициклически антидепресанти и SSRIs, без прием на кафе и тютюнопушене 12 ч. преди изследването, поне 30 мин. след последния прием на храна, сутрин в часовете между 8 ч. и 11 ч.

Статистически анализ

Статистическият анализ на данните е извършен със статистически пакет SPSS версия 21.0 (SPSS, Chicago, USA). Резултатите са представени като средни стойности \pm стандартно отклонение или медиана (междуквartilен обхват от 25% до 75%). Тестът на Ман Уитни е използван за сравняване на независими променливи с ненормално разпределение. Методът на рангова корелация на Спирмън е приложена за изследване на връзката между отделни показатели. За статистически значима разлика е прието $P < 0,05$.

Резултати

Не се установи сигнификантна разлика в нивата на серумния васпин между групите според наличието на МС (Фигура 1).

В изследваната кохорта се наблюдава сигнификантна негативна корелация на серумния васпин със симпатиковата и парасимпатиковата активност в покой ($r = -0,305$, $P = 0,01$, $r = -0,304$, $P = 0,01$, съответно), в хода на теста с дълбоко дишане ($r = -0,243$, $P = 0,042$, $r = -0,417$, $P < 0,001$, съответно), в хода на теста Валсалва ($r = -0,243$, $P = 0,043$, $r = -0,327$, $P = 0,006$, съответно), и в хода на теста изпращане от сигнал положение ($r = -0,312$, $P = 0,009$, $r = -0,337$, $P = 0,004$, съответно). При лицата в групата с НмГТ+МС се установява силна негативна корелация между серумния васпин и симпатиковия тонус в покой ($r = -0,389$, $P = 0,021$), симпатиковия и парасимпатиковия тонус при теста с дълбоко дишане ($r = -0,405$, $P = 0,016$, $r = -0,352$, $P = 0,038$, съответно), и след изпращане ($r = -0,358$, $P = 0,035$, $r = -0,335$, $P = 0,049$, съответно), докато в групата с НмГТ-МС васпин корелира негативно само с парасимпатиковата сила в покой ($r = -0,379$, $P = 0,025$), при дълбоко дишане ($r = -0,510$, $P = 0,002$), при Валсалва ($r = -0,415$, $P = 0,013$), и след изпращане ($r = -0,384$, $P = 0,023$) (Таблица 2).

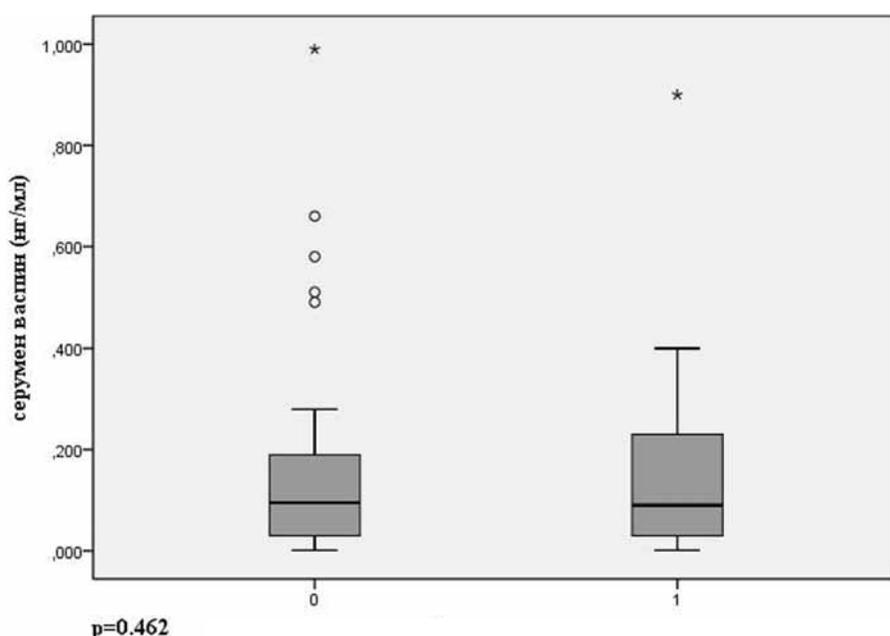
Таблица 1.

Основни характеристики на двете групи според наличието на метаболитен синдром – с (НмГТ+МС) и без (НмГТ-МС).

Показатели	НмГТ+МС	НмГТ-МС
Брой (n)	37	37
Пол (мъже/жени)	9/28	21/16
Средна възраст (години)	42,6±13,5	46,2±13,9
Среден ИТМ (кг/м ²)	24,4±3,4	33,6±5,6
Серумна концентрация на васпин (нг/мл)	0,10 (0,03-0,24)	0,09 (0,03-0,24)

Данните са средна стойност ± стандартно отклонение и медиана (междуквартилен обхват от 25% до 75%).

Фигура 1. Серумни нива на васпин в групите според наличието на метаболитен синдром (0- без МС и 1- с МС).



Обсъждане

Има доказателства, че васпин притежава потенциал да подобрява инсулиновата чувствителност на адипоцитите и да потиска развитието на затлъстяване чрез подпомагане диференциацията на 3T3-L1 преадипоцитите посредством намаляване нивата на иРНК на интерлевкин-6 и увеличаване нивата на иРНК на глюкозен транспортер 4 (7). Противно на горепосоченото, нашите данни не показват сигнификантна разлика в нивата на серумния васпин между групите според наличието на МС. Получените резултати не са в подкрепа на данните на Saboori и сътр. за повишени серумни нива на васпин при жени със затлъстяване и НмГТ (8), на Choi и сътр. при мъже с МС (9), и на Esteghamati и сътр. при двата пола с МС (10). Също така по-високи нива на васпин са докладвани при състояния, характеризирани се с инсулинова резистентност, като синдром на поликистозните яйчници и гестационен захарен диабет (11, 12). От друга страна, в съответствие с нашите резултати някои от последните проучвания не показват разлика във васпиновите нива при

лица със ЗД тип 2 и МС в сравнение с тези без МС (13), или установяват дори понижени концентрации на васпин при мъже с МС (14) и наличие на сигнификантна обратна връзка между серумния васпин и инсулиновите нива, което поставя под съмнение инсулин-очувствителните ефекти на васпин (15). Auguet и сътр. не намират разлика в нивата на васпин между жени с НмГТ с или без затлъстяване (16), Bashiri и сътр. докладват, че няма връзка между концентрацията на васпин и инсулиновата чувствителност при мъже (17) и von Loeffelholz и сътр. потвърждават тази концепция и при двата пола (18).

Доколкото ни е известно ролята на васпин за развитието на САД е проучвана само при погроставащи със захарен диабет тип 1 и не са налични данни при възрастни с НмГТ. Проучването на El Dayem и сътр. показва сигнификантна връзка между васпин и стандартното отклонение на разликите в RR интервала, използвана като времеви показател за вариабилитета на сърдечната честота при САД, определена посредством 24-часово холтер мониториране, при юноши (19).

Таблица 2.

Корелация между нивата на васпин и симпатиковата (LFa) и парасимпатиковата (RFa) активност в покой и в хода на клиничните тестове в изследваната кохорта и в групите с (НМГТ+МС) и без (НМГТ-МС) метаболитен синдром.

Общо	Васпин	
	Corr Coeff (r)	P
LFa в покой	-0,31	0,010
RFa в покой	-0,3	0,010
LFa дълбоко дишане	-0,24	0,042
RFa дълбоко дишане	-0,42	<0,001
LFa Валсалва	-0,24	0,043
RFa Валсалва	-0,33	0,006
LFa изпращане	-0,31	0,009
RFa изпращане	-0,34	0,004
НМГТ+МС		
LFa в покой	-0,39	0,021
RFa в покой	-0,31	0,066
LFa дълбоко дишане	-0,41	0,016
RFa дълбоко дишане	-0,35	0,038
LFa Валсалва	-0,18	0,311
RFa Валсалва	-0,24	0,158
LFa изпращане	-0,36	0,035
RFa изпращане	-0,34	0,049
НМГТ-МС		
LFa в покой	-0,2	0,251
RFa в покой	-0,38	0,025
LFa дълбоко дишане	-0,05	0,774
RFa дълбоко дишане	-0,51	0,002
LFa Валсалва	-0,29	0,096
RFa Валсалва	-0,42	0,013
LFa изпращане	-0,27	0,118
RFa изпращане	-0,38	0,023

Нашите данни показват сигнификантна негативна корелация между васпин и симпатиковата и парасимпатиковата активност в покой и в хода на клиничните тестове в изследваната кохорта, като след разделянето на лицата според наличието на МС васпин корелира с парасимпатиковия тонус, независимо от МС, и със симпатиковата сила само при наличие на МС.

При животински модели асоциацията на САД със затлъстяването е свързана със сигнификантно понижена симпатикова активност. (6) При изследване на хора нарушеният вариабилитет на сърдечната честота се дължи на намалена парасимпатикова (20) или симпатикова (21) функция, или и на двете (22), като също така е наблюдаван и парадоксално повишен парасимпатиков тонус (23). Хиперинсулинемията, ендотелната дисфункция и свръхпродукцията на адипокини са вероятни съпътстващи механизми за развитието на САД (24). Предполага се, че васпин регулира функцията на ендотелната NO-синтаза в ендотелните прогениторни клетки при лица със захарен диабет и по този начин предотвратява развитието на съдови усложнения (25) и инхибира активността на ацетилхолинестеразата, водеща до ацетилхолин-индуцирана NO-медирана ендотел-зависима релаксация на мезентериална артерия (26).

Класификацията на Vinik за стadia на САД, базирана на високо-сензитивния ANX-3.0 метод, използван в настоящото изследване, дефинира ранна парасимпатикова слабост (27), наблюдавана дори при липса на инсулинова резистентност (28), което изяснява негативната корелация на васпин с парасимпатиковия тонус в групата без МС и със симпатиковия тонус само при наличие на инсулинова резистентност. Широко разпространено е схващането, че инсулиновата резистентност е подлежащият патогенетичен механизъм, отговорен за развитието на САД (29). На базата на получените резултати и данните на Chang и сътр. (28) може да се спекулира, че вероятно инсулиновата резистентност е в резултат на налично автономно нарушение и васпин упражнява протективните си ефекти много преди развитието МС.

Заклучение

Нашите резултати не показват значими колебания в нивото на васпин при еугликемични лица с или без данни за метаболитен синдром. В изследваната група лица се установи негативна корелация между васпин и сърдечно-съдовата автономна функция, като васпин корелира с парасимпатиковата активност дори и при липса на МС.

Настоящото изследване е финансирано от Медицински Университет – София, във връзка с одобрен научно-изследователски проект № 24-Д/2014г.

Serum Vaspin Relation to Cardiovascular Autonomic Function in Euglycemic Subjects With and Without Metabolic Syndrome

Dimova, Romyana B.¹, Tankova, Tsvetalina Iv.¹, Kirilov, Georgi G.², Chakarova, Nevena Y.¹, Dakovska, Lilia N.¹, Grozeva, Greta G.¹

¹Department of Diabetology, Clinical Center of Endocrinology, Medical University Sofia, Bulgaria

²Department of Radioimmunology laboratory, Clinical Center of Endocrinology, Medical University Sofia, Bulgaria

Address for correspondence:

Romyana Dimova, MD
Department of Diabetology,
Clinical Centre of Endocrinology
2, Zdrave str., Sofia 1431, Bulgaria
e-mail: dr.roumyana.dimova@gmail.com

Abstract

Aim: This study aims to assess the relationship between serum vaspin levels and autonomic tone parameters in subjects with normal glucose tolerance (NGT) with or without metabolic syndrome (MetS).

Materials and methods: 74 euglycemic subjects (30 males and 44 females), of mean age 44,4±13,7 years and mean BMI 29,0±6,5 kg/m², divided into two groups according to the presence of MetS, were enrolled in this cross-sectional study. Glucose tolerance was studied during OGTT, applying 2006 WHO criteria. Anthropometric indices, blood pressure, serum lipids, and serum vaspin were measured. The 2005 IDF definition of MetS was used. Cardiovascular autonomic function was assessed by ANX-3.0.

Results: There was no difference in serum vaspin levels between the two groups according to the presence of MetS. Vaspin negatively correlated with both sympathetic and parasympathetic activity in the entire cohort and just with parasympathetic tone in the absence of MetS.

Conclusion: Metabolic syndrome does not influence serum vaspin levels in normoglycemia. Vaspin negatively correlates with autonomic tone indices in NGT.

Key words: vaspin, normal glucose tolerance, cardiovascular autonomic function

Introduction

Vaspin is a visceral adipose tissue (VAT)-derived serine protease inhibitor with insulin-sensitizing effects, found in the VAT of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat, an animal model with central obesity and type 2 diabetes (T2D) (1). As uncontrolled diabetes and weight reduction have diminished vaspin expression, whereas the administration of insulin sensitizers has normalized its expression and serum concentration, and recombinant vaspin administration in Diet-induced Obesity mice has significantly improved their glucose tolerance and insulin sensitivity, it has been

assumed that vaspin serves as an insulin sensitizer with anti-inflammatory effects which is activated in response to decreased insulin sensitivity (1, 2).

A meta-analysis, encompassing 6 studies including 1826 obese individuals and 11 studies including 1570 subjects with T2D, has provided evidence of higher vaspin levels in obesity and emphasized the pivotal role of vaspin in the progression of metabolic abnormalities (3).

The results of a growing number of studies in different ethnic groups have suggested cardiovascular autonomic dysfunction (CAD) multifactorial modality

(4, 5), including central obesity (6), since VAT is considered an endocrine organ synthesizing and secreting a multitude of adipokines.

As the role of vaspin in metabolic syndrome (MetS) is not totally clarified and the impact of vaspin on autonomic function is still poorly studied, the present study aims to assess serum vaspin levels in normal glucose tolerance (NGT) subjects with and without MetS, and to evaluate the association between serum vaspin levels and cardiovascular autonomic function in this cohort.

Materials and methods

A total of 74 subjects with NGT – 30 males and 44 females, mean age $44,4 \pm 13,7$ years, mean BMI $29,0 \pm 6,5$ kg/m² were included in this cross-sectional study. They were divided into two groups according to the presence of MetS. The main characteristics of the groups are displayed in Table 1.

The participants were recruited at the Department of Diabetology, Clinical Centre of Endocrinology, Medical University, Sofia within a screening program for diabetes mellitus.

All subjects declared their written informed consent and were familiar with the aims, methods and risks of participating in the study in accordance with the Helsinki Declaration and rules of Good Clinical Practice, as the study was approved by the Ethics Committee of the Medical University, Sofia.

Anthropometric parameters were measured – height, weight and waist circumference, and BMI was calculated. Glucose tolerance was evaluated during a standard oral glucose tolerance test and defined according to 2006 WHO criteria. The following were assessed at fasting in all participants: serum lipid parameters (total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides using an enzymatic colorimetric method (Roche Diagnostics), and serum vaspin using ELISA method (BioVendor). Arterial blood pressure was measured in standard conditions. The 2005 IDF definition of MetS was used.

Autonomic nervous system function evaluation was performed with ANS-3.0 autonomic monitoring system (ANSAR Medical Technologies, Inc., Philadelphia, PA) applying standard clinical tests: 1. Deep breathing 2. Valsalva maneuver, and 3. Standing from a seated position. The study was performed at least 24 hours after the last dose of medications affecting autonomic function – antihypertensives, tricyclic antidepressants and SSRIs, refraining from coffee and smoking 12 hours prior to the test, at least 30 minutes after the last meal, between 8 - 11am in the morning.

Statistical analysis

Statistical analysis of the data was performed by SPSS 21.0 (SPSS, Chicago, USA).

The data is expressed as mean \pm standard deviation (SD) and median (percentile 25% to 75%). The Mann Whitney U test was used to compare independent non-normally distributed variables. Spearman's rank correlation method was performed between different measured parameters. A P-value (two tailed) of less than 0,05 was considered statistically significant.

Results

No significant difference in serum vaspin levels between the two groups according to the presence of MetS was observed (Fig. 1).

Serum vaspin concentrations presented significant negative correlation with both sympathetic and parasympathetic activity at rest ($r = -0,305$, $P = 0,01$, $r = -0,304$, $P = 0,01$, respectively), during deep breathing ($r = -0,243$, $P = 0,042$, $r = -0,417$, $P < 0,001$, respectively), Valsalva ($r = -0,243$, $P = 0,043$, $r = -0,327$, $P = 0,006$, respectively), and standing ($r = -0,312$, $P = 0,009$, $r = -0,337$, $P = 0,004$, respectively) in the entire cohort. The subjects in the NGT+MetS group showed a strong negative correlation between serum vaspin and sympathetic tone at rest ($r = -0,389$, $P = 0,021$), both sympathetic and parasympathetic tone during deep breathing ($r = -0,405$, $P = 0,016$, $r = -0,352$, $P = 0,038$, respectively), and standing ($r = -0,358$, $P = 0,035$, $r = -0,335$, $P = 0,049$, respectively), whilst in NGT-MetS group vaspin negatively correlated with parasympathetic power at rest ($r = -0,379$, $P = 0,025$), during deep breathing ($r = -0,510$, $P = 0,002$), Valsalva ($r = -0,415$, $P = 0,013$), and standing ($r = -0,384$, $P = 0,023$) (Table 2).

Discussion

There is some evidence that vaspin has the potential to increase adipocyte insulin sensitivity and to suppress obesity through promoting the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes by decreasing IL-6 mRNA and increasing GLUT4 mRNA levels (7). Contrary to the above, our results have demonstrated no significant difference in serum vaspin levels between the two groups according to the presence of MetS. Our findings do not support the data of Saboori et al. for elevated serum vaspin levels in obese NGT women (8), of Choi et al. in men with MetS (9), and of Esteghamati et al. in both genders with MetS (10). Higher vaspin levels have also been reported in conditions characterised with insulin resistance, such as PCOS and gestational diabetes mellitus (11, 12).

Table 1.

Main characteristics of the two groups according to the presence of metabolic syndrome (with (NGT+MetS) and without (NGT-MetS)).

Variables	NGT-MetS	NGT+MetS
Number (n)	37	37
Sex (male/female)	9/28	21/16
Mean age (years)	42,6±13,5	46,2±13,9
Mean BMI (kg/m ²)	24,4±3,4	33,6±5,6
Serum vaspin concentration (ng/ml)	0,10 (0,03-0,24)	0,09 (0,03-0,24)
Data is means ± SD and median (percentile 25% to 75%).		

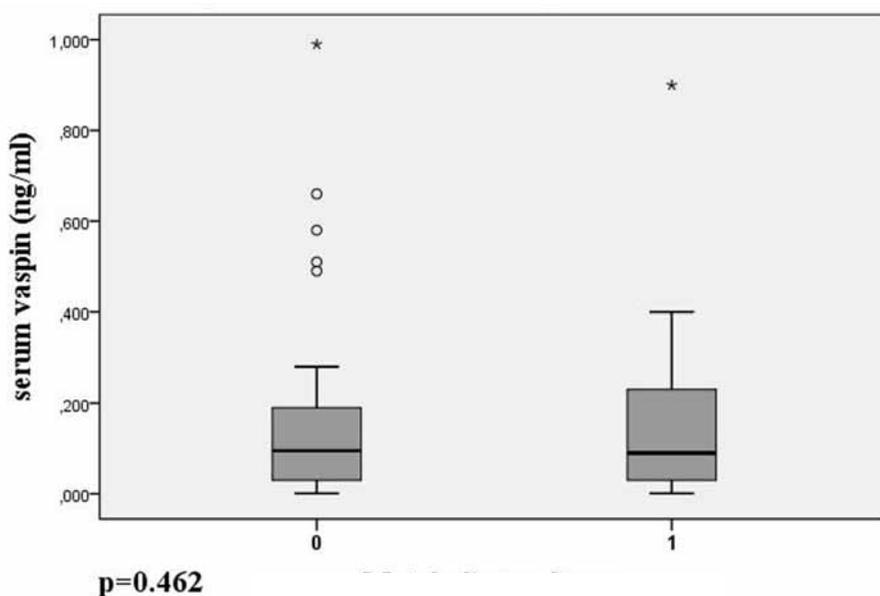


Figure 1.

Serum vaspin levels in the groups according to the presence of metabolic syndrome (0- without MetS and 1- with MetS).

On the other hand, in accordance with our results, some recent studies have presented no difference in vaspin levels in T2D subjects with MetS as compared to those without MetS (13), or even lower vaspin concentrations in men with MetS (14) and a reciprocal relation between serum vaspin and insulin levels, which impugns its insulin-sensitizing effects (15). Auguet et al. have found no difference in vaspin levels between NGT women with or without obesity (16), Bashiri et al. have reported no relationship between vaspin concentrations and insulin sensitivity in men (17) and von Loeffelholz et al. have confirmed this conception in both genders (18).

As far as we know the role of vaspin in the development of CAD has been investigated only in adolescent type 1 diabetes subjects and there are no data in adults with NGT. A study by El Dayem et al. has shown a significant relation between vaspin and a standard deviation difference RR as a time domain HRV parameter of CAD, assessed by twenty-four-hour Holter monitoring, in adolescents (19). Our findings displayed significant negative correlations between vaspin and both sympathetic and parasympathetic activity at rest and during clinical tests in the entire cohort, and after dividing these subjects according to the presence of MetS vaspin correlated with parasympathetic tone independently of MetS and with sympathetic power only in the presence of MetS.

In animal model studies the association of CAD with obesity is related to significantly reduced sympathetic activity (6). In human studies an altered HRV is due to decreased parasympathetic (20) or sympathetic (21) function, or both, (22), and a paradoxically increased sympathetic tone has also been observed (23). Hyperinsulinemia, endothelial dysfunction and overproduction of adipokines are likely accompanying mechanisms for

Table 2.

Correlation between serum vaspin levels and sympathetic (LFa) and parasympathetic (RFa) activity at rest and during clinical tests in the entire cohort and in the groups with (NGT+MetS) and without (NGT-MetS) metabolic syndrome.

Total	Vaspin	
	Corr Coeff (r)	P
LFa at rest	-0,31	0,010
RFa at rest	-0,3	0,010
LFa Deep breathing	-0,24	0,042
RFa Deep breathing	-0,42	<0,001
LFa Valsalva maneuver	-0,24	0,043
RFa Valsalva maneuver	-0,33	0,006
LFa standing	-0,31	0,009
RFa standing	-0,34	0,004
NGT+MetS		
LFa at rest	-0,39	0,021
RFa at rest	-0,31	0,066
LFa Deep breathing	-0,41	0,016
RFa Deep breathing	-0,35	0,038
LFa Valsalva maneuver	-0,18	0,311
RFa Valsalva maneuver	-0,24	0,158
LFa standing	-0,36	0,035
RFa standing	-0,34	0,049
NGT-MetS		
LFa at rest	-0,2	0,251
RFa at rest	-0,38	0,025
LFa Deep breathing	-0,05	0,774
RFa Deep breathing	-0,51	0,002
LFa Valsalva maneuver	-0,29	0,096
RFa Valsalva maneuver	-0,42	0,013
LFa standing	-0,27	0,118
RFa standing	-0,38	0,023

the development of CAD (24).

It has been suggested that vaspin regulates eNOS function in endothelial progenitor cells in subjects with diabetes and thus prevents the occurrence of vascular complications (25) and inhibits ACh esterase activity, leading to intensified ACh-induced NO-mediated endothelium-dependent relaxation in a mesenteric artery (26).

Vinik's classification of CAD stages based on the high-sensitive ANX-3.0 method, applied in the present study, defines early parasympathetic weakness (27), observed even in the absence of insulin resistance (28), which clarifies the negative correlation of vaspin with parasympathetic tone in NGT-MetS group and with sympathetic tone only in the presence of insulin resistance. It is widely supposed that insulin resistance is the underlying pathogenic mechanism responsible for the development of CAD (29). Based on our finding and Chang et al. data (28) it might be speculated that probably insulin resistance is a consequence of existing autonomic damage and vaspin exerts its protective effects long before the development of metabolic syndrome abnormalities.

Conclusion

Our results demonstrate no overt fluctuations in vaspin level in euglycemic subjects with or without MetS. There is a negative correlation between vaspin and cardiovascular autonomic function in the studied group, and vaspin is associated with parasympathetic activity even in the absence of MetS.

Acknowledgements

This study was supported by grant No.24-D/2014 of Medical University, Sofia, Bulgaria.

References

1. Hida K, Wada J, Eguchi J, Zhang H, Baba M, Seida A, et al. Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 10610-10615.
2. Wada J. Vaspin: a novel serpin with insulin-sensitizing effects. *Expert Opin Investig Drugs* 2008; 17: 327-33.
3. Feng RN, Li Y, Wang C, Luo C, Liu L, Chuo F, et al. Higher Vaspin Levels in Subjects with Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus: a Meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract* 2014; 106: 88-94.
4. Singleton JR, Smith AG, Russell JW, Feldman EL. Microvascular Complications of Impaired Glucose Tolerance. *Diabetes* 2003; 52: 2867-2873.
5. Dimova R, Tankova T, Chakarova N, Grozeva G, Dakovska L. Cardiovascular autonomic tone relation to metabolic parameters and hsCRP in normoglycemia and prediabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2015; 109: 262-270.
6. Gaede P, Vedel P, Parving HH, Pedersen O. Intensified multifactorial intervention in patients with type 2 diabetes mellitus and microalbuminuria: the Steno type 2 randomised study. *Lancet* 1999; 353: 617-622.

7. Liu P, Li G, Wu J, Zhou X, Wang L, Han W, et al. Vaspin promotes 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Exp Biol Med (Maywood)* 2015, pii: 1535370214565081.
8. Saboori S, Hosseinzadeh-Attar MJ, Yousefi Rad E, Hosseini M, Mirzaei K, et al. The comparison of serum vaspin and visfatin concentrations in obese and normal weight women. *Diabetes Metab Syndr* 2013, pii: S1871-4021(13)00099-4.
9. Choi SH, Kwak SH, Lee Y, Moon MK, Lim S, Park YJ, et al. Plasma vaspin concentrations are elevated in metabolic syndrome in men and are correlated with coronary atherosclerosis in women. *Clin Endocrinol* 2011; 75: 628-635.
10. Esteghamati A, Noshad S, Mousavizadeh M, Zandieh A, Nakhjavani M. Association of Vaspin with Metabolic Syndrome: The Pivotal Role of Insulin Resistance. *Diabetes Metab J* 2014; 38: 242-243.
11. Tan BK, Heutling D, Chen J, Farhatullah S, Adya R, et al. Metformin decreases the adipokine vaspin in overweight women with polycystic ovary syndrome concomitant with improvement in insulin sensitivity and a decrease in insulin resistance. *Diabetes* 2008; 57: 1501-1507.
12. Jia X, Wang S, Ma N, Li X, Guo L, Liu X, et al. Comparative analysis of vaspin in pregnant women with and without gestational diabetes mellitus and healthy non-pregnant women. *Endocrine* 2015; 48: 533-540.
13. Yan T, Li L, Wang H. Correlation between adipocytokines levels and metabolic syndrome in type 2 diabetes mellitus. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2014; 34: 275-278.
14. Kim JM, Kim TN, Won JC. Association between serum vaspin level and metabolic syndrome in healthy korean subjects. *Metab Syndr Relat Disord* 2013; 11: 385-391.
15. Jeong E, Youn BS, Kim DW, Kim EH, Park JW, Namkoong C, et al. Circadian rhythm of serum vaspin in healthy male volunteers: relation to meals. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 1869-1875.
16. Auguet T, Quintero Y, Riesco D, Morancho B, Terra X, Crescenti A, et al. New adipokines vaspin and omentin. Circulating levels and gene expression in adipose tissue from morbidly obese women. *BMC Med Genet* 2011; 28: 60.
17. Bashiri J, Rahbaran A, Gholami F, Ahmadizad S, Nikoukheslat S, Moradi A. The effect of Acute Exercise on Serum Vaspin Level and Its Relation to Insulin Sensitivity in Overweight Elderly Men. *ZJRMS* 2013; 16: 10-13.
18. von Loeffelholz C, Möhlig M, Arafat AM, Isken F, Spranger J, Mai K, et al. Circulating vaspin is unrelated to insulin sensitivity in a cohort of nondiabetic humans. *Eur J Endocrinol* 2010; 162: 507-513.
19. El Dayem SM, Battah AA, El Bohy Ael M, El Shehaby A, El Ghaffar EA. Relationship of plasma level of chemerin and vaspin to early atherosclerotic changes and cardiac autonomic neuropathy in adolescent type 1 diabetic patients. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2015; 28: 265-273.
20. Laederach-Hofmann K, Mussgay L, Ruddel H. Autonomic cardiovascular regulation in obesity. *J. Endocrinol* 2000; 164: 59-66.
21. Peterson HR, Rothschild M, Weinberg CR, Fell RD, Mcleish KR, Pfeifer MA. Body fat and the activity of the autonomic nervous system. *N Engl J Med* 1988; 318: 1077-1083.
22. Sztajzel J, Golay A, Makoundou V, Lehmann TN, Barthassat V, Sievert K, et al. Impact of body fat mass extent on cardiac autonomic alterations in women. *Eur J Clin Invest* 2009; 39: 649-656.
23. Zahorska-Markiewicz B, Kuagowska E, Kucio C, Klin M. Heart rate variability in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1993;17: 21-23.
24. Vinik AI, Ziegler D. Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. *Circulation* 2007; 115: 387-397.
25. Sun N, Wang H, Wang L. Vaspin alleviates dysfunction of endothelial progenitor cells induced by high glucose via PI3K/Akt/eNOS pathway. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 482-489.
26. Kameshima S, Yamada K, Morita T, Okada M, Yamawaki H. Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor augments acetylcholine-induced relaxation via the inhibition of acetylcholine esterase activity in rat isolated mesenteric artery. *Acta Physiol (Oxf)*, 2015, doi: 10.1111/apha.12563. [Epub ahead of print]
27. Vinik AI, Aysin B, Colombo J. Differentiation of autonomic dysfunction by enhanced frequency domain analysis reveals additional stages in the progression of autonomic decline in diabetics. *5th Annual Diabetes Technology Meeting. San Francisco, CA, 10-12 November 2015.*
28. Chang CJ, Yang YC, Lu FH, Lin TS, Chen JJ, Yeh TL, et al. Altered cardiac autonomic function may precede insulin resistance in metabolic syndrome. *Am. J. Med* 2010; 123: 432-438.
29. Despres JP. Targeting abdominal obesity and the metabolic syndrome to manage cardiovascular disease risk. *Heart* 2009; 95: 1118-1124.

Оценка на сърдечно-съдовата автономна функция при предиабет и корелацията ѝ с някои метаболитни и инфламаторни маркери

Димова, Румяна Б., Танкова, Цветалина Ив., Чакърова, Невена Я., Грозева, Грета Г., Даковска, Лилия Н.

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

Адрес за кореспонденция:

Д-р Румяна Димова
Клиника по Диабетология,
Клиничен Център по Ендокринология
ул. Здраве № 2, София 1431, България
e-mail: dr.roumyana.dimova@gmail.com

Резюме

Цел: Целта на настоящото изследване е да се оцени сърдечно-съдовата автономна функция (САФ) и връзката ѝ с някои метаболитни параметри и инфламаторни маркери при лица с предиабет.

Материали и методи: Общо 148 лица с предиабет – 91 жени и 57 мъже, на средна възраст 50.4 ± 13.6 г., среден индекс на телесна маса (ИТМ) 32.4 ± 8.8 кг/м², разделени в 3 групи според глюкозния толеранс: 83 с нарушена гликемия на гладно (НГГ), 29 с нарушен глюкозен толеранс (НГТ) и 36 с НГГ+НГТ; в 5 групи според ИТМ: 15 лица с нормално тегло, 43 лица с наднормено тегло, 48 лица със затлъстяване I ст., 25 лица със затлъстяване II ст., и 17 лица със затлъстяване III ст., и в 2 групи според наличието на метаболитен синдром (МС): 118 лица с МС и 30 контроли, са включени в срезово проучване. Глюкозният толеранс е оценен посредством ОГПТ, според критериите на СЗО от 2006 г. Измерени са антропометрични параметри, артериално налягане, серумни липиди и С-реактивен протеин. Телесният състав е оценен чрез биоимпедансен анализ (Inbody 720). САФ е оценена чрез ANX-3.0 метод, използващ честотен анализ в хода на стандартните клинични тестове – дълбоко дишане, проба на Валсалва и изпращане от седнала позиция. Статистическият анализ е извършен със статистически пакет SPSS 20.0.

Резултати: Не се установи значима разлика в симпатикусовата и парасимпатикусовата активност между групите според глюкозния толеранс. Наблюдава се тенденция към снижаване на парасимпатикусовата функция в хода на теста с дълбоко дишане с прогресията на степента на затлъстяване ($P=0,039$). Парасимпатикусовият тонус при дълбоко дишане е понижен в групите с МС в сравнение с контролите ($P=0,031$). Демонстрира се умерена до силна негативна корелация между симпатикусовата и парасимпатикусовата активност и възрастта, висцералната мастна маса, HbA_{1c} и гликемията. Не се установи сигнификантна връзка между автономния тонус и hsCRP.

Заклучение: Затлъстяването и наличието на метаболитен синдром вероятно са свързани с нарушена парасимпатикусова функция при предиабет. Висцералното затлъстяване, възрастта, HbA_{1c} и гликемията сигнификантно повлияват промените в сърдечно-съдовата автономна функция при предиабет.

Ключови думи: сърдечно-съдова автономна функция, предиабет, метаболитен синдром, сърдечно-съдов риск, С-реактивен протеин

Въведение

Резултатите от нарастващ брой проучвания при различни етнически групи показват, че сърдечно-съдовата автономна дисфункция (САД) започва в ранните етапи на нарушена глюкозна хомеостаза (1) и предполагат нейната мултифакторна обусловеност и връзката ѝ не само с гликемията, но и с други сърдечно-съдови рискови фактори, като нискостепенно възпаление и компоненти на метаболическия синдром (МС), които често са в комбинация с предиабет и наличие на инсулинова резистентност (2). Намаленият вариабилитет на сърдечната честота (ВСЧ) се смята за потенциален механизъм за внезапна сърдечна смърт при лица със затлъстяване. Ето защо през последните години се наблюдава повишен научен интерес за оценка на сърдечно-съдовата автономна функция (САФ) при наличие на затлъстяване и други метаболически отклонения.

Асоциацията на САД със затлъстяването е установена при изследвания на животински модели, където се наблюдава значимо намалена симпатическа активност (3). При изследвания на хора резултатите не са така категорични, като се наблюдава нарушен вариабилитет на сърдечната честота за сметка на понижена парасимпатическа (4) или симпатическа (5) функция, или на двете едновременно (6), като е наблюдавана и парадоксално повишена активност на симпатическата (4).

Все още остава неясен въпросът дали общотелесното съпоставено с абдоминалното натрупване на мастна маса допринася повече за нарушенията във вариабилитета на сърдечната честота. Някои проучвания показват по-голямо значение на централното затлъстяване като предиктор за нарушен автономен контрол (7, 8), докато други посочват, че общотелесната мастна тъкан е най-значимият маркер, корелиращ с ВСЧ (9).

В същото време е установена връзка на САД с артериалната хипертония (10-13) и дислипидемията (9, 14), и промените в сърдечно-съдовата автономна функция са наблюдавани дори в здрава популация (15). Следователно е необходима оценка на всеки метаболически параметър с оглед изясняване на индивидуалния му принос за нарушенията във вариабилитета на сърдечната честота. Наличието на предиабет позволява да се определи как дискретни отклонения в кръвната захар повлияват тези връзки.

Целта на настоящото проучване е да се оцени сърдечно-съдова автономна функция при

различните категории на предиабет, при наднормено тегло и различна степен на затлъстяване, и при наличие на метаболическия синдром; и да се изследва връзката на САФ с някои метаболически компоненти и инфламаторни маркери – индекс на телесна маса (ИТМ), обиколка на талия, процент на общотелесна мастна маса, висцерална мастна маса, артериално налягане, липиден профил, HbA_{1c}, гликемия и С-реактивен протеин при лица с предиабет.

Материал и методи

Общо 148 лица с предиабет – 91 жени и 57 мъже, на средна възраст 50,4±13,6 г. и среден индекс на телесна маса (ИТМ) 32,4±8,8 кг/м², са включени в срезното проучване. Участниците са разделени в 3 групи според глюкозния толеранс: 83 с нарушена гликемия на гладно (НГГ), 29 с нарушен глюкозен толеранс (НГТ) и 36 с НГГ+НГТ; в 5 групи според ИТМ: 15 лица с нормално тегло, 43 лица с наднормено тегло, 48 лица със затлъстяване I степен, 25 лица със затлъстяване II степен и 17 лица със затлъстяване III степен; и в 2 групи според наличието на МС: 118 лица с МС и 30 контроли. Основните характеристики на отделните групи са представени в Таблицы 1-3.

Участниците в изследването са набрани в Клиниката по Диабетология, Клиничен Център по Ендокринология, София, в рамките на проведен скрининг за захарен диабет. Като изключващи критерии са приети: нарушения в глюкозния толеранс или прием на антидиабетни медикаменти, ритъмни нарушения или прием на антиаритмична терапия, преживян съдов инцидент. Всички участници в изследването са подписали информирано съгласие и са запознати с целите, методите и рисковете при вземане на участие в изследването съгласно Декларацията от Хелзинки и съобразно правилата за Добра Клинична Практика, като проучването е одобрено от Етичната комисия на Медицински Университет, София.

Всички участници са интервюирани относно наличие на глюкозни нарушения, прием на антидиабетна терапия, ритъмни нарушения и прием на антиаритмични медикаменти, както и наличие на исхемична болест на сърцето и преживян съдов инцидент. Измерени са антропометрични показатели – ръст, тегло и обиколка на талия, и е изчислен ИТМ.

Глюкозният толеранс е оценен посредством стандартизиран орален глюкозо-толерансен

Таблица 1.

Основни характеристики (брой, разпределение по пол, средна възраст, индекс на телесна маса (ИТМ) и показателите за симпатикова (LFa) и парасимпатикова (RFa) активност в покой и в хода на клиничните тестове) на участниците в групите според глюкозния толеранс - с нарушена гликемия на гладно (НГГ), нарушен глюкозен толеранс (НГТ) и НГГ+НГТ.

Параметри	НГГ	НГТ	НГГ+НГТ	P
Брой	83	29	36	
Пол (мъже/жени)	39/44	6/23	12/24	
Възраст	51,1±12,7*	43,5±14,2*	54,5±13,6*	P=0,004
ИТМ (кг/м ²)	33,2±10,8*	31,0±5,7*	31,8±5,3*	P=0,466
LFa в покой	1,4(0,6-2,6)**	2,1(1,3-4,0)**	1,1(0,6-3,0)**	P=0,059
RFa в покой	0,8(0,3-1,6)**	1,0(0,4-3,0)**	0,8(0,4-1,5)**	P=0,529
RFa - дълбоко дишане	13,9(4,8-28,1)**	19,2(5,2-47,1)*	13,5(4,0-21,1)**	P=0,329
LFa - Валсалва	24,1(11,1-45,6)**	26,0(6,1-36,2)**	19,5(6,1-36,8)**	P=0,391
LFa - изпращане	1,6(0,8-4,2)**	2,1(0,7-5,4)**	1,2(0,5-3,0)**	P=0,274
RFa - изпращане	0,6(0,2-1,2)**	0,5(0,3-1,6)**	0,5(0,3-0,9)**	P=0,837

*Данните са средни стойности±стандартно отклонение

**Данните са медиана и разлика между горен и долен квартил

Таблица 2.

Основни характеристики (брой, разпределение по пол, средна възраст, индекс на телесна маса (ИТМ) и показателите за симпатикова (LFa) и парасимпатикова (RFa) активност в покой и в хода на клиничните тестове) на участниците в групите според индекса на телесна маса (ИТМ) – с нормално тегло (ИТМ 18-24,9 кг/м²), наднормено тегло (ИТМ 18-24,9 кг/м²), затлъстяване I степен (ИТМ 30-34,9 кг/м²), затлъстяване II степен (ИТМ 35-39,9 кг/м²) и затлъстяване III степен (ИТМ ≥ 40 кг/м²).

Параметри	Нормално тегло	Наднормено тегло	Затлъстяване I степен	Затлъстяване II степен	Затлъстяване III степен	P
Брой	15	43	48	25	17	
Пол (мъже/жени)	4/11	16/27	23/25	7/18	7/10	
Възраст	53,5±15,8*	54,1±14,1*	49,2±13,4*	46,0±13,0*	48,0±9,8*	P=0,115
ИТМ (кг/м ²)	23,2±1,7*	27,9±1,3*	32,3±1,5*	36,5±1,4*	46,7±18,0*	P<0,001
LFa в покой	1,7(0,9-3,3)**	1,3(0,5-1,9)**	1,7(0,7-3,4)**	1,8(0,8-2,8)**	1,9(0,4-3,1)**	P=0,286
RFa в покой	1,1(0,6-2,0)**	0,8(0,3-1,4)**	0,8(0,4-1,6)**	1,0(0,4-1,9)**	0,5(0,3-1,1)**	P=0,237
RFa - дълбоко дишане	22,0(8,9-45,0)**	14,3(3,1-24,6)**	13,6(7,4-32,9)**	16,1(8,4-34,6)**	4,8(1,3-17,5)**	P=0,039
LFa - Валсалва	28,5(23,0-57,2)**	21,3(8,5-39,7)**	26,1(8,4-44,7)**	27,4(11,8-52,1)**	14,3(3,2-36,8)**	P=0,257
LFa - изпращане	2,3(1,5-3,6)**	1,1(0,5-2,7)**	2,0(0,9-5,8)**	1,3(0,7-3,6)**	1,3(0,3-5,3)**	P=0,219
RFa - изпращане	0,7(0,2-1,3)**	0,5(0,2-0,9)**	0,5(0,3-1,2)**	0,7(0,3-1,2)**	0,5(0,2-3,6)**	P=0,563

*Данните са средни стойности±стандартно отклонение

**Данните са медиана и разлика между горен и долен квартил

мест (ОГТТ) със 75 г глюкоза на прах сутрин на гладно след 12-часово гладуване. Изследвана е венозна плазмена глюкоза на 0 и 120 минута по хексокиназен метод. Глюкозният толеранс е определен според критериите на СЗО от 2006г.

При всички участници на гладно са изследвани: липиден профил – общ холестерол, HDL холестерол и триглицериди по ензимен колориметричен метод (Roche Diagnostics), като LDL холестерол е изчислен посредством формулата на

Fridewald, HbA_{1c} (NGSP сертифициран метод) в цяла кръв по имунотурбидиметричен метод (Roche Diagnostics) и високочувствителен С-реактивен протеин (hsCRP) с латексов турбидиметричен метод (CRP-Latex) (Roche Diagnostics).

Артериалното налягане е измерено при стандартни условия. Оценката на разпределението на мастната тъкан в тялото е направена с биоимпедансен анализатор (Inbody 720). Площта на висцералната мастна маса е изчислена в см² и общотелесната мастна маса е представена в %.

Метаболитният синдром е дефиниран според критериите на Международната Диабетна Федерация от 2005г.

За оценка на автономната функция е приложен ANS-3.0 метод (ANSAR Medical Technologies, Inc., Philadelphia, PA) – софтуер за мониториране на симпатиковата и парасимпатиковата активност посредством честотен анализ чрез прилагане на стандартните клинични тестове: тест с дълбоко дишане, проба на Валсалва и изпращане от седнала позиция. ANS-3.0 методът, включващ нискочестотния диапазон от спектъра фиксирани между 0,04-0,15 Hz, изчислява симпатиковата (Low Frequency area – LFa) и парасимпатиковата (Respiratory Frequency area – RFa) активност едновременно и независимо, използвайки спектрален анализ на респираторната активност (Respiratory Activity - RA) с едновременен спектрален анализ на ВСЧ.

49 от участниците са с установена артериална хипертония (артериално налягане >140/90 mmHg) и са на терапия с различни класове антихипертензивни медикаменти, включително бета- и алфа-блокери, поради което при тях изследването е извършено поне 24 часа след последния прием на медикаменти, имащи отношение към автономната функция – антихипертензивни, трициклически антидепресанти и SSRIs, без прием на кафе и тютюнопушене 12 ч. преди изследването, поне 30 мин. след последния прием на храна, сутрин в часовете между 8 и 11.

Статистическият анализ на данните е извършен със статистически пакет SPSS версия 20.0 (SPSS, Chicago, USA). Резултатите са представени като средни стойности ± стандартно отклонение или медиана (междуквартилен обхват), в зависимост от разпределението им. При сравнение на непрекъснатите променливи са приложени Т-тест на Стюдънт (Student's t-test), едномерен вариационен анализ (One-way ANOVA) и тест на Крускал-Уолис (Kruskal-Wallis test). Изследвана е и връзката между отделни показатели чрез корелационен анализ на Spearman. За статистически значима разлика е прието P<0,05.

Резултати

Нашите резултати не показват значима разлика в сърдечно-съдовата автономна функция между различните категории на предиабет. Установи се тенденция към значимо редуциране на парасимпатиковата активност в хода на клиничния тест с дълбоко дишане с прогресията на степента на затлъстяване (P=0,039) (Фиг. 1). Парасимпатиковият тонус при дълбоко дишане е намален и в групата с метаболитен синдром спрямо контролите (P=0,031) (Фиг. 2).

При изследваната кохорта се наблюдава умерена до силна негативна корелация между всички параметри, характеризирани автономната функция, и висцералната мастна маса, възрастта, HbA_{1c} плазмената глюкоза на гладно и плазмената глюкоза на 120-та минута. Умерена негативна връзка се установи между LFa в покой, RFa при дълбоко дишане и LFa при пробата на Валсалва и процента общотелесна мастна маса. Умерена позитивна връзка се наблюдава между показателите за симпатиковия тонус и диастолното артериално налягане. С-реактивният протеин не демонстрира значима корелация с показателите за автономен контрол (Табл. 4).

Обсъждане

Директното сравнение между отделните категории на предиабет в настоящото изследване не показва значима разлика в автономния тонус. За разлика от нашите наблюдения Min и сътр. установяват негативна корелация между всички параметри на вариабилитета на сърдечната честота и плазмената глюкоза на гладно (12), подкрепени от резултатите от проучването на Hemingway при мъже (10), Koskinen при жени (11), и Soares-Miranda при млади възрастни (13), докато Assoumou и сътр. не докладват връзка между наличието на НГТ и сърдечно-съдовата автономна функция (16). Според други проучвания намален парасимпатиков тонус като първа проява на САД се установява при НГТ, но не и при НГГ (17). Разнопосочността на данните до голяма степен се дължи на различните методологии използвани в тези изследвания.

Настоящото изследване демонстрира значимо потискане само на парасимпатиковата функция в хода на клиничния тест дълбоко дишане с прогресията на степента на затлъстяване, както и при наличие на метаболитен синдром при предиабет. Според класификацията на Vinik и сътр. за стadiите на САД, която се основава на високочувствителния ANX-3.0 метод,

Таблица 3.

Основни характеристики (брой, разпределение по пол, средна възраст, индекс на телесна маса (ИТМ) и показателите за симпатикусова (LFa) и парасимпатикусова (RFa) активност в покой и в хода на клиничните тестове) на участниците в групите според наличието на метаболитен синдром (МС) - МС+/МС-.

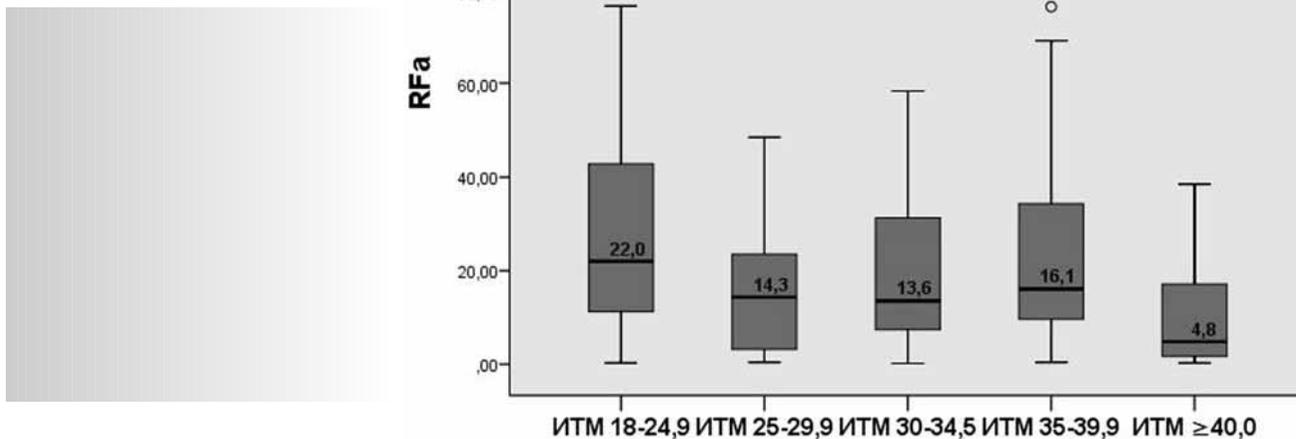
Параметри	МС+	МС-	P
Брой	118	30	
Пол (мъже/жени)	49/8	69/22	
Възраст	50,1±12,9*	51,5±16,3*	P=0,611
ИТМ (кг/м ²)	33,5±9,3*	28,2±4,7*	P=0,003
LFa в покой	1,5(0,7-2,7)**	1,7(0,8-3,6)**	P=0,340
RFa в покой	0,8(0,4-1,6)**	1,0(0,4-2,2)**	P=0,247
RFa Дълбоко дишане	12,9(4,5-25,4)**	20,5(12,5-39,5)**	P=0,031
LFa Валсалва	22,0(7,1-42,0)**	25,7(15,4-43,0)**	P=0,486
LFa изпращане	1,5(0,6-3,8)**	1,9(0,5-5,3)**	P=0,652
RFa изпращане	0,5(0,3-1,2)**	0,6(0,4-1,3)**	P=0,381

*Данните са средни стойности±стандартно отклонение

**Данните са медиана и разлика между горен и долен квартил

Фигура 1.

Парасимпатикусова (RFa) активност при теста с дълбоко дишане в групите според индекса на телесна маса (ИТМ) - с нормално тегло (ИТМ 18-24,9 кг/м²), наднормено тегло (ИТМ 25-29,9 кг/м²), затлъстяване I степен (ИТМ 30-34,9 кг/м²), затлъстяване II степен (ИТМ 35-39,9 кг/м²), и затлъстяване III степен (ИТМ ≥ 40 кг/м²).



приложен и в настоящото проучване, нашите данни покриват критериите за периферна автономна невропатия с ранно парасимпатикусово увреждане, което ние регистрираме при предиабетно състояние, и релативна симпатикусова хиперактивност с последваща симпатикусова хипоактивност (18). Следователно естествената прогресия на САД в контекста на нарушената глюкозна хомеостаза с първоначално засягане на парасимпатикусовия дял на авто-

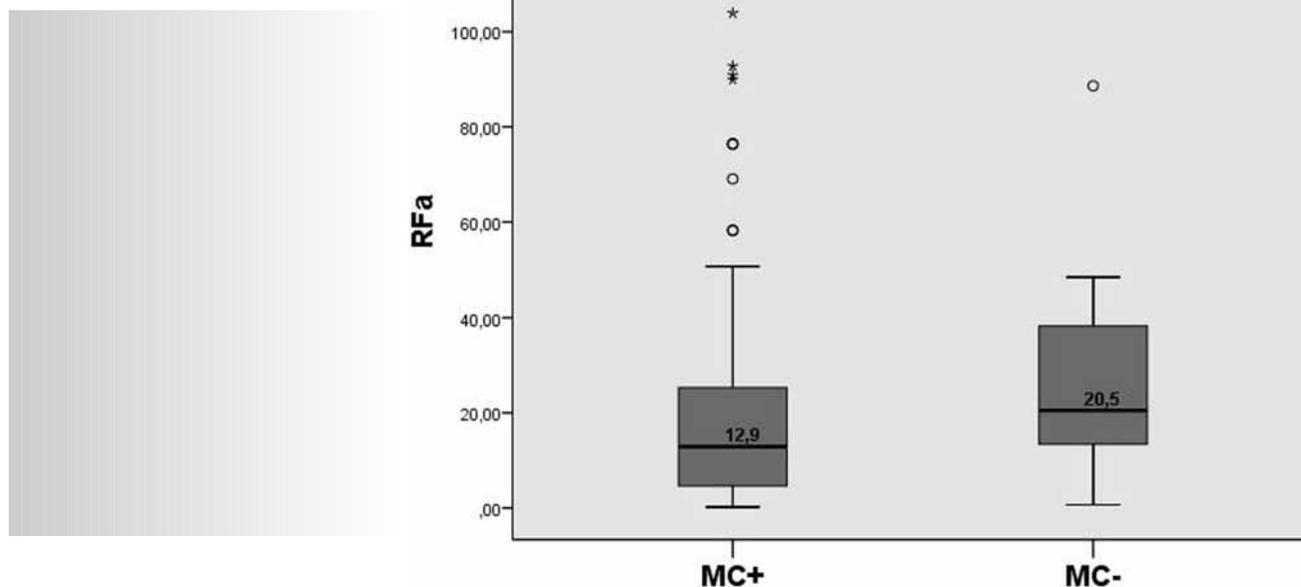
номната нервна система с превалиране на симпатикусовата активност без данни за денервация, последвана от въвличане на симпатикусовия дял, вероятно започва много преди изявата на захарния диабет (19). В подкрепа на това твърдение са хистологичните данни от кожна биопсия при пациенти с НГТ и захарен диабет с малка давност, при които се наблюдават сходни морфологични промени и загуба на нервни влакна (20).

Таблица 4. Корелационна зависимост между нивото на симпатикосвата (LFa) и парасимпатикосвата (RFa) активност в покой и в хода на клиничните тестове - дълбоко дишане, Валсалва и изпране от седнало положение, и изследваните метаболитни компоненти (ИТМ, обиколка на талията, % общотелесна мастна маса, висцерална мастна маса, систолно и диастолно артериално налягане (АН), общ холестерол, HDL холестерол, LDL холестерол, триглицериди, HbA_{1c}, кръв на захар на гладно, кръвна захар на 120 минута), и C-реактивен протеин.

Параметри	средни стойности ± стандартно отклонение	LFa в покой		RFa в покой		RFa - дълбоко дишане		LFa - Валсалва		LFa - изпране		RFa - изпране	
		Corr Coeff (r)	P	Corr Coeff (r)	P	Corr Coeff (r)	P	Corr Coeff (r)	P	Corr Coeff (r)	P	Corr Coeff (r)	P
Възраст	50,4±13,6	-0,62	<0,001	-0,58	<0,001	-0,57	<0,001	-0,41	<0,001	-0,65	<0,001	-0,51	<0,001
ИТМ	32,4±8,8	0,02	0,802	-0,04	0,600	-0,07	0,392	-0,06	0,444	0,05	0,563	0,08	0,356
Талия	105,7±14,5	0,03	0,711	-0,09	0,297	-0,06	0,463	-0,03	0,701	0,01	0,941	-0,04	0,621
% телесна маса	37,4±9,2	-0,16	0,049	-0,11	0,184	-0,21	0,012	-0,19	0,025	-0,13	0,111	-0,02	0,805
Висцерална маса	161,6±45,0	-0,22	0,008	-0,28	<0,001	-0,30	<0,001	-0,21	0,010	-0,22	0,006	-0,20	0,014
Систолно АН	126,5±15,7	-0,10	0,241	-0,20	0,016	-0,11	0,206	0,06	0,440	-0,05	0,560	-0,08	0,346
Диастолно АН	77,2±11,5	0,21	0,009	0,11	0,194	0,10	0,246	0,16	0,049	0,17	0,037	0,07	0,395
Общ холестерол	5,2±1,1	-0,07	0,395	-0,12	0,149	-0,12	0,156	-0,02	0,829	-0,04	0,651	-0,08	0,362
HDL холестерол	1,2±0,4	-0,11	0,201	0,04	0,601	-0,07	0,409	-0,02	0,798	-0,05	0,520	0,07	0,401
LDL холестерол	3,2±1,0	-0,05	0,565	-0,08	0,351	-0,11	0,209	-0,02	0,817	-0,03	0,696	-0,06	0,464
Триглицериди	1,7±1,4	-0,07	0,373	-0,18	0,028	-0,05	0,521	0,01	0,933	-0,07	0,431	-0,12	0,161
HbA _{1c}	5,9±0,4	-0,30	<0,001	-0,20	0,023	-0,31	<0,001	-0,24	0,004	-0,30	<0,001	-0,16	0,046
Кръвна захар на гладно	6,4±0,7	-0,36	<0,001	-0,24	<0,001	-0,28	<0,001	-0,1	0,116	-0,27	<0,001	-0,20	<0,001
Кръвна захар на 120 мин	7,4±1,8	-0,20	0,002	-0,16	0,011	-0,22	<0,001	-0,21	<0,001	-0,21	<0,001	-0,17	0,008
C-реактивен протеин	4,4±1,6	-0,04	0,665	-0,05	0,584	-0,13	0,123	-0,16	0,060	-0,03	0,711	0,03	0,721

Фигура 2.

Парасимпатикусова (RFa) активност при теста с дълбоко дишане в групите според наличието на метаболитен синдром (МС+/МС-).



Публикуваните до момента данни за връзката между затлъстяването и автономната функция са разнопосочни. Изводите от две проучвания са сходни с нашите данни и показват корелация на ИТМ с наличието на САД (8, 21), докато други изследвания отхвърлят подобна връзка (9, 22). Сходни са резултатите на Tentolouris и сътр., които установяват повишена симпатикусова и понижена парасимпатикусова активност при МС (23). Тъй като повърхностно разположените парасимпатикусови нервни влакна се засягат по-рано в условията на повишен метаболитен риск, Chang и сътр. установяват намалена парасимпатикусова активност при наличие дори само на един метаболитен фактор без данни за инсулинова резистентност, докато натрупването на повече метаболитни компоненти води до развитие на инсулинова резистентност с последващо въвличане на симпатикусовия дял (24). Следователно, настоящото изследване потвърждава схващането, че автономният дисбаланс възниква още в ранните етапи от развитието на метаболитен синдром със засягане на парасимпатикуса, като задълбочаването на метаболитните отклонения води до симпатикусова хиперактивност, свързана с изразена инсулинова резистентност (25, 26). Дали затлъстяването е водещата причина за развитието на МС (27) или автономната дисфункция е

основният фактор, отговорен за нарушенията в хипоталамо-хипофизо-надбъбречната ос (28), все още остава недоизяснено. Важно е да се има предвид, че като предиктор за смъртност дори при лица без сърдечно-съдови заболявания (29), намаленият парасимпатикусов тонус носи сериозен риск при индивиди с предиабет и високостепенно затлъстяване или наличие на метаболитен синдром.

Данните от предишно наше изследване показват значимо нарушение на симпатикусовата и парасимпатикусовата активност в хода на клиничните тестове при лица с нормогликемия и екстремно затлъстяване или наличие на МС спрямо контролите (30). Следователно, може да се заключи, че при наличие на нарушения в глюкозния толеранс плазмената глюкоза се явява посилен предиктор за автономен дисбаланс отколкото другите метаболитни компоненти. Това твърдение е в унисон с настоящите резултати, които показват негативна корелация на всички параметри на ВСЧ с HbA_{1c} и гликемията.

Малко са проведените проучвания, сравняващи различните показатели за мастна тъкан с наличието на автономна дисфункция. Получените резултати демонстрират умерена до силна негативна корелация между площта на висцералната мастна маса, отговаряща на централно затлъстяване, с всички параметри на симпати-

кусовата и парасимпатикусова активност, докато процентът общотелесна мастна маса, отразяващ генерализираното разпределение на мастите, корелира негативно само с нивото на симпатикусовия тонус в покой и при пробата на Валсалва и с парасимпатикусовия тонус при дълбоко дишане. Литературните данни са в полза на установените от нас зависимости. Повечето проучвания показват по-силна корелация на абдоминалното мастно натрупване със степента на автономен дисбаланс. Windham и Christou установяват намален парасимпатикусов и симпатикусов тонус при висцерално спрямо генерализирано затлъстяване (22, 31). Резултатите на Koskinen и Assouitou определят антропометричното измерване на обиколката на талията като най-силен предиктор за намален вариабилитет на сърдечна честота (11, 16). Beske и сътр. установяват независима корелация между висцералната мастна маса и намаления барорецепторен рефлекс при мъже (32). Farah и Damodaran регистрират автономна дисфункция за сметка на вагусова хипоактивност и симпатикусова хиперактивност при централно мастно натрупване (7, 33). В изследването на Laitinen и сътр. също е подчертана връзката на САД и висцералното затлъстяване при НГТ (34). Едва в няколко проучвания има данни за корелация на общотелесната мастна маса и промените във ВСЧ (3-6). Установената по-силна връзка на САД с висцералната мастна маса не е изненадваща. Добре известно е, че инсулиновата резистентност корелира предимно с абдоминалната, а не с общотелесната мастна маса (35). Автономната нервна система инервира мастните тена, които са позитивно асоциирани с продукцията на катехоламини от автономните нерви (36). Биологичният механизъм, чрез който висцералната мастна маса допринася за нарушенията на сърдечната автономна функция, най-вероятно е свързан с производството и секрецията на множество цитокини (37).

По отношение на артериалното налягане резултатите от проведеното изследване показват умерена позитивна корелация на диастолното артериално налягане с всички LFa параметри. Има данни за връзка на систолното и диастолното артериално налягане с намалена симпатикусова и парасимпатикусова активност (10, 12), докато други проучвания показват асоциация изолирано само на систолното артериално налягане с повишено отношение LF/HF при жените (11), или отхвърлят връзка на артериалната хипертония с автономната функция (16, 38).

Хиперинсулинемията, ендотелната дисфункция и свръхпродукцията на цитокини са вероят-

ните съпътстващи механизми в развитието на САД (19) в ранните етапи на нарушения в глюкозния толеранс. Тези пътища до голяма степен обясняват нашите резултати, които демонстрират по-силна предиктивна стойност на плазмената глюкоза и висцералното затлъстяване за наличието на автономен дисбаланс спрямо другите метаболитни маркери при предиабет. Същевременно публикуваните до момента данни поставят въпроса дали инсулиновата резистентност е причина за автономна дисфункция или е следствие от съществуващо автономно увреждане (24).

Натрупват се все повече данни за връзка на възпалението със САД при захарен диабет тип 2 (39), при новооткрит захарен диабет тип 2 (40) и дори при здрави възрастни (41). Предполага се, че тази асоциация е опосредствана от холинергичните невронални пътища, упражняващи тоничен инхибиращ контрол върху врогените имунни реакции (42). За разлика от горепосоченото, данните от настоящото изследване не потвърждават връзка между нивата на hsCRP и автономния контрол при предиабет. Следователно са необходими по-задълбочени изследвания с оглед определяне на предиктивната стойност на маркерите за нискостепенно възпаление по отношение на диагностиката, тежестта и прогнозата на САД.

Заклучение

Затлъстяването и наличието на метаболитен синдром вероятно са свързани с нарушена парасимпатикусова функция при предиабет. Висцералното затлъстяване, възрастта, HbA_{1c} и гликемията сигнификантно повлияват промените в сърдечно-съдовата автономна функция при предиабет и вероятно повишават сърдечно-съдовия риск при тези лица. Нашите наблюдения дават основание да се търсят субклинични форми на САД още в ранните етапи на нарушения в глюкозния толеранс.

Настоящото изследване е финансирано от Медицински Университет, София, във връзка с одобрен научно-изследователски проект № 19-Д по договор №2-Д/2012г.

Assessment of Cardiovascular Autonomic Function in Prediabetes and its Correlation with Metabolic and Inflammatory Markers

Dimova, Romyana B., Tankova, Tzvetalina Iv., Chakarova, Nevena Y., Groseva, Greta G., Dakovska, Lilia N.

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

Address for correspondence:

Romyana Dimova, MD

Department of Diabetology,

Clinical Centre of Endocrinology

2, Zdrave str., Sofia 1431, Bulgaria

e-mail: dr.roumyana.dimova@gmail.com

Abstract

Aim: The aim of this study was to assess cardiovascular autonomic function (CAF) and its association with metabolic parameters and inflammatory markers in subjects with prediabetes.

Materials and methods: A total of 148 subjects – 91 females and 57 males (mean age 50,4±13,6 years, mean BMI 32,4±8,8 kg/m²) with pre diabetes were divided into 3 groups according to their glucose tolerance: 83 with impaired fasting glucose (IFG), 29 with impaired glucose tolerance (IGT) and 36 with IFG+IGT, into 5 groups according to BMI: 15 normal weight, 43 overweight, 48 obesity class I, 25 class II, and 17 class III and into 2 groups according to the presence of Metabolic syndrome (MetS) – 118 with MetS and 30 controls were enrolled in a cross-sectional study. Glucose tolerance was studied during OGTT applying 2006 WHO criteria. Anthropometric indices, blood pressure, serum lipids and hsCRP were measured. Body composition was estimated by impedance analysis (InBody 720). CAF was assessed by ANX-3.0 using frequency-domain analysis during standard clinical tests – deep breathing, Valsalva and standing from a seated position. Statistical analysis was performed using SPSS v.20.0.

Results: There was no significant difference in both sympathetic nervous system (SNS) and parasympathetic nervous system (PSNS) activity between the groups according to their glucose tolerance. A trend toward decreased PSNS function during deep breathing with the progression of obesity stage was observed (P=0,039). PSNS tone during deep breathing was diminished in the group with MetS as compared to controls (P=0,031) as well. A moderate to strong negative correlation between SNS and PSNS activity and age, visceral fat area, HbA_{1c} and glycemia was established. No significant correlation between autonomic tone and hsCRP was found.

Conclusion: Obesity and the presence of MetS might be associated with PSNS function deterioration in prediabetes. Central obesity, age, HbA_{1c} and glycemia significantly influence CAF alterations in prediabetes.

Key words: cardiovascular autonomic function, prediabetes, metabolic syndrome, cardiovascular risk, hsCRP.

Introduction

The results of a growing number of studies in different ethnic groups have shown that cardiovascular autonomic dysfunction (CAD) begins in the early stages of abnormal glucose homeostasis (1) and suggests its multifactorial modality and its relation not only to hyperglycemia, but also to other cardiovascular risk factors, such as low-grade inflammation, and components of the metabolic syndrome (MetS) that are often

combined with prediabetes and insulin resistance (2). Reduced heart rate variability (HRV) is considered a potential mechanism involved in sudden cardiac death in obese subjects. Therefore, in recent years there has been an increasing scientific interest in the assessment of cardiovascular autonomic function (CAF) in the presence of obesity and other metabolic abnormalities.

Association of CAD with obesity has been established in animal model studies, showing significantly reduced sympathetic activity (3). In human studies the

results are not so explicit as an abnormal HRV due to decreased parasympathetic (4) or sympathetic (5) function, or both (6), has been observed, and a paradoxically increased sympathetic nervous system activity has been found as well (4).

It still remains unclear whether total body fat or visceral adipose tissue contribute more to HRV deterioration. Some studies have shown greater significance of central obesity as a predictor of autonomic control impairments (7,8) while others have reported that total body fat is the strongest marker correlating with HRV (9).

At the same time CAD has been found to be associated with arterial hypertension (10-13) and dyslipidemia (9,14) as well, and CAF alterations have been observed even in healthy population (15). Therefore, it is necessary to evaluate each metabolic parameter simultaneously to clarify their individual contribution to HRV alterations. The presence of prediabetes allows the determination of how slight changes in blood glucose levels affect these relations.

The aim of this study was to assess CAF in different categories of prediabetes, at different stages of obesity, and in the presence of MetS as well as to investigate the association of CAF with several metabolic parameters and inflammatory markers – BMI, waist circumference, total body fat, visceral fat area, blood pressure, lipid profile, HbA_{1c}, glycemia, and hsCRP in subjects with prediabetes.

Material and Methods

A total of 148 subjects – 91 males and 57 females, mean age 50,4±13,6 (from 22 to 84 years), mean BMI 32,4±8,8 kg/m² with prediabetes were included in this cross-sectional study. They were divided into three groups according to their glucose tolerance: 83 with impaired fasting glucose (IFG), 29 with impaired glucose tolerance (IGT) and 36 with IFG+IGT, into 5 groups according to BMI: 15 normal weight, 43 overweight, 48 obesity class I, 25 class II, and 17 class III, and into 2 groups according to the presence of Metabolic syndrome (MetS) – 118 with MetS and 30 controls were enrolled in a cross-sectional study. The main characteristics of the groups are displayed in Tables 1, 2 and 3.

Participants were recruited at the Department of Diabetology, Clinical Centre of Endocrinology, Medical University Sofia within a screening program for diabetes mellitus.

The following exclusion criteria were adopted: presence of diabetes mellitus or taking anti-diabetic medications, arrhythmias or taking anti-arrhythmic drug therapy and experienced vascular events.

All subjects declared their written informed consent and were familiar with the aims, methods and risks of participating in the study in accordance with the Helsinki Declaration and rules of Good Clinical Practice, as the study was approved by the Ethics Committee of the Medical University, Sofia.

All participants were interviewed for the presence of diabetes mellitus and anti-diabetic therapy, arrhythmias and anti-arrhythmic drug administration, the presence of ischemic heart disease and experienced vascular events. Anthropometric parameters were measured – height, weight and waist circumference, and BMI was calculated. Categories of glucose tolerance were evaluated during a standard oral glucose tolerance test (OGTT) with 75 g anhydrous glucose after an overnight fast. Fasting and a 120-min plasma glucose were examined by a hexokinase enzyme method (Roche Diagnostics). The glucose tolerance was defined according to 2006 WHO criteria.

In all participants the following were assessed at fasting: serum lipid parameters (total cholesterol, HDL cholesterol and triglycerides using an enzymatic colorimetric method (Roche Diagnostics), LDL cholesterol was calculated using Friedewald's formula), HbA_{1c} (NGSP certified) in whole blood samples using immunoturbidimetric method (Roche Diagnostics) and high sensitive C-reactive protein (hsCRP) using a particle-enhanced turbidimetric method (CRP-Latex) (Roche Diagnostics).

Arterial blood pressure (BP) was measured in standard conditions. Body composition was estimated by impedance analysis (InBody 720). Visceral fat area was calculated in cm² and total body fat was presented in %.

The 2005 IDF definition of the MetS was used.

Autonomic nervous system function evaluation was performed with ANS-3.0 autonomic monitoring system (ANSAR Medical Technologies, Inc., Philadelphia, PA) – software that computes sympathetic (SNS) and parasympathetic (PSNS) nervous system activity using „frequency-domain“ analysis applying standard clinical tests: deep breathing challenge, valsalva maneuvers and stand challenge. The ANS-3.0 method, focused on the low-frequency range of the spectrum fixed between 0.04-0.15 Hz, computes sympathetic (Low Frequency area – LFa) and parasympathetic (Respiratory Frequency area – RFa) activity simultaneously and independently applying spectral analysis of Respiratory Activity – RA with concomitant spectral analysis of HRV.

As 49 subjects were presented with arterial hypertension (blood pressure >140/90 mmHg) on treatment with different classes of antihypertensive drugs, including beta- and alpha-blockers, the study was performed at least 24 hours after the last dose of medications affecting autonomic function – antihypertensives, tricyclic antidepressants and SSRIs, refraining from coffee and smoking 12 hours prior to the test, at least 30 minutes after the last meal and between 8-11am in the morning.

Statistical analysis of the data was performed by SPSS v.20.0 (SPSS, Chicago, USA). The data is expressed as mean ± standard deviation (SD) or median ± quartiles, depending on their distribution. Student's T-test, one-way analysis of variance (One-way

Table 1.

Main characteristics (number, gender distribution, mean age, body mass index (BMI) and sympathetic (LFa) and parasympathetic activity parameters at rest and during the clinical tests) of the participants in the groups according to glucose tolerance - with impaired fasting glucose (IFG), impaired glucose tolerance (IGT), and IFG+IGT.

Parameters	IFG	IGT	IFG+IGT	P
Number	83	29	36	
Sex (males/females)	39/44	6/23	12/24	
Age (years)	51,1±12,7*	43,5±14,2*	54,5±13,6*	P=0,004
BMI (kg/m ²)	33,2±10,8*	31,0±5,7*	31,8±5,3*	P=0,466
LFa at rest	1,4(0,6-2,6)**	2,1(1,3-4,0)**	1,1(0,6-3,0)**	P=0,059
RFa at rest	0,8(0,3-1,6)**	1,0(0,4-3,0)**	0,8(0,4-1,5)**	P=0,529
RFa - deep breathing	13,9(4,8-28,1)**	19,2(5,2-47,1)*	13,5(4,0-21,1)**	P=0,329
LFa - Valsalva maneuver	24,1(11,1-45,6)**	26,0(6,1-36,2)**	19,5(6,1-36,8)**	P=0,391
LFa - standing	1,6(0,8-4,2)**	2,1(0,7-5,4)**	1,2(0,5-3,0)**	P=0,274
RFa - standing	0,6(0,2-1,2)**	0,5(0,3-1,6)**	0,5(0,3-0,9)**	P=0,837

*Data is means ± SD; **Data is medians (IQR)

Table 2.

Main characteristics (number, gender distribution, mean age, body mass index (BMI) and sympathetic (LFa) and parasympathetic activity parameters at rest and during the clinical tests) of the participants in the groups according to body mass index (BMI) - with normal weight (BMI 18-24,9 kg/m²), overweight (BMI 25-29,9 kg/m²), obesity class I (ITM 30-34,9 kg/m²), obesity class II (BMI 35-39,9 kg/m²), and obesity class III (ITM ≥ 40 kg/m²).

Parameters	Normal weight	Overweight	Obesity class I	Obesity class II	Obesity class III	P
Number	15	43	48	25	17	
Sex (males/females)	4/11	16/27	23/25	7/18	7/10	
Age (years)	53,5±15,8*	54,1±14,1*	49,2±13,4*	46,0±13,0*	48,0±9,8*	P=0,115
BMI (kg/m ²)	23,2±1,7*	27,9±1,3*	32,3±1,5*	36,5±1,4*	46,7±18,0*	P<0,001
LFa at rest	1,7(0,9-3,3)**	1,3(0,5-1,9)**	1,7(0,7-3,4)**	1,8(0,8-2,8)**	1,9(0,4-3,1)**	P=0,286
RFa at rest	1,1(0,6-2,0)**	0,8(0,3-1,4)**	0,8(0,4-1,6)**	1,0(0,4-1,9)**	0,5(0,3-1,1)**	P=0,237
RFa - deep breathing	22,0(8,9-45,0)**	14,3(3,1-24,6)**	13,6(7,4-32,9)**	16,1(8,4-34,6)**	4,8(1,3-17,5)**	P=0,039
LFa - Valsalva maneuver	28,5(23,0-57,2)**	21,3(8,5-39,7)**	26,1(8,4-44,7)**	27,4(11,8-52,1)**	14,3(3,2-36,8)**	P=0,257
LFa - standing	2,3(1,5-3,6)**	1,1(0,5-2,7)**	2,0(0,9-5,8)**	1,3(0,7-3,6)**	1,3(0,3-5,3)**	P=0,219
RFa - standing	0,7(0,2-1,3)**	0,5(0,2-0,9)**	0,5(0,3-1,2)**	0,7(0,3-1,2)**	0,5(0,2-3,6)**	P=0,563

*Data is means ± SD; **Data is medians (IQR)

ANOVA) and the Kruskal-Wallis test was used to compare continuous variables. The Spearman rank correlation method was performed between different measured parameters. A P-value (two tailed) of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Our results showed no significant difference in CAF between the categories of prediabetes. There was a trend toward declined PSNS activity during deep

breathing with the progression of obesity stage (P=0,039). (Figure 1) A diminished PSNS tone during deep breathing in the group with MetS as compared to controls (P=0,031) was observed as well (Figure 2).

A moderate to strong negative correlation between all autonomic parameters and visceral fat area, age, HbA_{1c}, fasting plasma glucose and 120 min plasma glucose was found. A moderate negative correlation between LFa at rest, RFa during deep breathing, LFa during Valsalva maneuver and total body fat

was established; and a moderate positive correlation between SNS tone indices and diastolic BP was shown. hsCRP demonstrated no significant correlation with CAF indicators (Table 4).

Discussion

Direct comparison between the categories of prediabetes in this study shows no significant difference in autonomic tone. Contrary to our findings Min et al. have established a negative correlation between all HRV parameters and fasting plasma glucose levels (12), supported by the results of Hemingway's study in males (10), Koskinen's in females (11), and Soares-Miranda's in young adults (13), whilst Assoumou et al. have reported no association between the presence of IFG and CAF (16). According to other studies, reduced parasympathetic tone as the first manifestation of CAD occurs in IGT, but not in IFG (17). Data divergency is largely reflected by the different methodologies set out in these studies.

This study demonstrates a significant depression only in PSNS function during deep breathing with the progression of obesity stage as well as in the presence of MetS in prediabetes. According to Vinik's classification of CAD stages based on the high-sensitive ANX-3.0 method applied in the present study, our data meet the criteria for peripheral autonomic neuropathy with early PSNS weakness, which we recorded at the stage of prediabetes, and relative SNS hyperactivity as well as subsequent SNS weakness (18). Therefore, the natural history of progression of CAD in the context of impaired glucose homeostasis initially affecting the parasympathetic division of ANS with prevalence of SNS activity without any denervation followed by SNS involvement probably starts long before diabetes manifestation (19). This statement is supported by findings of histologic examination of skin biopsies in patients with IGT and diabetes of short duration where similar morphological changes and loss of autonomic nerve fibers have been observed (20).

The published data on the relationship between obesity and CAF is rather conflicting. Findings based on two studies are quite similar to ours, demonstrating a significant correlation between BMI and CAD (8, 21), whilst a great deal of other studies do not support this association (9, 22). Tentolouris et al. have reported similar results, indicating increased sympathetic and decreased parasympathetic activity in MetS (23). As parasympathetic superficial nerve fibers are affected earlier in conditions of increasing metabolic risk, Chang et al. (24) have established reduced PSNS activity in the presence of a single metabolic risk factor without insulin resistance whereas the accumulation of more metabolic components leads to the development of insulin resistance with subsequent sympathetic involvement. Therefore, this study is in support of

the assumption that autonomic balance abnormalities appear in the early stages of the development of MetS affecting PSNS activity and the aggravation of metabolic disorders results in SNS hyperactivity associated with pronounced insulin resistance (25, 26). Whether obesity is the driver of MetS (27) or autonomic dysfunction is a major contributor to hypothalamic-pituitary-adrenal axis disturbances (28) remains unclear. It is essential to envisage that, as a mortality predictor even in subjects without cardiovascular disease (29), reduced parasympathetic tone carries a serious risk in individuals with prediabetes and severe obesity or the presence of MetS.

Our previous findings have shown a significant deterioration in both SNS and PSNS activity during all applied clinical tests in subjects with NGT and extreme obesity or the presence of MetS as compared to controls. [30] Therefore, it might be inferred that in the presence of abnormal glucose tolerance plasma glucose level appears to be a stronger predictor of autonomic imbalance rather than other metabolic parameters. This statement corresponds to our results establishing negative correlation of all HRV parameters with HbA_{1c} and glycemia in prediabetes.

There are only few studies focused on comparing different indicators of body fat distribution with the presence of CAD. Our results demonstrate a moderate to strong negative correlation of visceral fat area, reflecting central obesity, with all parameters of both SNS and PSNS activity, whilst only a moderate negative correlation between total body fat, reflecting general obesity, and LFa at rest and during Valsalva and RFa during deep breathing is established. The literature data is in accordance with our findings. The majority of studies have found a stronger correlation of abdominal fat accumulation with the stage of autonomic imbalance. Windham and Christou pointed out a reduced SNS and PSNS tone in central as compared to general obesity (22, 31). The results of Assoumou and Koskinen have defined waist circumference as the strongest predictor of reduced HRV (11,16). Beske et al. have established an independent correlation between visceral fat mass and reduced baroreceptor reflex in males (32). Farah and Damodaran have observed CAD manifested by vagal hypoactivity and sympathetic hyperactivity in the state of central fat accumulation (7, 33). In the study of Laitinen et al. a correlation between CAD and visceral obesity in subjects with IGT is highlighted as well (34). Only a few studies have established a correlation of total body fat accumulation with alterations in HRV (3-6). The stronger association of CAF with visceral fat accumulation is not surprising. It is well-known that insulin resistance correlates predominantly with visceral fat rather than with total body fat (35). ANS innervates fat depots which are positively associated with the production of catecholamines from autonomic nerves (36). The

Table 3.

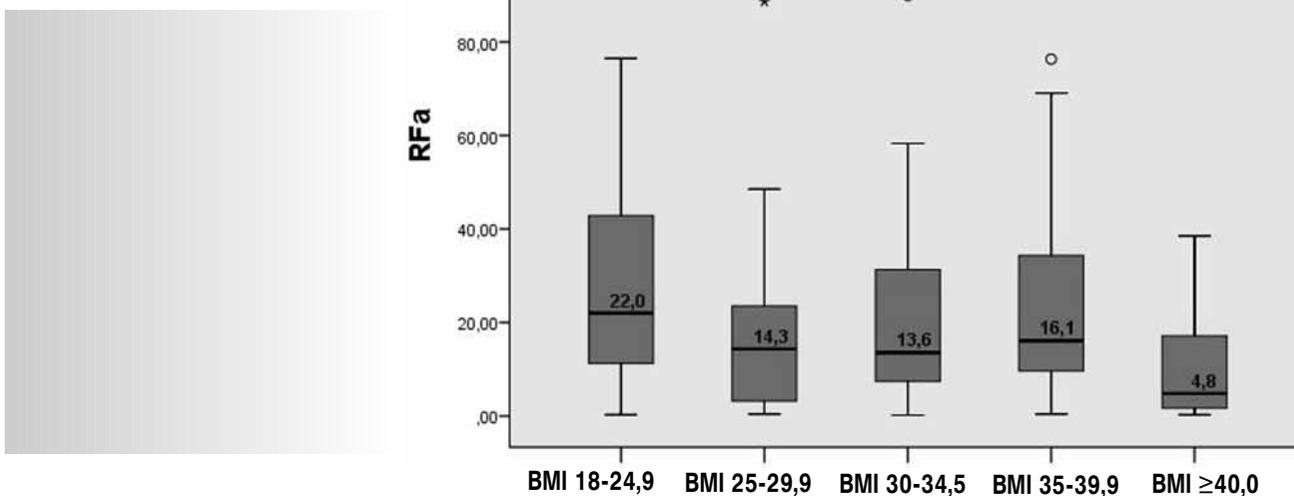
Main characteristics (number, gender distribution, mean age, body mass index (BMI) and sympathetic (LFa) and parasympathetic activity parameters at rest and during the clinical tests) of the participants in the groups with and without Metabolic syndrome (MetS).

Parameters	MetS+	MetS-	P
Number	118	30	
Sex (males/females)	49/8	69/22	
Age (years)	50,1±12,9*	51,5±16,3*	P=0,611
BMI (kg/m ²)	33,5±9,3*	28,2±4,7*	P=0,003
LFa at rest	1,5(0,7-2,7)**	1,7(0,8-3,6)**	P=0,340
RFa at rest	0,8(0,4-1,6)**	1,0(0,4-2,2)**	P=0,247
RFa Deep breathing	12,9(4,5-25,4)**	20,5(12,5-39,5)**	P=0,031
LFa Valsalva maneuver	22,0(7,1-42,0)**	25,7(15,4-43,0)**	P=0,486
LFa standing	1,5(0,6-3,8)**	1,9(0,5-5,3)**	P=0,652
RFa standing	0,5(0,3-1,2)**	0,6(0,4-1,3)**	P=0,381

*Data is means ± SD; **Data is medians (IQR)

Figure 1.

Parasympathetic (RFa) activity during Deep breathing in the groups according to body mass index (BMI) – with normal weight (BMI 18-24,9 kg/m²), overweight (BMI 18-24,9 kg/m²), obesity class I (BMI 30-34,9 kg/m²), obesity class II (BMI 35-39,9 kg/m²), and obesity class III (BMI ≥ 40 kg/m²).



underlying biological mechanism responsible for the contribution of visceral fat mass to CAF impairments is probably related to the production and secretion of a variety of cytokines (37).

In terms of BP our results present a moderate positive correlation between diastolic BP and all LFa parameters. There are some data for the relationship of systolic and diastolic BP with decreased SNS and PSNS activity (10,12), whereas other studies have documented the association of isolated systolic BP increase with elevated LF/HF ratio in women, [11] or have found no association of arterial hypertension with autonomic function (16, 38).

Hyperinsulinemia, endothelial dysfunction and

overproduction of cytokines are likely accompanying mechanisms for the development of CAD (19) at the very early stages of glucose disorders. These pathways largely explain our results demonstrating a stronger predictive value of plasma glucose and visceral obesity for the presence of autonomic imbalance in comparison to other metabolic markers in prediabetes. Meanwhile, the published data raise the question whether insulin resistance is a cause of autonomic dysfunction or a consequence of existing autonomic damage (24).

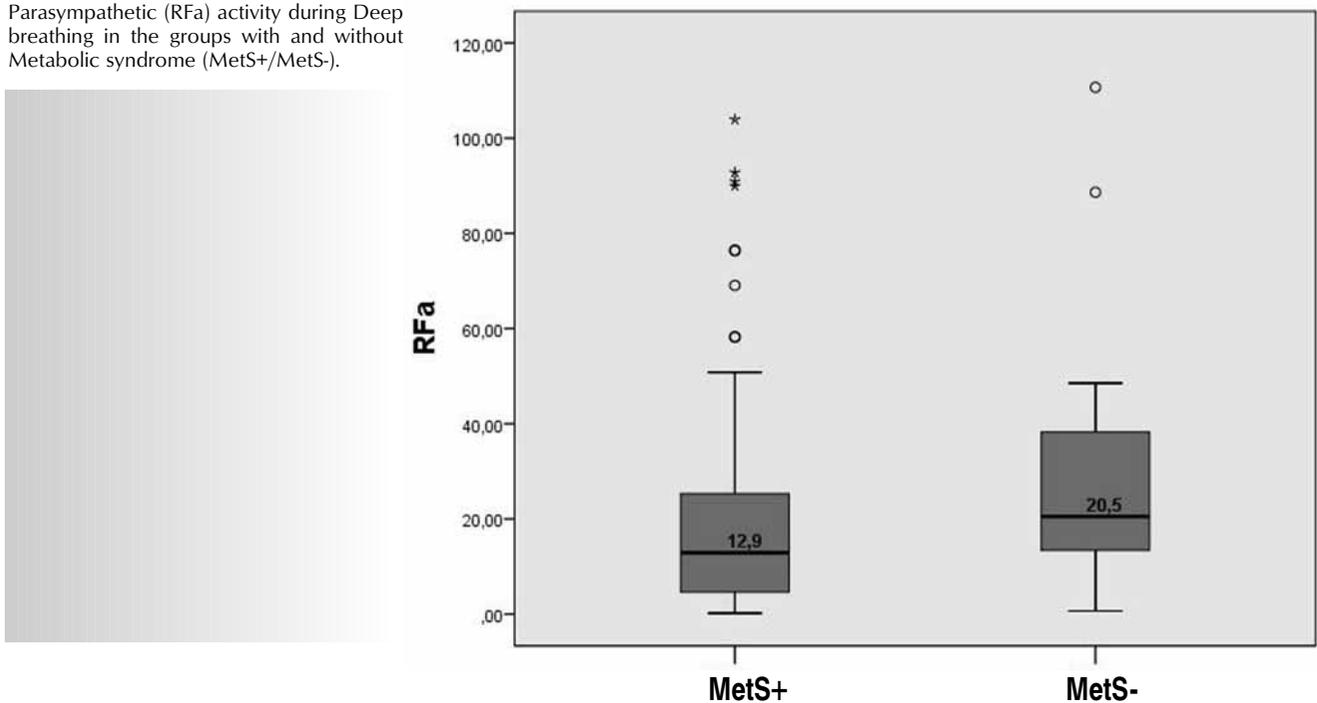
There has been accumulating data on the relation between low-grade inflammation and CAD in type 2

Table 4. Correlation between sympathetic (LFa) and parasympathetic (RFa) activity at rest and during clinical tests - deep breathing, Valsalva and standing from a seated position, and studied metabolic parameters (BMI, waist circumference, % body fat, visceral fat area, systolic and diastolic blood pressure (BP), total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, HbA_{1c}, fasting glucose 120 min glucose), and hsCRP.

Parameters	means±SD	LFa at rest		RFa - at rest		RFa - at rest Deep breathing		LFa - Valsalva maneuver		LFa standing		RFa standing	
		Corr Coeff (r)	P	Corr Coeff (r)	P	Corr Coeff (r)	P	Corr Coeff (r)	P	Corr Coeff (r)	P	Corr Coeff (r)	P
Age	50,4±13,6	-0,62	<0,001	-0,58	<0,001	-0,57	<0,001	-0,41	<0,001	-0,65	<0,001	-0,51	<0,001
BMI	32,4±8,8	0,02	0,802	-0,04	0,600	-0,07	0,392	-0,06	0,444	0,05	0,563	0,08	0,356
Waist	105,7±14,5	0,03	0,711	-0,09	0,297	-0,06	0,463	-0,03	0,701	0,01	0,941	-0,04	0,621
% bodyfat	37,4±9,2	-0,16	0,049	-0,11	0,184	-0,21	0,012	-0,19	0,025	-0,13	0,111	-0,02	0,805
Visceral fat	161,6±45,0	-0,22	0,008	-0,28	<0,001	-0,30	<0,001	-0,21	0,010	-0,22	0,006	-0,20	0,014
Systolic BP	126,5±15,7	-0,10	0,241	-0,20	0,016	-0,11	0,206	0,06	0,440	-0,05	0,560	-0,08	0,346
Dyastolic BP	77,2±11,5	0,21	0,009	0,11	0,194	0,10	0,246	0,16	0,049	0,17	0,037	0,07	0,395
Total cholesterol	5,2±1,1	-0,07	0,395	-0,12	0,149	-0,12	0,156	-0,02	0,829	-0,04	0,651	-0,08	0,362
HDL cholesterol	1,2±0,4	-0,11	0,201	0,04	0,601	-0,07	0,409	-0,02	0,798	-0,05	0,520	0,07	0,401
LDL cholesterol	3,2±1,0	-0,05	0,565	-0,08	0,351	-0,11	0,209	-0,02	0,817	-0,03	0,696	-0,06	0,464
Triglycerides	1,7±1,4-0,07	0,373	-0,18	0,028	-0,05	0,521	0,01	0,933	-0,07	0,431	-0,12	0,161	
HbA _{1c}	5,9±0,4	-0,30	<0,001	-0,20	0,023	-0,31	<0,001	-0,24	0,004	-0,30	<0,001	-0,16	0,046
Fasting glucose	6,4±0,7	-0,36	<0,001	-0,24	<0,001	-0,28	<0,001	-0,1	0,116	-0,27	<0,001	-0,20	<0,001
120 min glucose	7,4±1,8	-0,20	0,002	-0,16	0,011	-0,22	<0,001	-0,21	<0,001	-0,21	<0,001	-0,17	0,008
hsCRP	4,4±1,6	-0,04	0,665	-0,05	0,584	-0,13	0,123	-0,16	0,060	-0,03	0,711	0,03	0,721

Figure 2.

Parasympathetic (RFa) activity during Deep breathing in the groups with and without Metabolic syndrome (MetS+/MetS-).



diabetes (39), in newly-diagnosed type 2 diabetes (40), and even in healthy adults (41). It has been assumed that this association is mediated by cholinergic pathways exerting tonic inhibition on innate immune responses (42). Contrary to the above our findings on the relationship of hsCRP with the autonomic control shows no significant correlation in prediabetes. Thus, more extensive research is needed to determine the predictive value of low-grade inflammatory markers in regards to diagnosis, severity and prognosis of CAD.

Conclusion

Obesity and the presence of MetS might be associated with PSNS function deterioration in prediabetes. Central obesity, age, HbA1c, and glycemia significantly influence CAF alterations in prediabetes and probably elevate cardiovascular risk in these subjects. Our findings provide evidence for searching for subclinical autonomic dysfunction in subjects in the early stages of glucose intolerance.

This study was supported by grant No.19-D/2012 of Medical University, Sofia, Bulgaria.

References

КНИГОИС

1. Singleton JR, Smith AG, Russell JW, Feldman EL. Microvascular Complications of Impaired Glucose Tolerance. *Diabetes* 2003; 52: 2867-2873.
2. Gaede P, Vedel P, Parving HH, Pedersen O. Intensified multifactorial intervention in patients with type 2 diabetes mellitus and microalbuminuria: the Steno type 2 randomised study. *Lancet* 1999; 353: 617-622.
3. Bray GA. Obesity, a disorder of nutrient partitioning: the MONA LISA hypothesis. *J Nutr* 1991; 121: 1146-1162.
4. Zahorska-Markiewicz B, Kuagowska E, Kucio C, Klin M. Heart rate variability in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1993; 17: 21-23.
5. Peterson HR, Rothschild M, Weinberg CR, Fell RD, McLeish KR, Pfeifer MA. Body fat and the activity of the autonomic nervous system. *N Engl J Med* 1988; 318: 1077-1083.
6. Sztajzel J, Golay A, Makoundou V, Lehmann TN, Barthassat V, Sievert K, et al. Impact of body fat mass extent on cardiac autonomic alterations in women. *Eur J Clin Invest* 2009; 39: 649-656.
7. Farah BQ, do Prado WL, Tenório TR, Ritti-Dias RM. Heart rate variability and its relationship with central and general obesity in obese normotensive adolescents. *Einstein (Sao Paulo)* 2013; 11: 285-290.
8. Laederach-Hofmann K, Mussgay L, Ruddle H. Autonomic cardiovascular regulation in obesity. *J Endocrinol* 2000; 164: 59-66.
9. Poliakova N, Després JP, Bergeron J, Almérás N, Tremblay A, Poirier P. Influence of obesity indices, metabolic parameters and age on cardiac autonomic function in abdominally obese men. *Metabolism* 2012; 61: 1270-1279.

10. Hemingway H, Shipley M, Brunner E, Shipley M, Brunner E, Britton A et al. Does autonomic function link social position to coronary risk? The Whitehall II study. *Circulation* 2005; 111: 3071-3077.
11. Koskinen T, Kähönen M, Jula A, Mattsson N, Laitinen T, Keltikangas-Järvinen L, et al. Metabolic syndrome and short-term heart rate variability in young adults: The cardiovascular risk in young Finns study. *Diabet Med* 2009; 26: 354-361.
12. Min KB, Min JY, Paek D, Cho SI. The impact of the components of metabolic syndrome on heart rate variability: Using the NCEP-ATP III and IDF definitions. *Pacing Clin Electrophysiol* 2008; 31: 584-591.
13. Soares-Miranda L, Sandercock G, Vale S, Santos R, Abreu S, Moreira C et al. Metabolic syndrome, physical activity and cardiac autonomic function. *Diabetes Metab Res Rev* 2012; 28: 363-369.
14. Kimura T, Matsumoto T, Akiyoshi M, Owa Y, Miyasaka N, Aso T, et al. Body fat and blood lipids in postmenopausal women are related to resting autonomic nervous system activity. *Eur J Appl Physiol* 2006; 97: 542-547.
15. Umetani K, Singer DH, McCraty R, Atkinson M. Twenty-four hour time domain heart rate variability and heart rate: relations to age and gender over nine decades. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 593-601.
16. Assoumou HGN, Pichot V, Barthelemy JC, Dauphinot V, Celle S, Gosse P, et al. Metabolic syndrome and short-term and long-term heart rate variability in elderly free of clinical cardiovascular disease: The PROOF study. *Rejuvenation Research* 2010; 13: 653-663.
17. Wu JS, Yang YC, Lin TS, Huang YH, Chen JJ, Lu FH, et al. Epidemiological evidence of altered cardiac autonomic function in subjects with impaired glucose tolerance but not isolated impaired fasting glucose. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 3885-3889.
18. Vinik AI, Aysin B, Colombo J. Differentiation of autonomic dysfunction by enhanced frequency domain analysis reveals additional stages in the progression of autonomic decline in diabetics. 5th Annual Diabetes Technology Meeting. San Francisco, CA. 10-12 November 2005.
19. Vinik AI, Ziegler D. Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. *Circulation* 2007; 115: 387-397.
20. Smith AG, Tripp C, Singleton JR. Skin biopsy findings in patients with neuropathy associated with diabetes and impaired glucose tolerance. *Neurology* 2001; 57: 1701-1704.
21. Piestrzeniewicz K, Luczak K, Lelonek M, Wranicz JK, Goch JH. Obesity and heart rate variability in men with myocardial infarction. *Cardiol J* 2008; 15: 43-49.
22. Windham BG, Fumagalli S, Ble A, Sollers JJ, Thayer JF, Najjar SS, et al. The Relationship between Heart Rate Variability and Adiposity Differs for Central and Overall Adiposity. *J Obes* 2012; 2012: 149516.
23. Tentolouris N, Argyrakopoulou G, Katsilambros N. Perturbed autonomic nervous system function in metabolic syndrome. *Neuromolecular Med* 2008; 10: 169-178.
24. Chang CJ, Yang YC, Lu FH, Lin TS, Chen JJ, Yeh TL, et al. Altered cardiac autonomic function may precede insulin resistance in metabolic syndrome. *Am J Med* 2010; 123: 432-438.
25. Lambert GW, Straznicki NE, Lambert EA, Dixon JB, Schlaich MP. Sympathetic nervous activation in obesity and the metabolic syndrome - Causes, consequences and therapeutic implications. *Pharmacol Ther* 2010; 126: 159-172.
26. Mancia G, Bousquet P, Elghozi JF, Esler M, Grassi G, Julius S, et al. The sympathetic nervous system and the metabolic syndrome. *J Hypertens* 2007; 25: 909-920.
27. Tentolouris N, Liatis S, Katsilambros N. Sympathetic system activity in obesity and metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1083: 129-152.
28. Buijs RM, Kreier F. The metabolic syndrome: a brain disease? *J Neuroendocrinol* 2006; 18: 715-716.
29. Dekker JM, Schouten EG, Klootwijk P, Pool J, Swenne CA, Kromhout D. Heart rate variability from short electrocardiographic recordings predicts mortality from all causes in middle-aged and elderly men. The Zutphen Study. *Am J Epidemiol* 1997; 145: 899-908.
30. Dimova R, Tankova T, Chakarova N, Groseva G, Dakovska L. The relation between cardiovascular autonomic dysfunction and metabolic parameters and hsCRP in normoglycemia. *Endokrinologia* 2014, 1: 36-58.
31. Christou DD, Jones PP, Pimentel AE, Seals DR, et al. Increased abdominal-to-peripheral fat distribution contributes to altered autonomic-circulatory control with human aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: 1530-1537.
32. Beske SD, Alvarez GE, Ballard TP, Davy KP. Reduced cardiovagal baroreflex gain in visceral obesity: implications for the metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: 630-635.
33. Damodaran A, Kabal B. Autonomic Dysfunction in Central Obesity. *World J Med Sci* 2013; 8: 118-122.
34. Laitinen T, Lindström J, Eriksson J, Ilanne-Parikka P, Aunola S, Keinänen-Kiukaanniemi S et al. Cardiovascular autonomic dysfunction is associated with central obesity in persons with impaired glucose tolerance. *Diabet Med* 2011; 28: 699-704.
35. Despres JP. Targeting abdominal obesity and the metabolic syndrome to manage cardiovascular disease risk. *Heart* 2009; 95: 1118-1124.
36. Dart AM, Du XJ, Kingwell BA. Gender, sex hormones and autonomic nervous control of the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 678-687.
37. Penn DM, Jordan LC, Kelso EW, Davenport JE, Harris RB. Effects of central or peripheral leptin administration on norepinephrine turnover in defined fat depots. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 291: 1613-1621.
38. Chang YW, Lin JD, Chen WL, Yen CF, Loh CH, Fang WH, et al. Metabolic syndrome and short-term heart rate variability in adults with intellectual disabilities. *Res Dev Disabil* 2012; 33: 1701-1707.
39. Anan F, Takahashi N, Nakagawa M, Ooie T, Saikawa T, Yoshimatsu H. High-sensitivity C-reactive protein is associated with insulin resistance and cardiovascular autonomic dysfunction in type 2 diabetic patients. *Metabolism* 2005; 54: 552-558.
40. Lieb DC, Parson HK, Mamikunian G, Vinik AI. Cardiac Autonomic Imbalance in Newly Diagnosed and Established Diabetes Is Associated with Markers of Adipose Tissue Inflammation. *Exp Diabetes Res* 2011; 2012: 1-8.
41. Thayer JF, Fischer JE. Heart rate variability, overnight urinary norepinephrine and C-reactive protein: evidence for the cholinergic anti-inflammatory pathway in healthy human adults. *J Intern Med* 2009; 265: 439-447.
42. Vinik AI, Erbas T, Casellini CM. Diabetic cardiac autonomic neuropathy, inflammation and cardiovascular disease. *J Diabetes Investig* 2013; 4: 4-18.

Пациентите с пролактином са предразположени към автоимунен хипотиреоидизъм: данни от крос-секционно ретроспективно проучване в един специализиран клиничен център

Еленкова, Атанаска П., Василев, Владимир В., Вълчева, Силвия Ж., Димитров, Христо А., Чаръкчиев, Димитър Д., Захариева, Сабина З.

Клиничен център по Ендокринология и Геронтология, Медицински университет, София

Адрес за кореспонденция:

Доц. д-р Атанаска Еленкова

УСБАЛЕ „Акад. Иван Пенчев“

ул. „Здраве“ №2; София 1431

e-mail: atanaska@gmail.com

Резюме

Увод: Пролактинът е мощен имуномодулатор, повлияващ както клетъчно-медиацията, така и хуморалния имунен отговор на много нива: регулация на Т- и В-клетъчната матурация, инхибиране на негативната селекция на автореактивните В-лимфоцити, стимулиращ ефект върху имуноглобулиновата продукция и антигенна презентация.

Целта на настоящото проучване беше да се определи честотата на автоимунните тироидни заболявания (АИТЗ) сред пациентите с пролактиноми.

Материал и методи: Ретроспективно крос-секционно проучване на базата на анализ на медицинските досиета на 486 пациенти (430 жени и 56 мъже), диагностицирани и проследявани в един специализиран клиничен център.

Резултати: АИТЗ бяха установени при 27,6% от всички участници в проучването (29,8% от жените и 10,7% от мъжете с пролактином). При 1,59% от всички изследвани лица е диагностициран хипертиреоидизъм (1,72% сред жените с пролактином). Честотата на спонтанния автоимунен хипотиреоидизъм е 13,3% при мъжете (10% субклиничен/ 3,3% явен) и 16,7% при жените (12,5% субклиничен/ 4,2% явен).

Изводи: Получените резултати ни дават основание да погодим повишен риск от развитие на автоимунен хипотиреоидизъм при пациентите с пролактином. Имуномодулаторното действие на пролактина в супрафизиологични нива вероятно съучаства в патогенезата и клиничното протичане на АИТЗ при генетично предразположени лица с пролактином.

Ключови думи: пролактином; хиперпролактинемия; автоимунни тироидни заболявания

Въведение

Експериментални *in vitro* проучвания демонстрират мощното имуномодулаторно действие на хормона пролактин (PRL) върху клетъчно-медиацията и хуморалния имунен отговор. Този ефект се осъществява на няколко нива: чрез регулация на Т- и В-клетъчната матурация, инхибиране на негативната селекция на автореактивните В-лимфоцити, стимулиращ ефект върху имуноглобулиновата продукция и антигенната

презентация, анти-апоптотично действие (1-4). Редица наблюдателни проучвания установяват хиперпролактинемия при значителен процент пациенти с различни автоимунни заболявания като системен лупус еритематозес (SLE), ревматоиден артрит (RA), склеродермия, синдром на Sjogren, болест на Addison, тироидит на Hashimoto, псориазис и др. (5-8). Някои изследователски колективи дори намират позитивна корелация между пролактиновите нива и клиничната и имунологична активност при някои от тези заболявания (SLE, RA, множествена склероза),

дабайки им основание да подозират важна роля на PRL в тяхната патогенеза (7, 9-11). Едно ново проучване демонстрира по-висок риск от развитие на серозит (всички форми) и анемия при хиперпролактинемичните пациенти с лупус (12). От друга страна, обратната зависимост – каква е честотата на автоимуните заболявания при лица с хиперпролактинемия, е все още недостатъчно изследвана. Публикувани са малки лабораторни студии, установяващи повишени нива на различни авто-антитела при пациенти с различни форми на хиперпролактинемия (13,14). Клиничните проучвания по този въпрос се свеждат до две малки проспективни студии тип случай-контрола, установяващи сигнификантно по-голям обем на щитовидната жлеза, както и по-висока честота на лицата с позитивни тиреоидни автоантитела и нодозна струма при болните с хиперпролактинемия (15, 16). В съответствие с тези литературни данни са и резултатите от едно наше все още непубликувано ретроспективно проучване при белгийски пациенти с пролактином, при което установихме АИТЗ при 21,0% от участниците (23,2% от жените и 12,6% от мъжете) (17). Като се вземе под внимание разликата в йодния статус на двете гържави (Белгия е страна с лек йоден дефицит, България – с адекватен йоден прием) допуснахме, че честотата на АИТЗ сред българските пациенти с пролактином е дори по-висока.

Материал и методи

Извършено беше ретроспективно крос-секционно проучване при 486 пациента на възраст над 18г., диагностицирани с пролактином и проследени в интервала 1980г.–2011г. в един специализиран клиничен център – Университетската Болница по Ендокринология и Геронтология, София. Използвани бяха два основни източника на данни за участниците в проучването: болничната информационна система, съхраняваща в електронен вид данните от всички хоспитализации и хартиените пациентски досиета (история на заболяването), съхранявани в болничния архив. В проучването бяха включени само пациенти със сигурна диагноза пролактином, поставена на базата на съвременните препоръки за диагностика и лечение на тези хипофизни тумори (18). Изгубените от проследяване, починалите пациенти, както и тези с функционална хиперпролактинемия, бяха изключени от проучването. Допълнителни изключващи критерии при анализа на тиреоидната функция бяха още: хипопитуитаризъм (независимо от формата и тежестта), анамнеза за тиреоидна хирургична интер-

венция или експозиция на всякакви фактори с потенциално влияние върху функцията на щитовидната жлеза (иррадиация в шийната област, прием на някои лекарства и др.).

Наличие на автоимунно тироидно заболяване (АИТЗ) беше прието само в случаите, отговарящи на поне 2 от следните критерии: 1. Дифузна нехомогенна хипоехогенна ехографска структура на щитовидната жлеза (с или без нодозни промени); 2. Позитивни анти-тиреоидни автоантитела (над горната референтна граница на нормата съобразно използвания кит): анти-тиреопероксидазни (Анти-ТРО), анти-тиреоглобулинови (Анти-TG) и/или анти-TSH-рецепторни антитела (TRAbs); 3. Нарушена тиреоидна функция на базата на записите, касаещи нивата на тиреоид-стимулиращия хормон (TSH), свободния тироксин (FT₄) и свободния трийодтиронин (FT₃). **Субклиничният хипертиреоидизъм** беше дефиниран като състояние със супресирани нива на TSH при нормални нива на FT₄ и FT₃; **манифестен (явен) хипертиреоидизъм** - при потиснати нива на TSH в съчетание с повишени нива на FT₄ и/или FT₃; **субклиничен хипотиреоидизъм** - при повишени над горната референтна граница нива на TSH и нормални нива на FT₄ и FT₃; **манифестен (явен) хипотиреоидизъм** - при повишени нива на TSH в съчетание с намалени под долната граница на нормата нива на тиреоидните хормони (19).

Обработката на данните беше извършена с помощта на статистически пакет SPSS за Windows версия 16.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Метричните променливи бяха представени като средна стойност и стандартно отклонение или като медиана и межквартилен размах в зависимост от разпределението на извадката (определено чрез теста на Колмогоров-Смирнов). Неметричните променливи бяха представени чрез относителни честоти (в проценти). За откриване на разликите между групите на пациентите с АИТЗ и без АИТЗ беше приложен точният тест на Фишер. За статистически значими бяха приемани нива на $P < 0,01$.

Резултати

В проучването бяха включени 486 пациенти от Кавказката раса (430 жени и 56 мъже) на средна възраст $33,1 \pm 10,2$ г. ($14,2-75,0$ г.) при диагностицирането на пролактинома и $40,3 \pm 10,5$ г. ($18,1-76,3$ г.) към момента на анализа. Средните пролактинови нива при поставяне на диагнозата пролактином бяха $4791,39$ mIU/l (медиана: 2550 mIU/l; интервал: $1001 - 112 099$ mIU/l). Макроаденоми (тумори с размер ≥ 10 mm) бяха визуализирани чрез образна диагностика (СТ или МРТ)

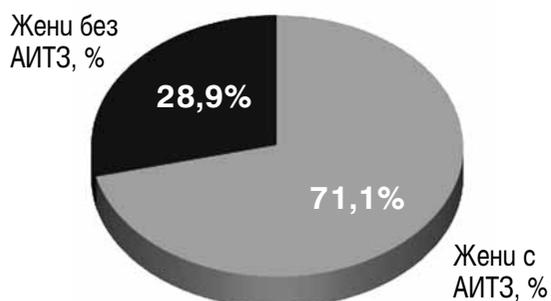
Таблица 1. Основни характеристики на подгрупите: пациенти с АИТЗ спрямо пациенти без АИТЗ.

	Пациенти с АИТЗ (n=134)	Пациенти без АИТЗ (n=352)	Точен критерий на Fisher (P)
Жени/Мъже (съотношение)	128/6 (21:1)	302/50 (6:1)	0,002
Възраст при диагностициране на пролактинома, год.	34,94±10,0	32,40±10,2	0,005
Възраст към момента на проучването, год.	40,90±10,7	38,66±11,0	0,008
Макроаденоми, брой (%)	20 (14,9%)	65 (18,5%)	0,423
Неврохирургично лечение, брой случаи	16 (11,9%)	56 (15,9%)	0,318
ПРЛ при диагностициране на пролактинома, ср. стойност; интервал; mIU/l	5293 (1002-112099)	4567 (1001-87600)	0,908

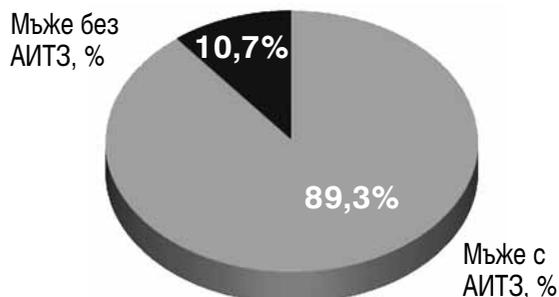
Таблица 2. Честота на хипотиреоидизъм при различните възрастови групи пациенти с пролактином.

Брой Мъже/Жени	Възрастови групи		
	18-39 год. (n=256; 15/241)	40-59 год. (n=164; 9/155)	60-79 год. (n=18; 6/12)
Общо (Субклиничен+Явен)	32 (12,5%)	36 (21,3%)	4 (27,8%)
Жени	30 (12,4%)	35 (22,6%)	3 (25,0%)
Мъже	2 (13,3%)	1 (11,1%)	1 (16,7%)
Субклиничен хипотиреоидизъм	27 (10,5%)	24 (14,6%)	3 (10,9%)
Жени	25 (10,4%)	24 (15,5%)	2 (16,7%)
Мъже	2 (13,3%)	∅	1 (16,7%)
Явен хипотиреоидизъм	5 (2,0%)	12 (6,7%)	1 (7,1%)
Жени	5 (2,1%)	11 (7,1%)	1 (8,3%)
Мъже	∅	1 (11,1%)	∅

Фигура 1А. Честота на аутоимунните тироидни заболявания (АИТЗ) при жените с пролактином.



Фигура 1Б. Честота на аутоимунните тироидни заболявания (АИТЗ) при мъжете с пролактином.



при 10,9 % (n=47) от жените и 67,8% (n=38) от мъжете. Неврохирургична интервенция беше извършена при 72 пациенти (14,8%; 34 жени/38 мъже). Хипопитуитаризъм (всички форми с изключение на транзиторен изолиран хиперпролактинемичен хипогонадотропен хипогонадизъм) беше регистриран при 9,9% от всички участници (n=48; 42 оперирани и 6 неоперирани).

На базата на горепосочените критерии установихме АИТЗ при 27,6% от всички участващи в проучването лица (n=134; 128 жени/6 мъже). Честотата на АИТЗ беше 29,8% сред жените и 10,7% сред мъжете с пролактином (Фигура 1). При 57,5% от пациентите диагнозата пролактином предшества хронологично изявата на АИТЗ със средно 4,02 г. (от 1 до 20 г.); при 32,1% двете заболявания са диагностицирани едновременно и само при 10,4% първо е диагностицирано АИТЗ. Дифузна нехомогенна хипоехогенна структура на щитовидната жлеза при ултразвуковото изследване беше описана при 87,3% (n=117), а дифузни и нодозни промени – при 12,7% (n=17) от пациентите с АИТЗ. Регионална шийна лимфаденомегалия беше документирана при 32,8% (n=44) от тях.

Позитивни анти-тиреоидни ауто-антитела бяха наблюдавани при 77,6% от пациентите с документи-

рано АИТЗ: 94,2% от тях (98 пациенти) имаха позитивни Anti-TPO; 43,3% (45 пациенти) бяха с позитивни Anti-TG и 6,7% (7 пациенти) бяха с положителни TRAbs. При останалите 22,4% (8 лица с негативни анти-тиреоидни антитела и 22 лица с липсващи данни относно тези параметри) диагнозата АИТЗ беше поставена на базата на едновременно наличие на ехографски дифузна нехомогенна хипоехогенна тироидна структура и нарушена тироидна функция – спонтанен хипотиреоидизъм (26 случая със субклиничен и 4 с явен хипотиреоидизъм).

Анализът на тироидната функция се базираше на медицинските записи на 438 пациенти с пролактином от болничната база данни (408 жени/30 мъже). Съобразно протокола на проучването пациентите с хипопитуитаризъм (n=48; 26 мъже/22 жени) бяха изключени от този анализ с цел да се избегне неточна интерпретация на нивата на TSH (фалшиво ниски нива при пациентите с вторичен хипотиреоидизъм в рамките на хипопитуитаризъм). Базедова болест (хипертиреоидизъм с позитивни TRAbs) беше регистриран при 7 жени с пролактином и при нито един от мъжете. Така изчислената честота на хипертиреоидизма беше 1,72% сред жените с пролактином и 1,59% сред всички лица с пролактином. Стабилно еутиреоидно състояние (от момента на диагностициране до момента на извършване на проучването) имаше при 50 (41,1%) от всички пациенти с АИТЗ.

Извършихме сравнителен подгрупов анализ между пациентите с АИТЗ и тези без АИТЗ (Таблица 1). Като се изключи малко по-високата средна възраст и 4 пъти по-високо съотношение жени-мъже при пациентите с АИТЗ, двете групи бяха сравними по отношение на пролактиновите нива, процента на лица с макроаденоми и преминалите неврохирургична интервенция.

Честотата на спонтанния хипотиреоидизъм в изследваната кохорта беше 16,4% (n=72), съответно 13,3% (10% субклиничен/ 3,3% явен) сред мъжете и 16,7% (12,5% субклиничен/ 4,2% явен) сред жените с пролактином. Средната дневна субституираща доза левотироксин беше $65,6 \pm 3,5$ kg (минимална: 12,5, максимална 175 g). Честотата на хипотиреоидизъм при различните възрастови групи е представена в Таблица 2. Честотите на спонтанен първичен хипотиреоидизъм при жените с пролактином в сравнение с данните за общата популация по декади са представени във Фигура 2. При мъжете такъв анализ не беше извършен поради малкия брой лица в подгрупите.

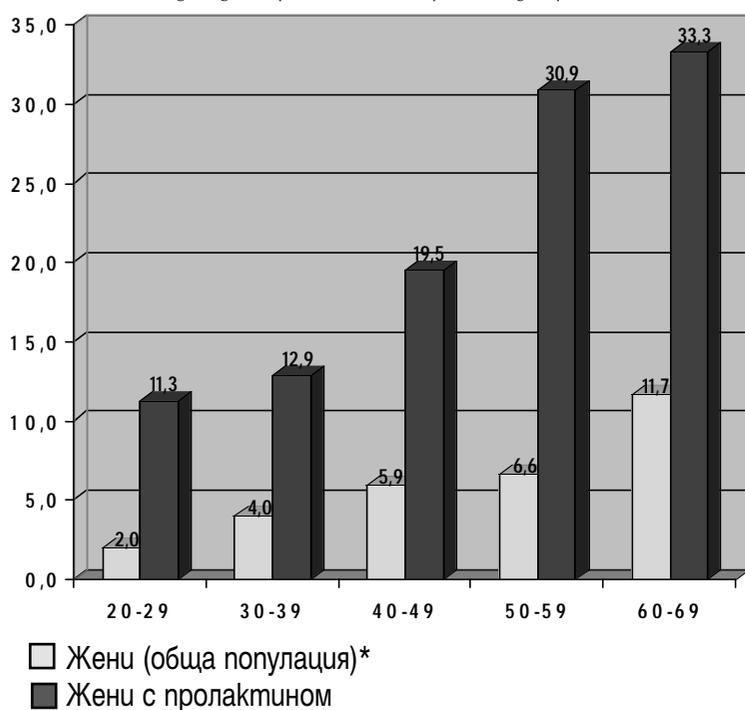
Девет пациента (10,5%) от базата данни бяха с диагностицирано друго аутоимунно заболяване извън тироидната аутоимунна патология: 3 случая със синдром на Рейно, 2 с миастения гравис и 4 с аутоимунни полигландуларни синдроми.

Обсъждане

Въпреки, че щитовидната жлеза е „най-предпочитаният“ аутоимунен таргет в човешкия организъм, честотата на АИТЗ сред общата популация не е напълно уточнена (20, 21). Посочените в литературата честоти варират в широки граници в зависимост от географския регион, възрастта и расата на участниците, както и намесата на генетични и разнообразни фактори на средата (22). В допълнение на това, не бива да се пренебрегват значителните различия между публикуваните студии по отношение на техния дизайн, изследваната популация и използваните лабораторни методи. Различният йоден прием е друг важен фактор, който трябва да се вземе под внимание, тъй като йодът е фактор с доказано имуномодулаторно действие в тироидния аутоимунитет. Редица проучвания показват позитивна корелация между повишения йоден прием и риска от развитие на аутоимунен хипотиреоидизъм (23-25).

България е една от Европейските страни с оптимална йодна суплементация, включително и на рисковите групи (средна йодурия при учениците 198 $\mu\text{g/l}$; при бремените – 165 $\mu\text{g/l}$) в резултат на въведената през 1958 г. Национална програма за профилактика с йодирана трапезна сол (26-28). В популационно българско проучване, извършено през 2012 г. върху 1887 лица на възраст 20-80 г. (953 жени/934 мъже) позитивни анти-TPO-автоантитела са установени при 23% от жените и 10% от мъжете (29). Процентите са подобни на тези при нашите пациенти с пролактином и доста по-високи от цитираните в популационни студии, извършени в страни с подобен на България йоден статус като например Германия (7%) и Австралия (11,9%) (30, 31). Те са дори по-високи от публикуваните в литературата данни за региони с йоден внос, превишаващ оптималния като САЩ (позитивни анти-тиреоидни антитела при 17% от жените и 8,7% от мъжете) (32) и някои райони на Япония (13,9-14,2% от жените и 6.5-7.2% от мъжете) (33, 34). По-интересен е фактът, че подобно на предшестващите ни проучвания, при кохорта белгийски пациенти с пролактином (17), честотата на първичния хипотиреоидизъм и при нашите болни беше по-висока, докато честотата на хипертиреоидизъм беше сравнима с тази в общата популация според публикуваните проучвания (35-40). Изследователите от горе-цитираното българско проучване установяват хипотиреоидизъм при 7,7% от жените (4,5% субклиничен/ 3,2% явен) и 3,1% от мъжете (2% субклиничен/1,1% явен) (29). В предшестващо епидемиологично проучване, извършено през 2006г. в България, с

Фигура 2. Честота на хипотиреоидизъм при жените с пролактином по декади в сравнение с общата популация.



* Данни от епидемиологично проучване върху неподбрана българска популация (Borissova и сътр. 2006 г.)

хипотиреоидизъм са 9% от жените (5,4% новодиагностициран; 3,6% известен) и 3% от мъжете (2,5% новодиагностициран; 0,5% известен) (35). В сравнение с тези данни при нашите пациенти с пролактином се наблюдават значително по-високи честоти както на субклиничния, така и на явния хипотиреоидизъм и при двата пола.

Болестността от хипотиреоидизъм се увеличава с възрастта, както показват редица проучвания (38-41). Ние също наблюдаваме тази тенденция при нашите пациенти с пролактином, като честотите остават сигнификантно по-високи от тези в съответната възрастова група от общата популация, базирайки се на Българското епидемиологично проучване от 2006 г. (36).

Заклучение

Получените резултати ни дават основание да подозираме роля на супрафизиологичните нива на пролактина в патогенезата и клиничното протичане на АИТЗ при болните с пролактином. От друга страна, относително малкият брой на извадката, възможното влияние на различни фактори (тиреоидна функция, лечение с левотироксин или допаминови агонисти, генетична предиспозиция и др.), различните лабораторни методи не позволиха извършването на корелационен анализ между нивата на пролактина и нивата на авто-антителата. Не можем да пренебрегнем и основните недостатъци на ретроспективните проучвания: възможност за отклонение и грешка в резултат на преселекция и неразпознати наместващи се фактори, липсващи данни при част от участниците, както и липсата на подходяща контролна група. В допълнение на това е нужно да се подчертае и тенденцията за зачестяване на аутоимунните заболявания (42). Необходими са проспективни проучвания тип случай-контрол с подходящ дизайн за по-нататъшното уточняване на този проблем.

Независимо от гореизброените ограничения, базирайки се на нашите данни препоръчваме рутинен скрининг за АИТЗ с използването на лесни и достъпни тестове (TSH, Анти-TPO-Abs и ултразвуково изследване на щитовидната жлеза) при всички пациенти, диагностицирани с пролактином.

Patients with Prolactinomas are Predisposed to Autoimmune Hypothyroidism: Data from a Cross-sectional Retrospective Study in a Single Tertiary Centre

Elenkova, Atanaska P., Vasilev, Vladimir V., Vandeva, Silvia Zh., Dimitrov, Hristo A., Tcharaktchiev, Dimitar D., Zacharieva, Sabina Z.

Clinical Centre of Endocrinology and Gerontology, Medical University, Sofia

Address for correspondence:

Assoc. prof. Atanaska Elenkova, MD, PhD

„Acad. Ivan Pentchev“ University Hospital

2, Zdrave Str., Sofia 1431

e-mail: atanaska@gmail.com

Abstract

Background: Prolactin has been shown to act as a potent immunomodulator influencing both cellular and humoral immune responses at many levels: regulation of the T- and B-cell maturation, inhibition of the negative selection of autoreactive B cells, stimulatory effect on immunoglobulin production and antigen presentation.

Aim: Assessment of the prevalence of autoimmune thyroid diseases (AITD) among patients with prolactinomas.

Materials and methods: The medical files of 486 patients (430 females and 56 males) diagnosed and followed up at a single tertiary centre were analyzed in a retrospective cross-sectional design.

Results: AITD were found in 27,6% of all study participants (29,8% among females and 10,7% among males). Hyperthyroidism was found in 1,59% of all investigated subjects (1,72% among females). The prevalence of hypothyroidism was 13,3% in men (10% subclinical/ 3,3% overt) and 16,7% in women (12,5% subclinical/ 4,2% overt).

Conclusions: Based on these results we could suggest an increased risk for development of autoimmune hypothyroidism in subjects with prolactinomas. Immunomodulatory action of supraphysiologically increased prolactin may be a probable co-factor in the pathogenesis and the clinical course of AITD in genetically predisposed subjects with prolactinomas.

Key words: prolactinoma; hyperprolactinemia; autoimmune thyroid diseases

Introduction

Experimental in vitro studies have demonstrated the potent immunomodulatory action of prolactin (PRL) on both cellular and humoral immune responses at many levels: regulation of the T- and B-cell maturation, inhibition of the negative selection of autoreactive B cells, stimulatory effect on immunoglobulin production and antigen presentation, and anti-apoptotic action (1-4). Many observational studies have found hyperprolactinemia in a substantial proportion of patients with different autoimmune disorders such as lupus erythematoses (SLE), rheumatoid arthritis (RA), systemic sclerosis, Sjogren's syndrome, Addison's disease, Hashimoto's thyroiditis and psoriasis (5-8). Some

researchers have revealed a positive correlation between prolactin levels and disease activity in patients with SLE, RA and relapsing-remitting multiple sclerosis suggesting an important role of PRL in the pathogenesis of these autoimmune disorders (7,9-11). Another new study has shown that hyperprolactinemia in lupus patients is associated with all types of serositis and anemia (12). On the other hand, the reverse causation is still almost unexplored. Elevated levels of different auto-antibodies in subjects with hyperprolactinemia have been reported in a few small laboratory studies (13, 14). There are two recently published small clinical prospective case-control studies reporting significantly increased thyroid volume, thyroid autoimmunity and nodule prevalence in patients with hyperprolactinaemia (15, 16).

In accordance with the above mentioned literature data our previous still unpublished retrospective observational study has shown a high prevalence of autoimmune thyroid diseases in Belgian patients with prolactinomas (17). Based on these findings we conducted a retrospective study with a similar design in Bulgarian prolactinoma patients. Assuming the difference in the iodine status of two countries (mild iodine deficiency in Belgium vs. adequate iodine intake in Bulgaria) we hypothesized that the prevalence of AITD may be even higher among Bulgarian patients.

Materials and methods

A retrospective cross-sectional study was undertaken in 486 patients aged ≥ 18 years, diagnosed with prolactinoma and followed up between 1980 and 2011 at a single tertiary referral centre: the University Hospital of Endocrinology, Sofia, Bulgaria. Patients' data were collected from two main sources: the Hospital Information System and the Hospital Archives. Only subjects with diagnosis prolactinoma based on the current guidelines were enrolled (18). Patients who were lost-to-follow up, subjects with documented death before study enrolment and all patients with hyperprolactinemia of non tumoral origin were excluded from the study. Hypopituitarism (in spite of the form and severity), past history of thyroid surgery or exposition to any factors with possible impact on thyroid function (radiation of the neck region, drugs, etc.) were additional exclusion criteria regarding the analysis of thyroid function.

The simultaneous presence of at least two of the following criteria were obligatory to accept the diagnosis of AITD: 1. Diffuse non homogenous hypoechogenic ultrasound pattern (with or without nodular changes); 2. Positive anti-thyroid auto-antibodies (above the upper limit of normal range): anti-thyreoperoxidase (Anti-TPO), anti-thyroglobulin (Anti-TG) and/or anti-TSH-receptor antibodies (TRAbs); 3. Impaired thyroid function based on records for serum levels of thyroid stimulating hormone (TSH), free thyroxine (FT_4), and free triiodothyronine (FT_3). Subclinical hyperthyroidism was defined as a suppressed serum TSH accompanied by normal FT_4 and FT_3 levels (19). Patients with suppressed TSH levels and elevated FT_4 or/and FT_3 levels were considered to have an overt hyperthyroidism. Subclinical hypothyroidism was defined as an increased TSH above the upper reference range with both normal FT_4 and FT_3 . Subjects with elevated TSH and decreased levels of thyroid hormones were classified as presenting an overt hypothyroidism.

Data processing was performed using SPSS for Windows v.16.0 (SPSS.Inc., Chicago, Il., USA). Metric variables were described by arithmetic mean and standard deviation or median and interquartile range IQR depending on the normality of sample distribution (which was assessed by the Kolmogorov-Smirnov test). Non-metric variables were presented by relative fre-

quency distribution (in percentages). Fisher's exact test was used to detect differences between patients with AITD and these without AITD group in the prevalence of AITD. Two-sided P-values less than 0,01 were considered statistically significant.

Results

The study cohort consisted of 486 Caucasian prolactinoma patients (430 women and 56 men) with a mean age of $33,1 \pm 10,2$ years (14,2-75,0 years) at diagnosis and $40,3 \pm 10,5$ years (18,1-76,3 years) at study enrolment. The mean prolactin (PRL) levels at diagnosis were 4791,39 mIU/l (median: 2550 mIU/l; range: 1001-112 099 mIU/l). Macroadenomas (tumor size ≥ 10 mm) were identified (by CT or MRI) in 10,9% (n=47) of females and 67,8% (n=38) of male patients. Seventy two patients (14,8%; 34 women/38 men) underwent neurosurgery. Hypopituitarism (all forms except the transitory isolated hypogonadotropic hypogonadism) was registered in 9,9% of all subjects (48 patients; 42 operated/ 6 non operated/).

We found AITD in 27,6% of all study participants (n=134; 128 women/6 men). The prevalence was 29,8% among females and 10,7% among the male subgroup (Figures 1A, 1B). In 57,5% of the patients, diagnosis of prolactinoma preceded the development of AITD with a mean period of 4,02 years (from 1 up to 20 years); in 32,1% both diseases were simultaneously diagnosed and only 10,4% of patients were diagnosed first with AITD. Diffuse non homogenous hypoechogenic thyroid pattern was found in 87,3% (n=117) and the simultaneous presence of diffuse and nodular changes in 12,7% (n=17) of our patients with AITD. Regional neck lymphadenomegaly was documented in 32,8% (n=44) of them.

Positive anti-thyroid auto-antibodies were found in 77,6% of patients with documented AITD: 94,2% of them (98 patients) had positive Anti-TPO; 43,3% (45 patients) had positive Anti-TG and 6,7% (7 patients) were TRAbs positive. The diagnosis of AITD in the rest 22,4% (8 negative and 22 subjects without records of antithyroid autoantibody levels) was based on the obligatory simultaneous presence of diffuse non homogenous hypoechogenic thyroid structure on ultrasound examination and spontaneous hypothyroidism (26 subclinical/4 overt).

Analysis of the thyroid function was based on the medical records of 438 prolactinoma patients (408 females/30 males). According to protocol, patients with hypopituitarism (n=48; 26 men/22 women) were excluded from this analysis in order to avoid an incorrect interpretation of TSH values. Graves' disease (hyperthyroidism with positive TRAb) was found in 7 female patients and none of the males. Thus, the calculated prevalence of hyperthyroidism was 1,72% among all women and 1,59% of all investigated subjects respectively. Stable euthyroid state from the diagnosis to the study enrolment was registered in 50 of all

Table 1. Main characteristics of the subgroups: patients with AITD vs. patients without AITD.

	Patients with AITD (n=134)	Patients without AITD (n=352)	Fisher's exact test (P)
Females/males (ratio)	128/6 (21:1)	302/50 (6:1)	0,002
Age at diagnosis of prolactinoma, years	34,94±10,0	32,40±10,2	0,005
Age at study entry, years	40,90±10,7	38,66±11,0	0,008
Macroadenomas, number (%)	20 (14,9%)	65 (18,5%)	0,423
Neurosurgery, cases number (%)	16 (11,9%)	56 (15,9%)	0,318
PRL at diagnosis of prolactinoma, mean (range); mIU/l	5293 (1002-112099)	4567 (1001-87600)	0,908

Table 2. Frequency of hypothyroidism among different age groups of patients with prolactinomas.

Number (%) Males/Females	Age groups		
	18-39 years (n=256; 15/241)	40-59 years (n=164; 9/155)	60-79 years (n=18; 6/12)
Total (Subclinical + Overt)	32 (12,5%)	36 (21,3%)	4 (27,8%)
Females	30 (12,4%)	35 (22,6%)	3 (25,0%)
Males	2 (13,3%)	1 (11,1%)	1 (16,7%)
Subclinical hypothyroidism	27 (10,5%)	24 (14,6%)	3 (10,9%)
Females	25 (10,4%)	24 (15,5%)	2 (16,7%)
Males	2 (13,3%)	Ø	1 (16,7%)
Overt hypothyroidism	5 (2,0%)	12 (6,7%)	1 (7,1%)
Females	5 (2,1%)	11 (7,1%)	1 (8,3%)
Males	Ø	1 (11,1%)	Ø

Figure 1A. Prevalence of autoimmune thyroid diseases (AITD) in women with prolactinomas.

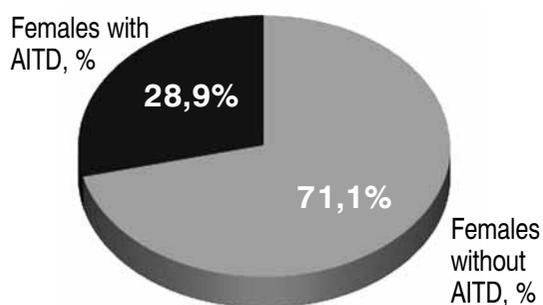
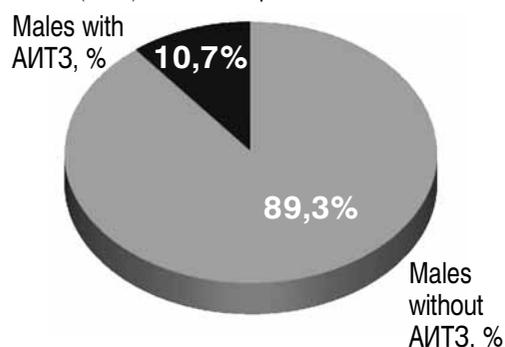


Figure 1B. Prevalence of autoimmune thyroid diseases (AITD) in men with prolactinomas.



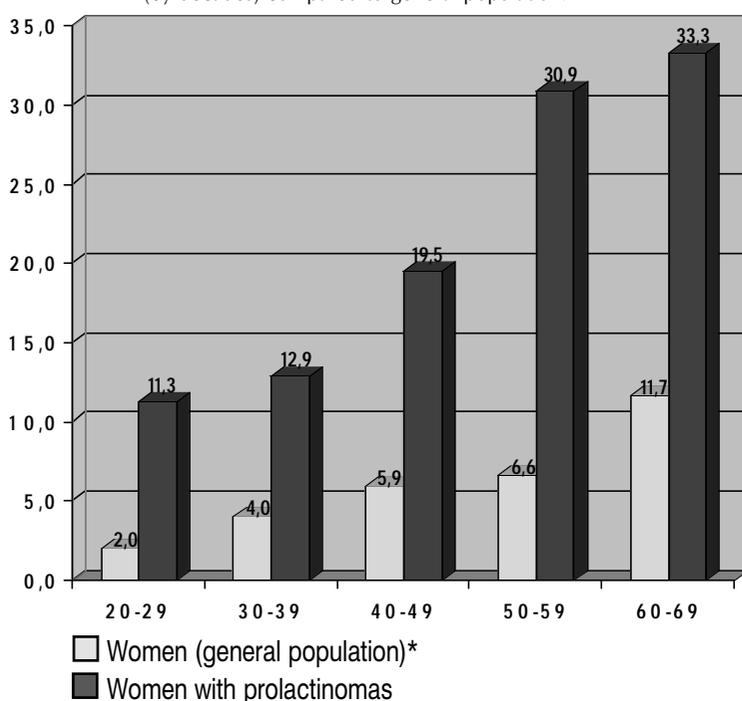
patients with AITD (41,1%).

We performed a comparative subgroup analysis between prolactinoma patients with AITD and those without AITD (Table 1). Except for the significantly higher mean age and four times higher female-to-male ratio both subgroups did not differ statistically as regards mean PRL levels, the percentages of subjects with macroadenomas and those who underwent neurosurgery.

The prevalence of hypothyroidism was 16,4% (n=72) in our cohort: 13,3% (10% subclinical/ 3,3% overt) among men and 16,7% (12,5% subclinical/ 4,2% overt) among women with prolactinomas. The average daily substitutive dose of levothyroxine was 65,6±33,5 g (range: 12,5-175 g). Frequencies of hypothyroidism among different age groups are presented at Table 2. Frequencies of spontaneous primary hypothyroidism in women with prolactinomas by decades in comparison with the general population are shown at Figure 2. We did not perform this analysis in male patients because of their small number.

Nine patients (10,5%) were diagnosed with other autoimmune diseases: 3 cases with Raynaud's syndrome, 2 patients with myasthenia gravis and 4 subjects with polyglandular autoimmune syndromes.

Figure 2. Frequency of hypothyroidism in women with prolactinomas (by decades) compared to general population.



* Data from epidemiological study in unselected Bulgarian population conducted in 2006 by Borissova et al.

Discussion

Although the thyroid gland is the most preferable target for the autoimmune process the prevalence of AITD among the general population is not well established (20,1). Literature data vary widely depending on geographic region, age, sex, race, genetic, and other environmental factors (22). In addition, we should not neglect the considerable differences between the epidemiological studies in their design, patient population and laboratory methods. Different iodine intake is another important factor that should be taken into consideration. Iodine is a proven modulator of the thyroid autoimmunity and its high intake has been shown to predispose to autoimmune hypothyroidism (23-25).

Bulgaria is one of the European countries with optimal iodine intake including risk population groups (median UI in school-age children 198 µg/l; in pregnant women - 165 µg/l) as a result the National prophylaxis program with iodized table salt implemented in 1958 (26,27,28). In the population-based Bulgarian study, conducted in 2012 on 1,887 subjects, 20-80 years (953 females/934 males) anti-TPO antibodies positivity was found in 23% of females and 10% of males (29). These percentages are comparable to the results of our prolactinoma patients but are significantly higher than these cited in studies conducted in countries with similar iodine status such as Germany (7% TPO-Abs positivity) and Australia (11,9%) (30, 31). Similarly with our previous Belgian prolactinoma study the prevalence of anti-thyroid autoantibody positivity in both male and female Bulgarian patients with prolactinomas was even higher than the percentages reported in regions with more than adequate iodine intake such as the USA (TPO positivity in 17%

of females and 8,7% of males) (32) and some regions of Japan: 13,9%-14,2% of women and 6,5%-7,2% of men (33, 34).

Of more interest is the fact that similar to our previous investigations among Belgian prolactinoma patients (17), we found increased frequency of primary hypothyroidism in our patients whereas the frequency of hyperthyroidism was comparable to this in the general population according to community-based studies (35-40). According to the above-cited Bulgarian study the investigators found hypothyroidism in 7,7% of women (4,5% sub-clinical/3,2% overt) and 3,1% of men (2% sub-clinical/1,1% overt) (29). In a previous Bulgarian epidemiological study conducted in 2006 hypothyroidism was observed in 9% of women (5,4% newly diagnosed; 3,6% known) and 3% of men (2,5% newly diagnosed; 0,5% known) (35). Compared to these data our results show significantly higher frequencies not only of sub-clinical but also of overt hypothyroidism in patients with prolactinoma of both sexes.

The prevalence of hypothyroidism increases with age as has been shown by many studies (38-41). We also found this trend in our patients but the frequency of hypothyroidism remains significantly higher in each age group compared to the general population using the data of the Bulgarian epidemiological study from 2006 (36).

Conclusions

Based on these findings a possible role of supraphysiologically increased prolactin levels in the pathogenesis and the clinical course of AITD in patients with prolactinomas can be suggested. On the other hand, the small sample, possible impact of certain factors (thyroid function, treatment with levothyroxin or dopamine agonists, genetic predisposition, etc.), and different laboratory methods did not allow the performance of correlation analysis between the levels of prolactin and auto-antibodies. We can not neglect the main limitations of the retrospective studies (risk of selection bias and unrecognized confounding variables, missing data, etc.), as well as the lack of an appropriate control group. In addition, we should take into consideration the trend toward rising incidence rates of the autoimmune disorders (42). Well-designed prospective case-control studies are needed for further research on this topic.

Despite the above-mentioned limitations based on our data would recommend routine screening for AITD with simple thyroid tests (TSH, TPO-Abs and ultrasound examination) in all patients diagnosed with prolactinoma.

1. Yu-Lee L-Y. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57: 435-455.
2. Peeva E, Michael D, Cleary J, Rice J, Chen X, Diamond B. Prolactin modulates the naive B cell repertoire. *J Clin Invest* 2003;111: 275-283.
3. Matera L, Mori M, Galetto A. Effect of prolactin on antigen presenting function of monocyte derived dendritic cells. *Lupus* 2001;10: 728-734.
4. Lahat N, Miller A, Shtiller R, Toubi E. Differential effects of prolactin upon activation and differentiation of human B lymphocytes. *J Neuroimmunol* 1993; 47:35-40.
5. Walker S, Jacobson J. Neuroendocrine mechanisms in rheumatic diseases: Roles of prolactin and gonadotropin-releasing hormone in rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am* 2000; 26: 713-736.
6. Jara LJ, Vera-Lastra O, Miranda JM, Alcalá M, Alvarez-Nemegyei J. Prolactin in human systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2001; 10 (10): 748-756.
7. Serriolo B, Ferretti V, Sulli A, Fasciolo D, Cutolo M. Serum prolactin concentrations in male patients with rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 966: 258-262.
8. Ram S, Blumberg D, Newton P, Anderson NR, Gama R. Raised serum prolactin in rheumatoid arthritis: genuine or laboratory artefact? *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43(10): 1272-1274.
9. Leanos-Miranda A, Cárdenas-Mondragón G. Serum free prolactin concentrations in patients with systemic lupus erythematosus are associated with lupus activity. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45(1): 97-101.
10. Vera-Lastra O, Mendez C, Jara LJ, Cisneros M, Medina G, Ariza R, Espinoza LR. Correlation of prolactin serum concentrations with clinical activity and remission in patients with systemic lupus erythematosus. Effect of conventional treatment. *J Rheumatol* 2003; 30(10): 2140-2146.
11. Moshirzadeh S, Ghareghozli K, Harandi AA, Pakdaman H. Serum prolactin level in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis during relapse. *J Clin Neurosci* 2012; 19(4): 622-623.
12. Orbach H, Zandman-Goddard G, Boaz M, Agmon-Levin N, Amital H, Szekanecz Z, et al. Prolactin and autoimmunity: hyperprolactinemia correlates with serositis and anemia in SLE patients. *Clin Rev Allergy Immunol* 2012; 42(2): 189-198.
13. Buskila D, Berezin M, Gur H, et al. Autoantibody profile in the sera of women with hyperprolactinemia. *J Autoimmun* 1995; 8: 415-424.
14. Ishibashi M, Kuzuya N, Sawada S, Kitamura K, Kamoi K, Yamaji T. Anti-thyroid antibodies in patients with hyperprolactinemia. *Endocrinol Jpn* 1991; 38: 517-522.
15. Saiki Arslan M, Sahin M, Topaloglu O, Tural E, Karakose M, Gungunes A, et al. Hyperprolactinaemia associated with increased thyroid volume and autoimmune thyroiditis in patients with prolactinoma. *Clin Endocrinol (Oxford)*; 2013; 79(6): 882-886.
16. Onal ED, Saglam F, Sacikara M, Ersoy R, Cakir B. Thyroid autoimmunity in patients with hyperprolactinemia: an observational study. *Arq Bras Endocrinol Metabol*; 2014;58 (1):48-52.
17. Elenkova A, P.Petrossians, S.Zacharieva, A.Beckers. High prevalence of autoimmune thyroid diseases in patients with prolactinomas: a cross-sectional retrospective study in a single tertiary referral centre. *Annales d'Endocrinologie* 2015, in press.
18. Melmed S, Casanueva FF, Hoffman AR, Kleinberg DL, Montori VM, Schlechte JA, Wass JA. Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 273-288.
19. Bahn RS, Burch HB, Cooper DS, Garber JR, Greenlee C, Klein I, et al. Hyperthyroidism and Other Causes of Thyreotoxicosis: Management Guidelines of the American Thyroid Association and American Association of Clinical Endocrinologists; *Endocr Practice* 2012;17(3): 456-520.
20. Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 84(3): 223-243.
21. Biondi B, Cooper DC. The clinical significance of subclinical thyroid dysfunction. *Endocr Rev* 2008; 2976-131.
22. McLeod DS, Cooper DS. The incidence and prevalence of thyroid autoimmunity. *Endocrine* 2012; 42 (2): 252-65.
23. Szabolcs I, Podoba J, Feldkamp J, Dohan O, Farkas I, Sajgó M et al. Comparative screening for thyroid disorders in old age in areas of iodine deficiency, long-term iodine prophylaxis and abundant iodine intake. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997; 47(1): 87-92.
24. Vejbjerg P, Knudsen N, Perrild H, Laurberg P, Carlé A, Pedersen IB, et al. Lower prevalence of mild hyperthyroidism related to a higher iodine intake in the population: prospective study of a mandatory iodization programme. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009; 71(3): 440-5.
25. Laurberg P, Cerqueira C, Ovesen L, Rasmussen LB, Perrild H, Andersen S, et al. Iodine intake as a determinant of thyroid disorders in populations. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2010; 24(1): 13-27.
26. Ministry of Health (Bulgaria), National Center for Hygiene, Medical Ecology and Nutrition - Sofia. Report on the results of the national representative survey on endemic goiter and iodine status in Bulgaria - 2003. *Sofia: Ministry of Health*, 2003.
27. Lozanov B, Ivanova L, Timcheva T, Vukov M. Eradication of iodine deficiency in Bulgaria: results of the national representative study on iodine status and endemic goiter. *Endocrinologiya* 2003; 9:146-156.
28. Benoist B, McLean, Andersson M, Rogers. Iodine deficiency in 2007: Global progress since 2003. *WHO Food and Nutrition Bulletin* 2008; 29(3): 195-203.
29. Shinkov A, Borissova AM, Vlahov J, Dakovska L, Blajeva E. Male gender differences in the thyroid ultrasound features, thyroid peroxidase antibodies and thyroid hormone levels: a large population-based study. *J Endocrinol Invest*. 2014; 37(3): 269-276.
30. Völzke H, Lüdemann J, Robinson K, Spieker K, Schwahn C, Kramer A, et al. The prevalence of undiagnosed thyroid disorders in a previously iodine-deficient area. *Thyroid* 2003; 13(8): 803-810.
31. O'Leary PC, Feddema PH, Michelangeli VP, Leedman PJ, Chew GT, Knuiman M, et al. Investigations of thyroid hormones and antibodies based on a community health survey: the Busselton thyroid study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64(1): 97-104.
32. Hallowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, et al. Serum TSH, T4, and thyroid antibodies in the United States population (1988-1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 489-499.
33. Okamura K, Nakashima T, Ueda K, Inoue K, Omae T, Fujishima M. Thyroid disorders in the general population in Hisayama, Japan, with special reference to prevalence and sex differences. *Int J Epidemiol* 1987; 16 (4): 545-549.
34. Konno N, Iizuka N, Kawasaki K, Taguchi H, Miura K, Taguchi S et al. Screening for thyroid dysfunction in adults residing in Hokkaido Japan: in relation to urinary iodide concentration and thyroid autoantibodies. *Hokkaido Igaku Zasshi* 1994; 69(3): 614-626.
35. Shinkov A, Borissova AM, Kovatcheva R, Vlahov J, Dakovska L, Atanassova I, et al. Thyroid dysfunction and cardiovascular risk factors in Bulgarian adults. *Central Eur J Med* 2013; 8(6): 742-748.
36. Borissova AM, Kovatcheva R, Shinkov A, Atanassova I, Aslanova N, Vlahov J, et al. Hypothyroidism and metabolic syndrome. *Endokrinologiya* 2009 (14); 2: 118-126.
37. Knudsen N, Jorgensen T, Rasmussen S, Christiansen E, Perrild H. The prevalence of thyroid dysfunction in a population with borderline iodine deficiency. *Clin Endocrinol* 1999; 51: 361-367.
38. Bjoro T, Holmen J, Kruger O, Midthjell K, Hunstad K, Schreiner T, et al. Prevalence of thyroid disease, thyroid dysfunction and thyroid peroxidase antibodies in a large unselected population. The health study of Nord-Trøndelag. *Eur J Endocrinol* 2000; 143: 639-647.
39. Diez JJ, Molina I, Ibars MT. Prevalence of thyroid dysfunction in adults over the age of 60 years from an urban community. *Exp Clin Endocrinol Diab* 2003; 111: 480-485.
40. Vanderpump MPJ. The epidemiology of thyroid diseases. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. *Wegener and Ingbar's. 2005. The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text.*, 9th edn, pp 398-406. *JB Lippincott-Raven, Philadelphia*.
41. Gagnon F, Langlois MF, Michaud I, Gingras S, Duchesne JF, Lévesque B. Spatio-temporal distribution of hypothyroidism in Quebec. *Chronic Dis Can* 2006; 27(1): 1-8.
42. Cooper GS, Bynum MLK, Somers EC. Recent Insights in the Epidemiology of Autoimmune Diseases: Improved Prevalence Estimates and Understanding of Clustering of Diseases. *J Autoimmun* 2009; 33(3-4): 197-207.

Българско дружество по ендокринология *Bulgarian Society of Endocrinology*

Списание
ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ISSN 1310-8131

Journal
ENDOCRINOLOGIA ISSN 1310-8131

Адрес на редакционната колегия:

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

Editorial Board address for correspondence:

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

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

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

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

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

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

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

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

Структурата на статиите трябва да отговаря на следните изисквания:

Титулна страница

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

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

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

Резюме

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

Основен текст

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

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

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

Title page

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

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

c. Address of the corresponding author name, postal address (business or home as preferred), phone number, fax number, email address.

Abstract

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

Main text

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

Tables and figures

Each table should be on a separate page after the bibliography with the table caption preceding it. All illustrations should be submitted as separate

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

Таблицы и илюстрации

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

Книгопис

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

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

References

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

Examples

Reference to a journal article:

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

If the original cited paper is in Bulgarian:

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

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

Примери:

Статия от списание:

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

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

Глава (раздел) от книга:

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

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

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

References to a book chapter:

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

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

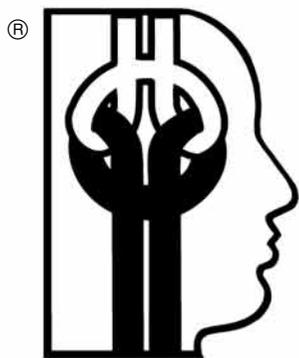
Address for sending the manuscripts and other editorial correspondence

Editorial Board Address for Correspondence:

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

Адрес на редакционната колегия:

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



ЕНДОКРИНОЛОГИЯ

ENDOCRINOLOGIA

Списание
на Българското дружество
по ендокринология
към СНМД в България

Journal
of the Bulgarian Society
of Endocrinology (BSE)

Главен редактор

Проф. д-р Мария ОРБЕЦОВА, гм

Редактор на английския текст

Джеф ТОМАС

Отговорен редактор

Румен НИНОВ

© Първа корица и графичен дизайн

Румен НИНОВ

Editor-in-chief

Prof. Maria ORBETZOVA, MD PhD

English language editor

Jeff THOMAS

Art director Rumen NINOV

© *Cover&Design* Rumen NINOV

Технически секретар

Маргарита СЛАВЧЕВА

E mail: mora4a2@abv.bg

Tehcnical secretary

Margarita SLAVCHEVA

E mail: mora4a2@abv.bg

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

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

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

• SCOPUS Elsevier
Bibliographic Databases (since
2001)

• EMBASE
• Bulgarian Citation Index
(since 1996)

Адрес на редакционната колегия: Клиничен център – УСБАЛЕ, „Акад. Иван Пенчев“ ул. „Здраве“ №2, 1431 София; тел. (02) 985 6001; факс (02) 987 4145; 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, Technical Secretary – M. Slavcheva (mobile (+0359) 0889 295884), email: mora4a2@abv.bg