

# ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ENDOCRINOLOGIA

**Списание  
на Българското дружество  
по ендокринология  
към СНМД в България**

**Journal  
of the Bulgarian Society  
of Endocrinology  
(BSE)**

**Гл. редактор:** Боян Лозанов  
**Научен секретар:** Филип Куманов

**Editor-in-Chief:** Bojan Lozanov (Sofia)  
**Scientific Secretary:** Philip Kumanov (Sofia)

**Редакционна колегия:**

А.-М. Борисова, Г. Дашев, Л. Дянков,  
С. Захаријева, Г. Кирилов, Д. Коев,  
К. Коприварова, Ив. Мендизов,  
М. Протич, Вл. Христов

**Editorial Board:**

А.-М. Borissova (Sofia), V. Christov (Sofia),  
G. Dachev (Sofia), L. Diankov (Sofia), G. Kirilov (Sofia)  
D. Koev (Sofia), K. Koprivarova (Sofia), I. Mendizov (Sofia),  
M. Protich (Sofia), S. Zakharijeva (Sofia)

**Редакционен съвет:**

П. Ангелова-Гатева, Б. Василева,  
Г. Кирилов, Л. Коева,  
Ал. Александров, М. Андреева,  
Н. Овчарова, Т. Сечанов,  
С. Симеонов, Ив. Цинликов

**Advisory Board:**

P. Angelova-Gateva (Sofia), G. Kirilov (Sofia),  
L. Koeva (Varna), Al. Alexandrov (Sofia),  
M. Andreeva (Sofia), N. Ovcharova (Sofia),  
T. Sechanov (Sofia), S. Simeonov (Plovdiv),  
B. Vasileva (Sofia), I. Tzinlikov (Pleven)

**Международен научен съвет:**

М. Бергер (Дюселдорф), М. Богоев (Скопие),  
А. Булатов (Москва), Ф. Деланж (Брюксел),  
К. Жафиол (Монпелие), А. Изидори (Рим),  
С. Имамоглу (Бурса), Б. Каранфилски (Скопие),  
П. Кендъл-Тейлър (Нюкасъл на Тайн),  
Х. Кийн (Лондон), И. Климеш (Братислава),  
М. Кокулеску (Букурещ), П. Корвол (Париж),  
Д. А. Кутрас (Атина), Дж. Лазарус (Кардиф),  
Ж. Метелко (Загреб), Е. Нишлаг (Мюнстер),  
А. Пинкера (Пиза), М. Сerrано Риос (Мадрид),  
Й. Фьовени (Будапеща)

**International Scientific Board:**

M. Berger (Düsseldorf), M. Bogoev (Skopje),  
A. Bulatov (Moscow), M. Coculescu (Bucharest),  
P. Corvol (Paris), F. Delange (Brussels),  
J. Fovenyi (Budapest), S. Imamoglu (Bursa),  
A. Isidori (Rome), C. Jaffiol (Monpellier),  
B. Karanfilski (Scopie), H. Keen (London),  
P. Kendall-Taylor (Newcastle upon Tyne),  
I. Klimes (Bratislava), D. A. Koutras (Athens),  
J. H. Lazarus (Cardiff), Z. Metelko (Zagreb),  
E. Nieschlag (Münster), A. Pinchera (Pisa),  
M. Serrano Rios (Madrid)

Списание се индексира от:  
• ExtraMed (London)  
• Elsevier Science (Amsterdam)  
• Raymon Mulford Library (Ohio)  
• Български цитатен указател

ISSN 1310-8131

## Списание

# ЕНДОКРИНОЛОГИЯ

том VII, кн. 4, 2002

## Съдържание

### Обзори

**М. Янева**

Диференциална диагноза между болестта на Кушинг и Псевдо-Кушинг състоянията.

Приложение на теста с дезмопресин ..... 4

**М. Николов, В. Христов**

Метод за проследяване на дълготрайния контрол на захарния диабет

с интензивно синьо оцветено производно на борната киселина ..... 12

### Оригинални статии

**Шин-Ичи Ногучи, Ичиро Ивамото, Шоичиро Коша,**

**Тошинори Фужино, Юкихиро Нагата**

Ефектите на тестостерона и инхибитора на ароматазата върху костите:

действащи механизми на андрогените ..... 17

**В. Йотова, В. Маждова, В. Цанева**

Влияе ли се развитието на микроалбуминурия при млади хора

със захарен диабет тип 1 от размерите при раждане ..... 23

**А. Куртев, D. Fisher, J. Nelson, E. Илиев**

Оценка на тиреоидната, панкреатичната  $\beta$ -клетъчна и надбъбречната функции

и на органо-специфичния автоимунитет при деца и юноши с алоpecia areata ..... 30

**А. Куртев, D. Fisher, J. Nelson, A. Дурмишев**

Витилиго в детско-юношеската възраст и автоимунни ендокринни заболявания - случайно

съчетание или закономерност? ..... 36

Съобщения ..... 43

Нови монографии ..... 44

Указания за авторите ..... 45

Адрес на редакционната колегия: Специализирана болница за активно лечение по  
ендокринология, нефрология и геронтология „Акад. Иван Пенчев“  
ул. „Д. Груев“ №6, 1303 София; тел. (0359) (02) 987 7201; факс (0359) (02) 874 145  
Проф. Б. Лозанов – главен редактор, доц. Ф. Куманов – научен секретар  
<http://www.medicalnet-bg.org>

- ExtraMed (London)
- Elsevier Science (Amsterdam)
- Raymon Mulford Library (Ohio)
- Bulgarian Citation Index

## Journal

---

# ENDOCRINOLOGIA

---

vol. VII, number 4, 2002

## *Contents*

### Reviews

**M. Yaneva**

Differential Diagnosis between Cushing's Disease and Pseudo-Cushing States. Desmopressin Test ..... 4

**M. Nikolov, V. Christov**

A Method for Assessment of Long-term Control of Diabetes Mellitus by Means of an Intensively Blue Coloured Derivative of the Boronic Acid ..... 12

### Original Articles

**Shin-Ichi Noguchi, Ichiro Iwamoto, Shoichiro Kosha, Toshinori Fujino, Yukihiro Nagata**

The Effects of Testosterone and Aromatase Inhibitor on Bone: Action Mechanisms of Androgens ..... 17

**V. Iotova, V. Madjova, V. Tzaneva**

Does Size at Birth Influence the Development of Microalbuminuria in Young Patients with Type 1 Diabetes Mellitus ..... 23

**A. Kurtev, D. Fisher, J. Nelson, E. Iliev**

Estimation of the Thyroid, Pancreatic  $\beta$ -cells and Adrenal Functions and Organ-Specific Autoimmunity in Children and Adolescents with Alopecia Areata ..... 30

**A. Kurtev, D. Fisher, J. Nelson, A. Dourmishev**

Vitiligo in Childhood and Adolescence and Autoimmune Endocrine Diseases - Accidental Combination or Regularity? ..... 36

**New Items** ..... 43

**New Monographs** ..... 44

**Instructions to Authors** ..... 45

**Editorial Board: Clinical Center of Endocrinology and Gerontology**

6, D. Gruev Str., 1303 Sofia, Bulgaria; Tel (0359) (02) 987 7201; Fax (0359) (02) 874 145

Prof. B. Lozanov, Editor-in-chief; Assoc. Prof. Ph. Kumanov, Scientific Secretary

<http://www.medicalnet-bg.org>

## Диференциална диагноза между болестта на Кушинг и Псевдо-Кушинг състоянията. Приложение на теста с дезмопресин

М. Янева

Клиничен център по ендокринология и геронтология  
 Медицински университет - София

## Differential Diagnosis between Cushing's Disease and Pseudo-Cushing States. Desmopressin Test

M. Yaneva

Clinical Center of Endocrinology and Gerontology  
 Medical University - Sofia

### Резюме

Псевдо-Кушинг състоянията (ПКС) възникват в случаи на тежки афективни и хранителни разстройства, алкохолизъм, абстинентен синдром, значително изразено централно затлъстяване, лошо контролиран неинсулинозависим захарен диабет, стрес. Характерно за болните с ПКС е, че те имат няколко или всички клинични прояви на истинската болест на Кушинг (БК) и са с хормонални данни за хиперкортицизъм. Обобщеният хормонален профил на болните с ПКС включва повишено производство на кортизол, повишени базални нива на плазмения кортизол с абнормен циркадиален ритъм, повишена екскреция на кортизол в урината и липса на потис-

### Abstract

Pseudo-Cushing (PC) states affect patients with severe affective and eating disorders, alcoholism and alcohol-withdrawal syndrome, severe central obesity, poorly controlled noninsulin-dependent diabetes mellitus and stress. Patients with PC states are characterized by all or at least some of the clinical features of Cushing's disease (CD) itself, and demonstrate hypercortisolism. A summarized hormonal profile of PC patients includes increased cortisol production, increased basal level of plasma cortisol with abnormal circadian rhythm; elevated cortisol excretion in the urine and altered Dexamethasone suppressibility. The hormonal characteristics of CD are quite similar. For this reason

кане с дексаметазон. Хормоналната характеристика на истинската болест на Кушинг е сходна. Именно това налага разработване на прецизни методики за отдиференциране на двете заболявания. Счита се, че ПКС възниква поради функционално активиране на хипофизарно-надбъбречната ос, предизвикано от кортикотропин рилизинг хормона (CRH). Тестът с дезмопресин (DDAVP) се основава на факта, че вазопресиновият аналог стимулира освобождаването на АСТН при пациенти с БК, но не и в по-голямата част от здравите, болните със затлъстяване и ПКС. Интравенозното въвеждане на 10 µg DDAVP предизвиква бурно покачване на АСТН при пациентите с БК, слаба, но статистически значима реакция при здравите и пациентите със затлъстяване и липса на покачване при ПКС. Реакцията на кортизола при въвеждането на DDAVP е сходна, с малки разлики. Установява се бурно покачване при пациентите с БК, докато болните с ПКС, с обезитет и здравите не реагират. Механизмите на тези реакции остават неизяснени. В заключение, тестът с дезмопресин се оказва полезен в разграничаването на умерено изразена БК от ПКС.

---

**КЛЮЧОВИ ДУМИ:** псевдо-Кушинг състояние, болест на Кушинг, дезмопресин, тест.

---

## УВОД

В клиничната практика често се налага да се прави диференциална диагноза между умерено изразената болест на Кушинг (БК) и други състояния, при които са налице някои от клиничните и хормоналните характеристики на заболяването - т.нар. псевдо-Кушинг състояние (ПКС). Диференциалната диагноза между тези клинични състояния е трудна и представлява сериозно предизвикателство пред лекаря. Към групата на ПКС се включват болни с тежки афективни и хранителни разстройства (депресия, анорексия, булимия), алкохолизъм, абстинентен синдром, значително изразено централно затлъстяване, лошо контролиран инсулинозависим захарен диабет, стрес. Отнасянето на неусложненото затлъс-

precise methods for differentiation of these two diseases have been elaborated. It is generally accepted that the PC state has resulted from the functional activation of the pituitary-adrenal axis, caused by the corticotropin releasing hormone (CRH). The Desmopressin (DDAVP) test is based on the stimulation of ACTH release by the vasopressin analogue in patients with CD, but not in the majority of normal, obese and patients with PC states. The i.v. administration of 10 µg DDAVP provokes a marked ACTH rise in CD; a small, but significant ACTH rise in normal and obese subjects and no reaction in patients with PC state. The cortisol reaction during DDAVP administration is similar, though few differences exist. There is a marked cortisol elevation in CD patients, while those with PC, obese and healthy people do not respond. The mechanisms of these reactions remain still largely unknown. In conclusion, the Desmopressin test may be a useful tool for the differentiation of mild CD from PC states.

---

**KEY WORDS:** pseudo-Cushing state, Cushing's disease, Desmopressin, test

---

тяване към тази група е спорно. Характерно за болните с ПКС е, че те имат няколко или всички клинични прояви на истинската болест на Кушинг и са с хормонални данни за хиперкортицизъм. От ключово значение за диференциалната диагноза е фактът, че премахването на причината, довела до развитието на ПКС, води до неговото изчезване. Това е особено демонстративно при ПКС, индуциран от алкохол, и такова, свързано с депресия.

## ЗАЩО ПРИ ПКС ИМА ХИПЕРКОРТИЗОЛИЗЪМ?

Счита се, че при ПКС е налице функционално активиране на хипофизарно-надбъбречната ос, предизвикано от кортикотропин рили-

зинг хормона (CRH). Ключова роля в този процес се отдава на стреса.

### **Ролята на стреса**

Отговорът към стреса представлява приспособителен отговор на организма към реални или предусещани стресови фактори (3). Основни участници в този отговор са CRH и locus ceruleus - норепинефрин/автономната (LC/NE) нервна система. Техните периферни ефектори са хипоталамо-хипофизарно-надбъбречната (ХХН) ос и крайните отдели на автономната нервна система. Активирането на тези структури води до поведенчески и периферни промени, които целят подобряване на приспособителните способности на организма и увеличаване на шансовете му за оцеляване. ХХН ос се стимулира от серия централни механизми. Това води до дискретно периодично покачване на кортизоловата секреция. При продължителна стимулация на ХХН ос настъпва дисфункция на регулаторните механизми. Крайният стадий на този процес е ригидна кортизолова секреция с ниски сутрешни стойности. Успоредно с това се установява нарушен механизъм на обратната връзка с АСТН и потискане на растежния хормон (GH) и стероидните полови хормони. Активира се симпатиковата нервна система. Крайните ефекти на тази каскада от невроендокринни промени са инсулиновата резистентност и висцералното натрупване на мастна тъкан. Механизмите на регулация на обратна връзка на ХХН ос имат ключова роля в изложената верига от процеси (2).

За хората с абдоминално затлъстяване е характерна хиперактивност на хипоталамо-хипофизарно-надбъбречната ос, което води до състояние на „функционален хиперкортицизъм“ (16). Това изглежда е резултат на два различни механизма. Първият, най-вероятно централен по произход, се характеризира с нарушена пулсативна секреторна динамика на АСТН и с хиперреактивност на ХХН ос към различни невропептиди, състояния на остър или хроничен стрес и вероятно към определени диетични фактори. Вторият механизъм може би е локализиран в периферията - в черния дроб и висцералната мастна тъкан. Глюкокортикостероидите (ГКС) стимулират чернодробната глюконеогенеза и инхибират или потенцират инсулиновото действие вър-

ху скелетната мускулатура, респективно мастната тъкан, като по този начин обуславят появата на висцерално затлъстяване и метаболитен синдром. Индуцираните от стрес хиперкортизолизъм и висцерално затлъстяване, както и техните сърдечно-съдови и други усложнения, увеличават 2-3 пъти риска за смъртност на засегнатите болни и намаляват очакваната продължителност на живот с няколко години (3).

Болните със затлъстяване и психични отклонения, като се започне от меланхолична депресия и се стигне до тревожност с усещания за „неконтролируем“ стрес, често са с умерен хиперкортизолизъм. Тези психични заболявания могат да се отнесат към ПКС, което налага диференцирането им от истинската БК. Според Chrousos et al. (3) внимателното изследване на болни само със затлъстяване без психични отклонения е показало, че те са с нормална кортизолова секреция.

### **Ролята на алкохола**

Алкохолът има множество ефекти върху ендокринните функции. От клинична гледна точка най-важният израз на тези ефекти са индуцираният от алкохол ПКС и синдромът на нечувствителност на хипоталамо-хипофизарно-надбъбречната ос. Механизмите на повлияване на ендокринната система от алкохола са разнообразни. При хроничен алкохолизъм е установена хиперфункция на хипоталамичните неврони, секретират CRH. В някои случаи алкохолът повлиява директно освобождаването или синтеза на хормоните - например инхибиране на вазопресиновата секреция и засягане на стероидогенезата, водещо до намалено производство на тестостерон. По-голямата част от ендокринните ефекти на алкохола най-вероятно са индиректни. Допуска се, че те се дължат на стреса от интоксикацията с алкохол (увеличаване на кортизола, катехоламините и вероятно GH и пролактин). От значение е и промененият метаболизъм на хормоните (например катехоламини, естрогени, андрогени), произтичащ от увреждане на вътреклетъчния редокс потенциал или тъканна увреда (19).

За да обяснят механизмите на възникване на ПКС у алкохолици, Elias et al. (7) правят следния опит. При 5 болни с хроничен алкохолизъм

и 3 здрави контроли въвеждат остро алкохол (етанол), самостоятелно или в комбинация с 1-24 АСТН, приложен венозно. Базалните нива на АСТН и кортизола са били значимо по-високи при болните с хроничен алкохолизъм в сравнение със здравите лица. Острото приложение на алкохол не е предизвикало сигнификантна промяна в средната плазмена концентрация на АСТН, не е увеличило ефекта на екзогенно внесения АСТН върху надбъбречната жлеза и е предизвикало сходни промени в серумните концентрации на кортизола и алдостерона при здравите контроли и при хроничните алкохолици. Авторите предполагат, че ПКС вероятно представлява състояние на индуциран от стрес хиперкортизолизъм. Стресът е свързан с множеството епизоди на подостра абстиненция от алкохола (7).

## МЕТОДИ ЗА ОТДИФЕРЕНЦИРАНЕ НА ДВЕТЕ СЪСТОЯНИЯ

### Според клиничната картина

Характерна за болните с ПКС е липсата на специфичните за БК белези (т. нар. „катаболни белези“). Клиничната картина на ПКС е разнообразна. При някои болни липсват клинични симптоми, при други е налице артериална хипертония, изразена в различна степен, със или без хипокалиемия и мускулна слабост. Поради високото ниво на АСТН е възможна появата на хиперандрогенизъм. При жени това може да затрудни диагнозата, тъй като клиничните белези, свързани с хиперандрогенизма (акне, хирзутизъм, олигоменорея и аменорея), се срещат често и при жени с БК. Все пак класическите ефекти на глюкокортикоидния излишък върху прицелните органи (изтъняване на кожата, проксимална миопатия, лесна кожна чупливост, ранна остеопороза), обикновено липсват при ПКС. Това е и начин за разграничаване на двете заболявания.

### Според хормоналните изследвания

„Класически“ тестове за поставяне на диагнозата БК са измерването на свободен кортизол в 24-часова урина и експресният нощен супресионен тест с 1 mg дексаметазон. Специфичността на тези тестове се оказва недостатъчно висока за прецизна диагностика. Обобщеният хор-

монален профил на болните с ПКС включва: повишено производство на кортизол, повишени базални нива на плазмения кортизол с абнормен циркадиален ритъм, повишена екскреция на кортизол в урината и липса на потискане с дексаметазон. Хормоналната характеристика на истинската болест на Кушинг е сходна. Именно това налага разработване на прецизни методики за отдиференциране на двете заболявания.

### *Свободен кортизол в 24-часова урина.*

Между двете групи болни (БК и ПКС) е възможно пълно припокриване по отношение на концентрацията на свободния кортизол в 24-часова урина. Все пак съществува тенденция нивата на свободния кортизол да са по-ниски при ПКС в сравнение с тези при БК. Оттук произтича и трудността при диференцирането на умерено изразената болест на Кушинг, при която нивата на свободния кортизол са леко повишени, и ПКС. При болните с неусложнен обезитет като правило свободният кортизол не е повишен. Изключение правят 5% от случаите, при които е налице повишение на свободния кортизол в урината. Тези нюанси в интерпретирането на резултатите от измерването на свободния кортизол го правят надежден, но ненапълно прецизен метод за диагноза на БК.

*Ритъм на кортизола.* Известно е, че единични повишени стойности на плазмения кортизол, изследван сутрин, не поставят със сигурност диагнозата синдром на Кушинг, тъй като става въпрос за стресов хормон. Още по-деликатен е въпросът, когато трябва да се интерпретират умерено повишени стойности на сутрешния плазмен кортизол. Според Friedman et al. (8) тези параметри не могат да разграничат умерено изразената БК от ПКС. Ето защо се отдава по-голямо значение на следобедните/вечерните стойности на кортизолемията. Еднократното изследване на плазмения кортизол в 0 часа - в будно състояние (15, 9) или по време на сън (14), е от ключово значение за диференциалната диагноза между пациенти с БК от здрави (14) и пациенти с ПКС (15, 9). В проучването на Rapanicolaou et al. (15) се стига до заключението, че стойност на серумния кортизол над 7,5 µg/dl в полунощ разграничава БК от ПКС (специфичност на метода 100%). Newell-Price et al. потвърждават, че изследването на единична стойност на корти-

зола в полунощ е със 100% чувствителност за диагнозата на синдрома на Кушинг (14).

*Експресен нощен супресионен тест с 1 mg дексаметазон.* Значителна част от болните с ПКС не показват потискане на плазмения кортизол при експресния нощен супресионен тест с 1 mg дексаметазон. Това важи и за около 15% от болните с обезитет. При тази група при провеждане на класическия „малък блокаж“ - 4 x 0,5 mg дексаметазон в продължение на 2 дни (тест на Liddle), се наблюдава потискане. Но дори и тогава малък процент от болните със затлъстяване и ПКС показват фалшиво положителни резултати. Следователно експресният нощен супресионен тест не е достатъчно дискриминативен по отношение на БК и ПКС.

Всички горепосочени тестове насочват, но не поставят със сигурност диагнозата болест на Кушинг/псевдо-Кушинг състояние, поради това че специфичността и чувствителността им са субоптимални. За усъвършенстване на диагностичния подход са предложени допълнителни тестове:

*Тест с CRH - със/без предварително двудневно приложение на дексаметазон.*

„Чист“ тест с CRH. Състои се във въвеждането на CRH и проследяване на нивата на АСТН и кортизола. При БК се наблюдава увеличение на АСТН (с над 100%) и на кортизола (с над 50%). При ПКС е налице бурен кортизолов отговор при слаб отговор на АСТН.

*Тест с CRH, предхождан от блокаж с дексаметазон.* С оглед усъвършенстване на диференциалната диагноза между БК и ПКС се предлага комбиниран тест, включващ приложението на CRH след супресионен тест с дексаметазон (48-часов с 2 mg дексаметазон дневно). Дексаметазонът потиска ендогенната секреция на АСТН. На този фон се провежда стимулационен тест с CRH. Резултатите показват повишение на АСТН и на кортизола при БК и липса на отговор при ПКС (20).

Съобщава се за комбиниран тест между експресния нощен супресионен тест с 1 mg дексаметазон, последван от стимулация с 10 IU LVP (5). Приложен е при 34 болни със синдром на Кушинг (СК), 18 здрави контроли, 4 болни с депресия и 5 с „кушингоиден“ вид. Тестът е показал по-слаба дискриминативна способност - 88,9%

чувствителност и 100% специфичност за СК.

За да се направи прецизна диференциална диагноза между СК и ПКС, е предложен и тестът с опиоидния агонист лоперамид (1). Тестът се състои в перорален прием на 16 mg лоперамид в 8 часа сутринта, последван от измерването на плазмения кортизол след 3,5 часа. Лоперамидът води до потискане на CRH и оттам - до супресия на плазмените АСТН и кортизол при здрави лица, болни с обезитет, ПКС, но не и при СК. Тестът е показал 100% чувствителност и 93% специфичност, което го прави сравним с експресния нощен супресионен тест с 1 mg дексаметазон.

### ТЕСТ С ДЕЗМОПРЕСИН

Moro et al. са проучили ефективността на теста с дезмопресин за диференциална диагноза между БК и ПКС (12). Те изследвали 173 пациенти - 76 болни с активна БК, 30 с ПКС, 36 с неусложнен обезитет и 31 здрави контроли. Болусното интравенозно инжектиране на 10 µg DDAVP е предизвикало сигнификантно повишение на нивата на АСТН и кортизола у болните с БК, но не и при болните с ПКС (таблица 1). Статистически значимо повишение на нивото на АСТН е било регистрирано при здравите лица и болните със затлъстяване, но това покачване е било значително по-малко в сравнение с наблюдаваното при болните с БК. Инжектирането на DDAVP е довело до слабо, несигнификантно увеличение на плазмения кортизол при болните с ПКС, затлъстяване и при здравите контроли, като между отделните групи не били отбелязани значими разлики (таблица 1). Диагностичната точност на теста е оценена на 94%, което значително надхвърля тази на свободния кортизол в 24-часова урина, експресния нощен супресионен тест с 1 mg дексаметазон и измерването на нощния плазмен кортизол. Заключениеето на авторите е, че тестът с DDAVP може да бъде полезен допълнителен тест за оценка на болните с хиперкортизолизъм.

Сходно на цитираното по-горе е и проучването на Malerbi et al. (11). В него се демонстрира ролята на дезмопресиновия тест за диференциалната диагноза между жени с болест на Кушинг, с депресия и здрави жени. След инжек-

**Таблица 1.** Сравнително представяне на отговора на АСТН и плазмения кортизол при теста с дезмопресин при болестта на Кушинг, ПКС, обезитет и при здрави.

**Table 1.** Comparative presentation of the ACTH and cortisol response to desmopressin in Cushing's disease, pseudo-Cushing state, obesity and healthy subjects.

Болест/състояние Disease/state	АСТН	Кортизол Cortisol
Болест на Кушинг/ Cushing's disease	повишение + + + increase + + +	повишение + + + increase + + +
Псевдо-Кушинг състояние/ Pseudo-Cushing state	без промяна no change	без промяна no change
Обезитет/ Obesity	повишение + increase +	без промяна no change
Здрави/ Healthy subjects	повишение + increase +	без промяна no change

тирането на 10 µg дезмопресин интравенозно 14 от 14 пациенти с болест на Кушинг покачили плазмения кортизол с 36% (4-кратно коефициента на вариации). Подобно покачване авторите наблюдавали при 2 от 20 здрави контроли и 4 от 11 пациенти с депресия. Изразено в проценти, това прави 100% от БК, 36% от групата с депресия и 10% от здравите контроли. Чувствителността на теста е оценена на 100%, но с 64% специфичност. Нарастването на кортизола след приложение на дезмопресин е било значително по-високо в групата на БК. Не са наблюдавани значителни разлики в отговорите на болните с депресия и здравите контроли. Основният извод на авторите е, че дезмопресиновият тест може да бъде използван като диференциално диагностичен тест между БК и депресия и че регулацията на ХХН ос е различна при тези две състояния.

Както вече беше споменато, болните с неусложнен обезитет не се включват в класическото определение за ПКС. Изхождайки от тезата, че дезмопресиновият тест може да отграничи ПКС от БК, Tsagarakis et al. първи изказват предположението, че този тест би бил полезен за диференциална диагноза между неусложненото затлъстяване и БК (18). Изследвани са били 20 болни с обезитет - 14 жени и 6 мъже, на които е бил приложен болусно интравенозно 10 µg DDAVP. За сравнение е била изследвана група от 33 болни със СК с различна етиология (25 болни с БК, 3 с окултен ектопичен АСТН синдром и 5 с надбъбречна форма на СК). Броят на болните, отговарящи на критериите за положителен отговор на кортизола и АСТН към дезмопресин (по-

вишение съответно с 20% и 50%), е бил значително по-висок в групата на болните с БК в сравнение с пациентите със затлъстяване. Обобщено, изследването на кортизоловия отговор към дезмопресин е било с 84% чувствителност и 85% специфичност, докато отговорът на АСТН е показал 92% чувствителност и 85% специфичност при диференцирането на БК от обикновен обезитет. Авторите заключават, че дезмопресиновият тест може да се прилага за диференциална диагноза между обезитета и БК, но не и при други форми на синдрома на Кушинг (18).

### ФИЗИОЛОГИЧНИ ОСНОВАНИЯ ЗА ТЕСТА С ДЕЗМОПРЕСИН

Дезмопресинът (1-desamino-8D-arginine vasopressin - DDAVP) представлява синтетичен аналог на аргинин-вазопресина с удължено действие. От много години медикаментът успешно се прилага за лечение на инсипиден диабет. Подобно на другите вазопресинови аналози дезмопресинът стимулира освобождаването на АСТН. Нещо повече, дълго време преди откриването на CRH се е смятало, че именно той е стимулаторът на секрецията на АСТН. Тестът с дезмопресин се основава на факта, че относително високи дози екзогенен вазопресин (100-1000 пъти по-високи от физиологичните) предизвикват стимулация на секрецията на АСТН (активирайки рецепторите V1b). Вазопресинът е мощен стимулатор на секрецията на АСТН, но той осъществява ефекта си синергично с CRH (потенцира стимулирането на АСТН от CRH). Дез-

мопресиновият тест се предлага като надежден в диференциалната диагноза на болестта на Кушинг, тъй като в хода на теста при тези болни се отбелязва значително покачване на нивата на АСТН и кортизола за разлика от по-голямата част от здравите лица и тези с ПКС.

Механизмите на бурния хормонален отговор на АСТН и кортизола към DDAVP остават неизяснени. AVP осъществява ефектите си посредством различни типове рецептори. Хипофизарните ефекти на вазопресина се дължат на специфичното свързване на пептида с V1b рецепторен подвид, който се установява в човешки кортикотрофи (17). Приложен едновременно с CRH, AVP оказва не само адитивен, но и синергичен ефект по отношение на секрецията на АСТН. При някои кортикотропиноми се наблюдава свръхекспресия на V1b и дори V2 рецептори (6). В проучванията и на двата колектива се предполага, че ключовият фактор, отговорен за положителния отговор към дезмопресин при болестта на Кушинг, е *cr*-регулацията на V1b рецепторите. Плъхове, лекувани 6 дни с дексаметазон, показват двукратно увеличение на хипофизарната V1b mRNA. Това дава основание да се допусне, че хроничната хиперкортизолемия води до увеличена експресия на V1b рецепторите в кортикотрофите, което е в основата на отговора към дезмопресин. Losa et al. (10) установяват обратна корелация между базалните нива на АСТН и кортизол и тяхната съответна процентна промяна след приложение на дезмопресин. При групата на болните с БК с положителен отговор към дезмопресин базалните нива на АСТН и кортизола са били сигнификантно по-ниски. Тези резултати поставят под съмнение гореизложената хипотеза. Предположението, че хиперкортизолемията може да предизвика увеличаване на броя на V1b рецепторите в аденохипофизата (*cr*-регулация) и така да доведе до повишения отговор към вазопресин, изглежда малко вероятна и предвид липсата на отговор на АСТН при болните с ПКС (при които също има хиперкортизолемия) (12). Нещо повече, установява се обрат-

на зависимост между базалните нива на кортизола и покачването на кортизола и АСТН след приложение на дезмопресин при групи от болни с ПКС, здрави контроли и болни със затлъстяване. Тези данни са в съответствие с отрицателната обратна връзка на базалните плазмени кортизолови нива и стимулираната секреция на АСТН/кортизол във физиологично състояние и при болни с тежка депресия или анорексия нервоза. Тези факти оспорват ролята на хиперкортизолизма в улесняването на отговора към DDAVP. Липсата на отговор към дезмопресин и към CRH при някои болни с аденоми, секретирателни АСТН, би могла да се обясни чрез променливата експресия на съответните рецептори в отделните тумори (4, 13, 18).

Вече бе споменато, че ПКС представлява функционално активиране на кортикотропната ос, зависимо от CRH. При алкохолици е установена хиперфункция на хипоталамичните неврони, секретирателни CRH. От друга страна, вазопресинът стимулира секрецията на АСТН синергично с CRH. От това следва, че при ПКС би трябвало да има бурен отговор към вазопресин, какъвто не се наблюдава при досега извършените проучвания. Причините за този парадоксален отговор подлежат на изясняване.

### ПЕРСПЕКТИВИ НА ТЕСТА С ДЕЗМОПРЕСИН

Тестът с дезмопресин намира приложение в диференциалната диагноза на АСТН-зависимия синдром на Кушинг. Освен това той е предложен като постоперативна (след транссфеноидална аденомектомия) оценка на риска от възникване на рецидив на болестта на Кушинг. Losa et al. (10) провеждат теста с интравенозно въвеждане на 10 µg дезмопресин при 107 пациенти с БК преди и 5-6 дни след оперативна интервенция. Предварителните им данни сочат, че персистирането на отговор на АСТН към дезмопресин в ранния постоперативен период говори за повишен риск от късен рецидив.

## КНИГОПИС/REFERENCES

1. Ambrosi, B., D. Bochicchio, P. Colombo, C. Fadin, G. Faglia. Loperamide to diagnose Cushing's syndrome. *JAMA*, 1993, 270, 2301-2302.
2. Bjorntorp, P., R. Rosmond. Neuroendocrine abnormalities in visceral obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2000, June, 24, Suppl 2, S80-85.
3. Chrousos, G. P. The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrine and target tissue-related causes. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2000, June, 24, Suppl 2, S50-55.
4. Colombo, P., C. Dell'Asta, L. Barbetta, T. Re, E. Passini, G. Faglia, B. Ambrosi. Usefulness of the desmopressin test in the post operative evaluation of patients with Cushing's disease. *European Journal of Endocrinology*, 2000, 143, 227-234.
5. Contreras, P., V. Araya. Overnight dexamethasone pre-treatment improves the performance of the lysine-vasopressin test in the diagnosis of Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1996, 44, 703-710.
6. Dahia, P. L. M., A. Ahmed-Shuaib, R. A. Jacobs, S. L. Chew, J. Honegger, R. Fahlbusch, G. M. Besser, A. B. Grossman. Vasopressin receptor expression and mutation analysis in corticotropin-secreting tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81, 1768-1771.
7. Elias, A. N., H. Meshkinpour, L. J. Valenta, M. K. Grossman. Pseudo-Cushing's syndrome: the role of alcohol. *J Clin Gastroenterol*. 1982, 4 (2), 137-139.
8. Friedman, T. C., J. A. Yanovski. Morning plasma free cortisol: inability to distinguish patients with mild Cushing syndrome from patients with pseudo-Cushing states. *J Endocrinol Invest*, 1995, Oct, 18 (9), 696-701.
9. Gorges, R., G. Knappe, H. Gerl, M. Venz, F. Stahl. Diagnosis of Cushing's syndrome: re-evaluation of midnight plasma cortisol vs. urinary free cortisol and low-dose dexamethasone suppression test in a large patient group. *J Endocrinol Invest*, 1999, 22, 241-249.
10. Losa, M., P. Mortini, S. Dylgieri, R. Barzaghi, Al. Franzin, C. Mendelli, M. Giovanelli. Desmopressin stimulation test before and after pituitary surgery in patients with Cushing's disease. *Clinical Endocrinology*, 2001, 55, 61-68.
11. Malerbi, D. A., M. C. Frago, A. H. Vieira Filho, E. M. Brenha, B. B. Mendonca. Cortisol and adrenocorticotropin response to desmopressin in women with Cushing's disease compared with depressive illness. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, June, 81 (6), 2233-2237.
12. Moro, M., P. Putignano, M. Losa, C. Invitti, C. Maraschini, F. Cavagnini. The desmopressin test in the differential diagnosis between Cushing's disease and pseudo-Cushing states. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 2000, 11, 4093-4098.
13. Newell-Price, J., L. Perry, S. Medbak, J. Monson, M. Savage, M. Besser, A. Grossman. A combined test using desmopressin and corticotropin-releasing hormone in the differential diagnosis of Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82, 176-181.
14. Newell-Price, J., P. Trainer, L. Perry, J. Wass, A. Grossman, M. Besser. A single sleeping midnight cortisol has 100% sensitivity for the diagnosis of Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1995, 43, 545-550.
15. Papanicolaou, D. A., J. A. Yanovski, G. B. Cutler, G. B. Chrousos, L. K. Nieman. A single sleeping midnight serum cortisol measurement distinguishes Cushing's syndrome from pseudo-Cushing states. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 83, 1163-1167.
16. Pasquali, R., V. Vicennati. Activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in different obesity phenotypes. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2000, June, 24, Suppl 2, S47-49.
17. Sugimoto, Y., M. Sato, S. Mochizuchi, Y. Watanabe, S. Hashimoto, H. Kawashima. Molecular cloning and functional expression of cDNA encoding the human V1b vasopressin receptor. *J Biol Chem*, 1994, 269, 27088-27092.
18. Tsagarakis, S., V. Vasiliou, P. Kokkoris, G. Stavropoulos, N. Thalassinos. Assessment of cortisol and ACTH responses to the desmopressin test in patients with Cushing's syndrome and simple obesity. *Clinical Endocrinology*, 1999, 51, 473-477.
19. Wright, J. Endocrine effects of alcohol. *Clin Endocrinol Metab*, 1978, 7 (2), 351-367.
20. Yanovski, J. A., G. B. Cutler Jr, G. P. Chrousos, L. K. Nieman. Corticotropin-releasing hormone stimulation following low-dose dexamethasone administration. A new test to distinguish Cushing's syndrome from pseudo-Cushing's states. *JAMA*, 1993, 269, 2232-2238.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ  
Д-р Мария Янева  
Клиничен център по ендокринология  
и геронтология  
ул. "Дамян Груев" 6, София, 1303

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE  
M. Yaneva, MD  
Clinical Center of Endocrinology  
and Gerontology,  
6, Damian Gruev Str.  
1303, Sofia, Bulgaria

## Метод за проследяване на дълготрайния контрол на захарния диабет с интензивно синьо оцветено производно на борната киселина

М. Николов, В. Христов\*

Медицински университет - София

Предклиничен университетски център, Катедра по химия и биохимия

\*Катедра по вътрешни болести, Клиника по ендокринология

## A Method for Assessment of Long-term Control of Diabetes Mellitus by Means of an Intensively Blue Coloured Derivative of the Boronic Acid

M. Nikolov, V. Christov\*

Medical University - Sofia

Preclinical University Center, Department of Chemistry and Biochemistry

\*Department of Internal Diseases, Clinic of Endocrinology

### Резюме

Гликохемоглобинът със структурата си, кинетиката си на образуване и разграждане е обективен маркер на дълготрайната гликемия при болните със захарен диабет. Нивото му отразява средната гликемия за предходните шест до осем седмици. Чрез редовното му определяне с надеждни лабораторни методи е възможно навременното коригиране и отстраняване на нарушения в метаболизма и избягването на тежки късни увреждания, съпровождащи диабета.

В настоящия обзор е разгледана по-подробно афинитетната хроматография с нейните

### Abstract

The glycohaemoglobin with its structure, kinetics of formation and degradation is an objective marker of the long-term glycaemia in the patients with diabetes mellitus. Its level reflects the mean glycaemia over the previous six to eight weeks. Through regular determinations of the glycoHb by means of reliable laboratory methods is possible to correct on time and it eliminate the metabolic disorders and so to prevent the severe late complications of diabetes.

The affinity chromatography method with its positive aspects - determination of stable

положителни страни - определяне само на стабилните кетоамини, слабо влияние на промени на рН на буфера и температурата, липса на интерференция с HbF. В норвежкия клон на Axis-Shield е синтезирана ксилен цианол-диаминопропанол-карбоксифенил борна киселина. Този син конюгат на борната киселина реагира специфично с цис-диолите на гликоHb, като ги оцветява, а останалият Hb остава непроменен. След това рефлектометрично се определя процентът на HbA<sub>1c</sub> в пробата с малък и лек преносим апарат, NicoCard Reader. Методът е наречен NicoCard HbA<sub>1c</sub> и е основан на афинитетно свързване и рефлектометрично определяне на гликоHb. Без да е хроматографски, той притежава всички положителни страни на афинитетната хроматография. Тестът е бърз - 3 минути, използва 5 µl проба и може да се осъществи до леглото на болния по време на визитация. Той е сравнително евтин и достъпен в България.

**КЛЮЧОВИ ДУМИ:** гликохемоглобин, афинитетно свързване, рефлектометрично определяне, дълготраен контрол на диабета.

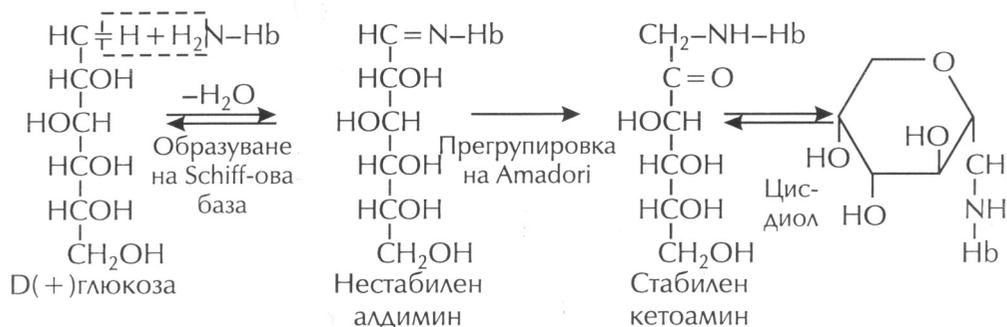
ketoamines only, a weak influence of changes of the pH of the buffer and temperature, lack of interference of HbF is considered in details in the present review. Xylene cyanol-diaminopropanol-carboxyphenyl-boronic acid is synthesized in the Norway branch of the Axis-Shield Group. This blue conjugate of the boronic acid binds specifically the cis-diols of the glycoHb making them coloured, while the rest of Hb remains unchanged. The percentage of the HbA<sub>1c</sub> can be determined reflectometrically by means of a small and light portable apparatus NicoCard Reader. This method called NicoCard HbA<sub>1c</sub> is based on an affinity binding and evaluation of the glycoHb by reflectometer. This method is not a chromatographic one but nevertheless it has all positive features of the affinity chromatography. The test is rapid - within three minutes, utilizes 5 µl whole blood and can be done at the patient's bed. It is relatively cheap and is now accessible in Bulgaria.

**KEY WORDS:** glycohaemoglobin, affinity binding, reflectometric determination, long-term control of diabetes.

Определянето на гликохемоглобина (гликоHb) е безценен тест при дълготрайния контрол на захарния диабет. Нивото му в кръвта носи полезна информация както за лекуващия лекар, така и за пациента. Стратегията за постепенно понижаване на концентрацията му в хода на адекватна компенсация и достигане до нормална концентрация, характерна за здравите хора, се възприема като победа и от самите диабетно болни. Така вероятността за достигане до фатал-

ните късни диабетни увреждания реално намалява или изчезва.

Протеините, и по-специално хемоглобинът (Hb), реагират с кръвната глюкоза неензимно. Това става на два етапа. Първо една обратима реакция води до получаване на алдимин. Последният се прегрупира и се образува стабилен кетоамин. Дадената по-долу схема показва формирането на HbA<sub>1c</sub> чрез реакция на глюкозата с N-крайния валин на β-веригата.



Новообразуваните еритроцити постъпват в кръвообращението без свързана глюкоза. Постепенно свободно преминаващата през еритроцитните мембрани глюкоза реагира необратимо с Hb през време на живота на еритроцитите. Скоростта на образуване на гликоHb зависи от концентрацията на кръвната глюкоза и полуживота на еритроцитите. Те циркулират в кръвта 120 дни, преди да настъпи разрушаването им.

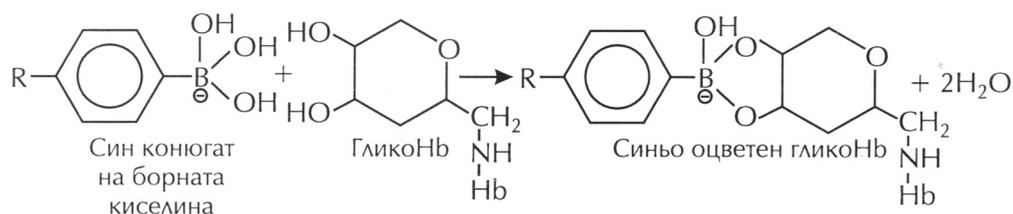
Средната концентрация на гликоHb е динамична променлива величина и отразява средното глюкозно ниво за предишните шест до осем седмици. Това отношение е демонстрирано при продължителното изследване DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) (16, 17).

Чрез редовното определяне на гликоHb с надеждни лабораторни методи става възможно навременното коригиране и отстраняване на нарушения в метаболизма и избягването на тежките късни увреждания, свързани с диабета (17). Методите за определяне на гликоHb се основават на няколко принципа: разлики в електричния заряд на молекулата му - йоннообменна хроматография, мануални методи (13, 18), готови опаковки с предварително напълнени и буферирани малки колонки (1, 3, 19), високопроизводителна течна хроматография (HPLC) (20, 21), електрофореза на агаров гел (2), изоелектрично фокусиране (12); разлики в имунологичните му характеристики - радиоимунологично определяне (8); невъзможност за свързване с фитиновата киселина - спектрофотометрично определяне (19); методи, използващи химични промени на молекулата на гликоHb и цветово белязване на получените продукти - колориметричен метод с тиобарбитурова киселина (10), флуориметричен метод (6); афинитетна хроматография (4, 9) и мас-спектрометрия като актуален референтен метод (11). Резултатите, които дават тези методи, често

се различават съществено, отчасти поради липсата на стандартизация между лабораториите (16). Някои методи отстраняват лабилния алдимин и измерват само стабилния HbA<sub>1c</sub>. Такъв е случаят при измерванията в DCCT, които използват автоматизиран HPLC метод.

Тук ще се спрем на афинитетната хроматография. Методът е публикуван през 1981 г. от Bouriotis et al. (4) и Mallia et al. (9), независимо един от друг. Върху агарозна матрица е имобилизирана m-аминофенилборна киселина, която селективно свързва цис-диоли (фруктозилни остатъци), и гликоHb се задържа в колонката, докато останалият хемоглобин я напуска. След това с шествалентния захарен алкохол сорбитол се измества и елуира гликоHb. Методът определя стабилните кетоамини (всички видове гликоHb, а не само HbA<sub>1c</sub>) и не се влияе от промени в рН на буфера и температурата. Друго предимство е, че не се наблюдава интерференция с HbF. Методът може да се стандартизира като HbA<sub>1c</sub>, тъй като тоталният гликоHb корелира добре с него (5). Всичко в тази област изглежда като разорана нива, в която няма какво друго да се направи.

Двадесетина години по-късно норвежкият клон от Axis-Shield опровергава успешно това. Те синтезират ксилен цианол-диаминопропанол-карбоксифенил борна киселина. Ксилен цианолът е синьо багрило от реда на сулфонирани трифенилметанови бои. Абсорбционният му максимум е при 618 nm. "Ръката" от 1,3-диамино-2-пропанол подобрява възможността за свързване на остатъка от борна киселина с цис-диолите на гликоHb. За засилване на афинитета спрямо цис-диоли и за подобряване на стабилността на съединението конюгатът включва p-карбоксифенилборна киселина. Принципът на NicoCard HbA<sub>1c</sub> е следният:



Приготвена е и готова опаковка за анализ. Правят се основните бързи манипулации:

#### 1. Преципитиране на хемоглобина

Хемоглобинът се утаява с прибавяне на цинк (II) йони ( $ZnCl_2$ ) с подходяща концентрация, така че много малко количество други серумни протеини се съутаяват.

#### 2. Анализ на гликоHb

Готовите опаковки NicoCard HbA<sub>1c</sub> съдържат тестови устройства с порьозен филтър и епруветки с предварително приготвени реагенти. Това са реагенти за лизиране на еритроцитите, за преципитиране на хемоглобина и цветен конюгат, свързващ цис-диолите на гликоHb. При добавяне на кръвта към реагента еритроцитите лизират, хемоглобинът преципитира и конюгатът синя борна киселина се свързва селективно с цис-диола на гликоHb. Аликвотна част от сместа се поставя върху тестовото устройство и се филтрува. Хемоглобинът, свързан и свободен, се задържа върху филтъра, а течността се абсорбира в подложката под филтъра. С Macbeth Colour Eye Reflectometer се измерва интензитетът на абсорбция/разсейване на синьото (гликоHb, 620 nm) и червеното оцветяване (общ Hb, 460 nm). Отношението 620 nm/460 nm е пропорционално на процента на HbA<sub>1c</sub> в пробата. Коефициентите на вариация за аномална стойност на HbA<sub>1c</sub> са: в серия - 3,8%, и във време - 5,1%. Не са забелязани интерференции с глюкоза (до 16,7 mmol/l, съответно 300 mg/dl), билирубин (до 0,342 mmol/l, респективно 20 mg/dl) и липиди (до 12,4 mmol/l или 1000 mg/dl). Различните нива на хемоглобин в пробата практически не повлияват измерените стойности на HbA<sub>1c</sub>, защото това се коригира автоматично с математическа формула. Фруктозаминът - гликираните серумни протеини, добавени към проби с нормален и аномален HbA<sub>1c</sub>, също не интерферират с резултатите от това изследване. Друго ценно предимство на метода е, че няма наслагване с алдимино (Шифовата база, пре-HbA<sub>1c</sub>).

Направена е корелация на NicoCard HbA<sub>1c</sub> Bio-Rad HPLC метод ( $r = 0,973$ , уравнение на връзката:  $y = 0,97x + 0,6$ ). Подобна корелация е получена и с имунологичен метод (Bayer DCA 2000, Boehringer Tina-Quant).

Съвсем наскоро Roberts et al. (14) намират, че присъствието на хемоглобиновите варианти HbC и HbS не довеждат до статистически значимо повишени разлики при резултатите, по-

лучени с NicoCard HbA<sub>1c</sub>.

Реагентът е много стабилен: съхранение в хладилник при 4 °C за една година запазва > 90% активност и при 23 °C за шест седмици > 90% активност.

Описаният метод е забележителна аналитична новост. Той се появява на базата на афинитетната хроматография и същевременно не е хроматография. Хроматографията включва след старта си и фаза на развитие. През това време веществата се движат през хроматограмата и забележимо се разделят на основата на съответния хроматографски принцип. При този метод преципитираният хемоглобин, в това число и афинитетно белязаният със син конюгат гликоHb, се намират на старта, върху филтъра и не се движат. С крайника на апарата Macbeth Colour Eye Reflectometer автоматично се измерват интензивностите на синьото и червеното оцветяване. Методът би трябвало да се определи като афинитетно свързване и рефлектометрично изследване на гликоHb.

### ЗАКЛЮЧЕНИЯ

1. Синтезираният цветен конюгат синьо багрило-борна киселина е отлична проба за рефлектометрично определяне на гликоHb.

2. Подбраната концентрация на цинкови йони в реагента позволява специфичното преципитиране на хемоглобина.

3. Методът е с широк обхват (4-18% HbA<sub>1c</sub>), добра възпроизводимост и корелира добре с HPLC и имунологичните методи. Вариации в серумните компоненти или други гликирани серумни протеини не повлияват резултатите. Вариации в хемоглобиновите нива на пробите оказват влияние, но с математическа формула това се коригира автоматично.

4. Тестът е бърз (в рамките на 3 минути), използва малък обем проба (5 µl), лесен е за изпълнение и много подходящ за тестване на гликоHb до леглото на болния по време на визитация. Опаковката включва инструмента NicoCard Reader за определяне на отразяването при 460 и 620 nm и автоматично изчисляване на процента на HbA<sub>1c</sub>. Изчислението използва корекционна формула за различни концентрации на хемоглобин.

5. Методът е сравнително евтин и достъпен в България.

## Книгопис/References

1. Петкова, М., С. Златева, М. Николов, Ас. Цанев. Ниво на гликирания хемоглобин у болни със затлъстяване. *Вътрешни болести*, 27, 1988, 4, 21-24.
2. Aleyassine, H., R. J. Gardiner, L. A. Blankstein et al. Agar gel electrophoretic determination of glycosylated hemoglobin: effect of variant hemoglobins, hyperlipidemia, and temperature. *Clin Chem*, 27, 1981, 472-475.
3. Arnquist, H., G. Cederblad, G. Hermansson et al. A chromatographic method for measuring haemoglobin A<sub>1c</sub>: comparison with two commercial kits. *Ann Clin Biochem*, 18, 1981, 240-242.
4. Bouriotis, V., J. Scott, A. Galloway et al. Measurement of glycosylated haemoglobins using affinity chromatography. *Diabetologia*, 21, 1981, 579-580.
5. Finke, A., U. Kobold, W. Hoelzel et al. Preparation of a candidate primary reference material for the international standardization of HbA<sub>1c</sub> determinations. *Clin Chem Lab Med*, 36, 1998, 5, 299-308.
6. Gallop, P. M., R. Fluckiger, A. Hanneken et al. Chemical quantitation of hemoglobin glycosylation: fluorimetric detection of formaldehyde released upon periodate oxidation of glycohemoglobin. *Ann Biochem*, 117, 1981, 427-432.
7. Jervel, J. An update on diabetes including HbA<sub>1c</sub> and microalbumin. Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway, 2000, 26-30.
8. Kopp, H. P., A. Festa, P. Hopmeier et al. Evaluation einer neuen Methode zur Bestimmung von Hämoglobin mittels monoklonaler Antikörper (DCA 2000). *Wien Klin Wochenschr*, 108, 1996, 1, 16-19.
9. Mallia, A. K., G. T. Hermanson, R. J. Krohn et al. Preparation and use of a boronic acid affinity support for the separation and quantitation of glycosylated hemoglobin. *Anal Lett*, 14, 1981, 649-661.
10. Menez, J. F., A. Meskkar, D. Lucas et al. Glycosylated hemoglobin and serum proteins: semiautomated estimation. *Clin Chem*, 27, 1981, 1947-1948.
11. Miedema, K. Electrospray mass spectrometry for measurement of glycohemoglobin. Editorial. *Clin Chem*, 43, 1997, 5, 705-707.
12. Mortensen, H. B., C. Christophersen. Glycosylation of human haemoglobin A in red blood cells studied in vitro. Kinetics of the formation and dissociation of haemoglobin A<sub>1c</sub>. *Clin Chim Acta*, 134, 1983, 317-326.
13. Nikolov, M., L. Damianova. A simple method for routine measurement of glycosylated haemoglobin. *Diabetologia*, 24, 1983, 5, 396.
14. Roberts, W. L., B. K. De, D. Brown et al. Effects of hemoglobin C and S traits on eight glycohemoglobin methods. *Clin Chem*, 48, 2002, 2, 383-385.
15. Santiago, J. V. Lessons from the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes*, 1993, 42, 1549-1554.
16. The DCCT Research Group. Results of feasibility study. *Diabetes Care*, 1987, 10, 1-19.
17. The DCCT Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 329, 1993, 977-986.
18. Trivelli, L. A., H. M. Ranney, H. T. Lai. Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 284, 1971, 353-357.
19. Wallinder, O., G. Ronquist, P. J. Frager. New spectrophotometric method for the determination of hemoglobin A<sub>1c</sub> compared with microcolumn technique. *Clin Chem*, 28, 1982, 96-99.
20. Weykamp, C. W., T. J. Penders, F. A. Muskiet et al. Evaluation of a reference material for glycated haemoglobin. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 34, 1996, 1, 67-72.
21. Weykamp, C. W., T. J. Penders, K. Miedema et al. Standardization of glycohemoglobin results and reference values in whole blood studies in 103 laboratories using 20 methods. *Clin Chem*, 41, 1995, 82-86.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ  
Доц. д-р Владимир Христов  
Катедра по вътрешни болести  
Клиника по ендокринология  
ул. Св. Георги Софийски 1, София 1432

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE  
Assoc. Prof. Vladimir Christov, MD  
Department of Internal Diseases  
Clinic of Endocrinology  
1, Sv. Georgi Sofijski Str.  
1431 Sofia, Bulgaria

## The Effects of Testosterone and Aromatase Inhibitor on Bone: Action Mechanisms of Androgens

Shin-Ichi Noguchi, Ichiro Iwamoto, Shoichiro Kosha,  
Toshinori Fujino\*, Yukihiro Nagata

Faculty of Medicine, Kagoshima University - Kagoshima, Japan  
Department of Obstetrics and Gynecology

\*School of Health Sciences

## Ефектите на тестостерона и инхибитора на ароматазата върху костите: действащи механизми на андрогените

Шин-Ичи Ногучи, Ичиро Ивамото, Шоичиро Коша,  
Тошинори Фужино\*, Юкихиро Нагата

Факултет по медицина, Университет на Кагошима - Кагошима, Япония  
Катедра по акушерство и гинекология

\*Институт за здравни науки

### Резюме

**Цел:** Да се изследват механизмите на действие на андрогените върху костите.

**Методи:** Действието на тестостерона със или без блокада на андрогенния рецептор с флу-тамид върху пролиферацията и продукцията на костни маркери при човешка остеобластна клетъчна линия бе проучено чрез изследване на клетките Saos-2. Ефектът на инхибитора на ароматазата, фадрозол хидрохлорид, заедно с тестостерона върху минералната костна плътност (BMD) беше изследван и върху кастрирани плъхове.

**Резултати:** Лечението с тестостерон по-

### Abstract

**Objective:** To investigate the mechanisms of the effects of androgens on bone.

**Methods:** The effect of testosterone with or without an androgen receptor blockade, flutamide on proliferation and production of bone metabolic markers in a human osteoblastic cell line, Saos-2 cells was investigated. The effect of an aromatase inhibitor, fadrozol hydrochloride, together with testosterone on bone mineral density (BMD) in castrated rats was also examined.

**Results:** Testosterone treatment enhanced the proliferation of Saos-2 cells and increased the

---

нижава пролиферацията на клетките Saos-2 и повишава производството на остеокалцин (Gla-OC) и TGF- $\beta$  в клетките ( $p < 0,05$ ). Тези ефекти се инхибират от блокадата на андрогенния рецептор. Инхибиторът на ароматазата заедно с тестостерона намалява BMD при кастрирани мъжки плъхове.

**Изводи:** Тестостеронът има протективно действие върху костите чрез стимулиране на пролиферацията и производството на Gla-OC и TGF- $\beta$  в остеобластите, което поне отчасти се дължи на свързване с андрогенния рецептор. Освен това андрогените имат и предпазващо действие върху костния скелет като се превръщат в естрогени.

---

**КЛЮЧОВИ ДУМИ:** андрогени, тестостерон, човешка остеобластно подобна клетъчна линия, инхибитор на ароматазата, плъхове.

---

## INTRODUCTION

It is well known that estrogen deficiency in postmenopausal women is one of the factors in developing osteoporosis (1), which leads to an increased risk of skeletal fractures. Estrogen replacement therapy has been shown to be effective in preventing bone loss in postmenopausal women (2). Numerous studies have been reported regarding the action mechanisms of estrogens on bone (3).

Androgens also seem to have bone-protective effects. Wakley et al. reported that androgen treatment prevented loss of cancellous bone in the orchidectomized rat (4).

Others also reported that testosterone attenuates bone loss caused orchidectomy in rats and mice (5). In human, androgen deprivation therapy for prostate cancer induced progressive osteoporosis (6). However, little about the mechanisms of effects of androgens on bone has been elucidated, and only a few studies have been reported (7).

Human osteoblast-like cells have androgen receptor (8, 9), as well as estrogen receptor (8). These findings suggest that bone is one of the target organs of androgens and that androgens exert their action on bone directly. On the other hand, human osteoblast-like cells have the activity of me-

production of osteocalcin (Gla-OC) and TGF- $\beta$  in the cells ( $p < 0,05$ ). These effects were inhibited by the androgen receptor blockade. The aromatase inhibitor together with testosterone decreased BMD in castrated male rats.

**Conclusions:** Testosterone exerts its protective effects on bone through enhancing the proliferation and production of Gla-OC and TGF- $\beta$  in osteoblasts at least partly by binding to androgen receptor. Besides, androgens may also have a bone-protective effect by being converted to estrogens.

---

**KEY WORDS:** androgens, testosterone, human osteoblast-like cell line, aromatase inhibitor, rats.

---

tabolizing androgens (10). Aromatase activity in rat (11) and human osteoblastic cells (12) has been demonstrated, together with the possibility that estrogens which are converted from androgens exert the effect on bone, that is, an indirect effect of androgens on bone.

This study was performed to further elucidate the action mechanisms of androgens on bone. We first investigated the effects of testosterone with or without an androgen receptor blockade on the proliferation and production of bone metabolic markers in a human osteoblast-like cell line in order to examine the direct action of androgens. We then examined the effect of an aromatase inhibitor together with testosterone on bone mineral density (BMD) in castrated rats to test an indirect action of androgens on bone.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell line, rats and reagents

Saos-2 cells, a human osteoblast-like cell line was purchased from Riken Gene Bank (Saitama, Japan). This cell line has androgen receptor and estrogen receptor (5).

Male and female Sprague-Dawley rats were purchased from Japan SLC Inc. (Shizuoka, Japan).

Flutamide, an androgen receptor blockade was purchased from Nippon Kayaku (Tokyo, Japan), and fadrozole hydrochloride, an aromatase inhibitor was obtained from Novartis (Tokyo, Japan). Testosterone enanthate (T) was from Sherring (Berlin, German).

**Effects of testosterone with or without an androgen receptor blockade on the proliferation and production of bone metabolic markers in a human osteoblastlike cell line, Saos-2 cells**

Saos-2 cells were cultured in McCoy 5A medium supplemented with 10% FCS. T and flutamide, the androgen-receptor blockade were diluted in ethanol and then further diluted with the culture medium. After plating out Saos-2 cells in 96-well microplates at a density of 5000 cells/well, T ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  M) was added to the cultures. To block the action of T, flutamide ( $10^{-7}$  M) was added at the same time. After incubation for 72 hours the proliferation activity was measured by MTT assay.

For examining the effects of T on the production of Gla-OC, TGF- $\beta$ , and IL-6, Saos-2 cells adjusted to 106 cells/well were cultured for 24 and 72 hours in the presence of T ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  M) with or without flutamide ( $10^{-7}$  M). The levels of Gla-OC, TGF- $\beta$ , and IL-6 in the culture supernatants were measured by ELISA. CVs of each assay were 4,3% for Gla-OC, 3,3% for TGF- $\beta$ , and 3,0% for IL-6, respectively.

The experiments were independently repeated three times. For the control, ethanol 1000-fold diluted with culture medium was used in the experiments.

**Effect of the aromatase inhibitor together with testosterone on BMD in castrated rats**

A total of 80 17-week-old male and female rats (40 males and 40 females) were used in this study. They were divided into 10 weight-matched groups (10 animals per group). Of the 80 rats, 10 male and 10 female rats did not undergo castration, sacrificed at 18 weeks of age, and immediately sent to us. The rest of them, 60 rats were castrated at 17 weeks of age at Japan SLC Inc. and sent to us a week after castration. The castrated rats were treated as follows:

1. Ten male and 10 female rats received six-week administration of flutamide (16 mg/kg, thrice a week) together with T (T + androgen receptor blockade group).

2. Ten male and 10 female rats received six-week administration of fadrozole hydrochloride (20 mg/kg, thrice a week) together with T (T + aromatase inhibitor group).

3. Ten male and 10 female rats received no treatment (non-treatment group).

After 6 weeks of treatment they were sacrificed at the age of 24 weeks. BMD in the right femur of the castrated and non-castrated rats was measured in our laboratory using a DEXA (Model DCS-600, Aloka Co.). The CV was 1,3% or lower.

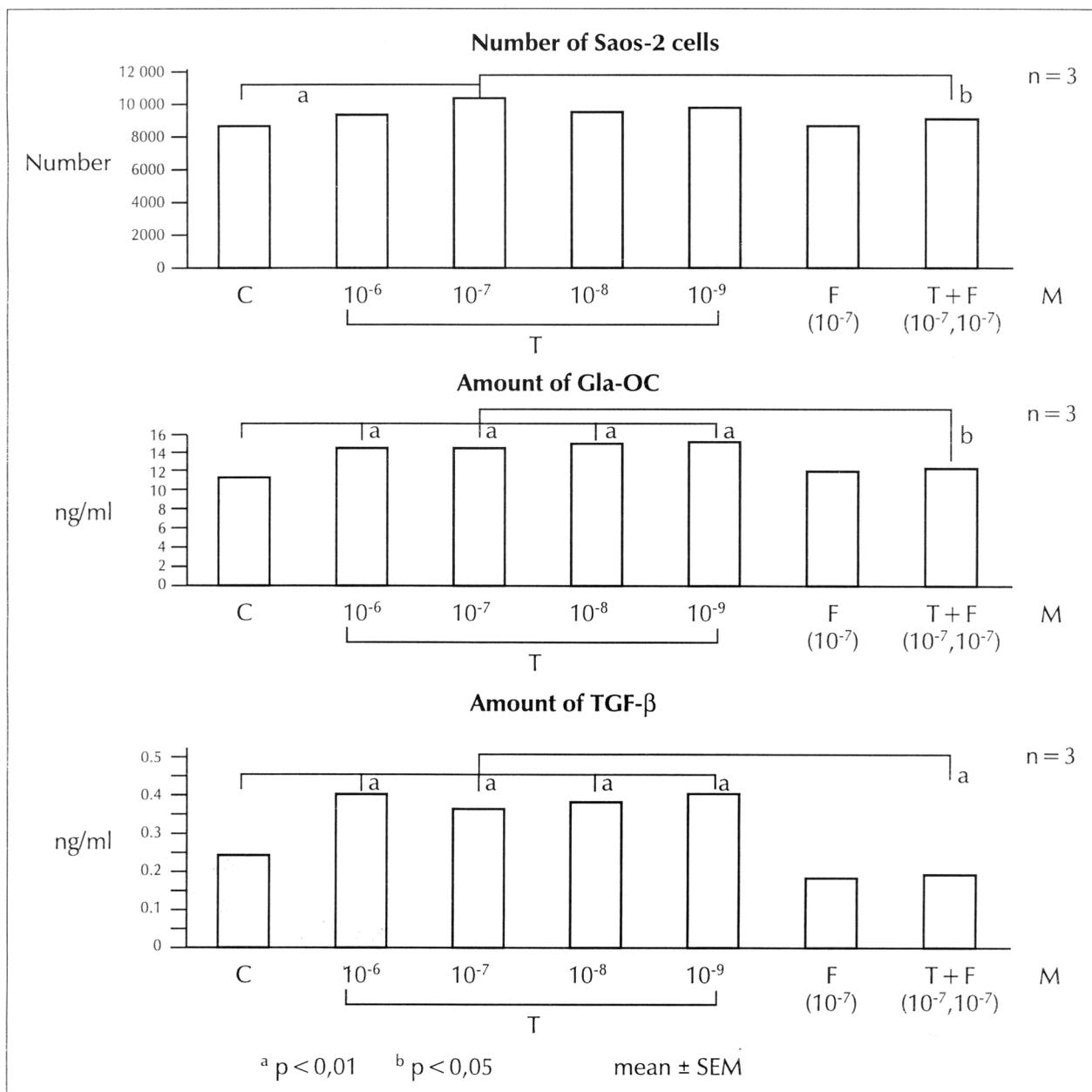
**Data analysis**

We first used one-way analysis of variance (ANOVA) to test if any differences existed among the means. When one-way ANOVA showed a statistical difference, we then used Fisher's protected least significant difference to identify which pairs of means differed significantly. P values below 0,05 were considered to be statistically significant.

**RESULTS**

**Effects of testosterone on the proliferation and production of bone metabolic markers in the human osteoblast-like cell line, Saos-2 cells**

Seventy-two-hour incubation with T ( $10^{-7}$  M) significantly increased the number of Saos-2 cells by MTT assay compared to the control ( $p < 0,01$ ), and this increase was significantly inhibited by flutamide ( $10^{-7}$  M), the androgen receptor blockade ( $p < 0,05$ ) (fig. 1). No significant difference was observed in Gla-OC production in the cells 24 hours after T administration (data not shown), but T ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  M) administration increased the production of Gla-OC significantly compared with the control after 72 hours ( $p < 0,01$ ). The increase was significantly inhibited by flutamide ( $10^{-7}$  M) ( $p < 0,05$ ) (fig. 1). Similarly, TGF- $\beta$  levels were not significantly different 24 hours after T administration (data not shown). However, 72-hour-incubation with T ( $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  M) increased TGF- $\beta$  levels significantly compared with the control ( $p < 0,01$ ). The increase was significantly inhibited by flutamide ( $p < 0,01$ )



**Fig. 1.** The effects of testosterone ( $10^{-6}$ - $10^{-9}$  M) with or without the androgen receptor blockade, flutamide ( $10^{-7}$  M) on the number of Saos-2 cells (72-hour incubation)(upper figure), the effects of testosterone ( $10^{-6}$ - $10^{-9}$  M) with or without flutamide ( $10^{-7}$  M) on GLa-OC production in Saos-2 cells (middle figure) and the effects of testosterone ( $10^{-6}$ - $10^{-9}$  M) with or without flutamide ( $10^{-7}$  M) on TGF- $\beta$  production in Saos-2 (lower figure). Data were shown mean  $\pm$  SEM. C - control, T - testosterone, F - flutamide.

**Table 1.** The effect of testosterone and aromatase inhibitor on BMD ( $\text{mg}/\text{cm}^2$ ) in the male and female castrated rats.

	Male	Female
Non-castration group (18 weeks old, n = 10)	117,2 $\pm$ 4,94	106.1 $\pm$ 6,49
Non-treatment group (24 weeks old, n = 10)	126,2 $\pm$ 5,48 (100)	107,1 $\pm$ 3,70 (100)
T + androgen receptor blockade group (24 weeks old, n = 10)	126,3 $\pm$ 4,18 <sup>a</sup> (100,1)	109,3 $\pm$ 4,37 (102,1)
T + aromatase inhibitor group (24 weeks old, n = 10)	119,9 $\pm$ 7,13 <sup>b</sup> (95)	105,5 $\pm$ 5,36 (98,5)

<sup>a, b</sup> p < 0,05, mean  $\pm$  SEM. Parentheses show the percentage to non-treatment group. T - testosterone

(fig. 1). IL-6 production was not different from the control 24 or 72 hours after T administration (data not shown).

#### **Effect of the aromatase inhibitor together with testosterone on BMD in castrated rats**

In male castrated rats, BMD in T + androgen-receptor blockade group was same as control group (non-treatment group). However, BMD in T + aromatase inhibitor group was lower than control group (decreased by 5 %), although the difference was not statistically significant (table 1).

In female castrated rats, T + androgen receptor blockade did not have any effect on BMD. The decrease in BMD caused by testosterone + aromatase inhibitor treatment was slight (1,5% decrease) (table 1).

#### **DISCUSSION**

To further elucidate the effects and mechanisms of testosterone on bone, we investigated the effects of testosterone on the proliferation and production of bone metabolic markers in a human osteoblast-like cell line, Saos-2 cells. Seventy-two-hour incubation with testosterone increased the number of Saos-2 cells and it also increased Gla-OC and TGF- $\beta$  production in Saos-2 cells. These effects of testosterone were reversed by flutamide, an androgen receptor blockade. Gla-OC and TGF- $\beta$  are bone formation metabolic markers. These results suggest that testosterone exerts its bone-protective effect by enhancing the proliferation and the production of Gla-OC and TGF- $\beta$  in osteoblasts and that its action is at least partly through binding to androgen receptor(s) of osteoblasts. IL-6 is a cytokine that is produced by osteoblastic lineage cells and promotes osteoclastogenesis and bone resorption. Hofbauer et al. reported that testosterone suppressed TNF- $\alpha$ /TL-1 $\beta$ -stimulated IL-6 mRNA levels in a human osteoblastic cell line (hFOB/AR-6) (16), suggesting that androgens exert antiresorptive effect on bone through suppression of osteoblast IL-6 production. In the present study, however, we could not observe a decrease in Saos-2 cells IL-6 production by testosterone treatment. The absence of effect by testosterone may be due to that the basal level of IL-6 production in Saos-2 cells was low and consequently the difference was not detectable.

Since Saos-2 cells have not only androgen receptor, but also estrogen receptor, there remains a possibility that estrogens converted from androgens including testosterone administered also exerted their effects on Saos-2 cells in the present in vitro study. To investigate the possibility that androgens exerted the effects on bone indirectly, after being converted to estrogens by aromatase, we performed the experiment using the aromatase inhibitor, fadrozole hydrochloride. The effect of fadrozole together with testosterone on BMD in castrated male and female rats were examined. In male castrated rats, fadrozole together with testosterone induced reduction in BMD, compared to the non-treatment castrated rats. Although the decrease in BMD observed in the present study was not statistically significant, we think that the difference would have been significant, if the sample size had been larger.

The decrease in BMD in fadrozole-treated castrated rats in the present study suggests that androgens have a bone-protective effect also via being converted to estrogens by aromatase in the osteoblasts. Vanderschueren et al. (17) reported that treatment of male rats with vorozole, another non-steroidal aromatase inhibitor, increased bone resorption.

So far two men affected with congenital aromatase deficiency have been reported in the literature. Morishima et al. (18) described a man with a point mutation in exon 9 of the aromatase gene who developed osteoporosis. Increased bone mass in them was obtained as a result of estrogen replacement therapy (19).

In the present experiment with the female castrated rats, the effect of the aromatase inhibitor on BMD was small compared to the male castrated rats. The difference in the effect of the aromatase inhibitor on BMD between male and female castrated rats suggests the presence of sex difference in the aromatase activity or the enzyme level, which remains to be elucidated.

**In conclusion**, testosterone exerts its bone-protective effect through enhancing the proliferation and production of Gla-OC and TGF- $\beta$  in osteoblasts, and the action of testosterone is at least partly by binding to androgen receptor. In addition to the direct effect, androgens may also have an indirect bone-protective effect, being converted to estrogens in male rats.

## КНИГОПИС/REFERENCES

1. Richelson, L. S., H. W. Wahner, L. J. Melton III, B. L. Riggs. Relative contributions of aging and estrogen deficiency to postmenopausal bone loss. *N Engl J Med*, 1984, 311, 1273-1275.
2. Ettinger, B., H. K. Genant, C. E. Cann. Long-term estrogen replacement therapy prevents bone loss and fractures. *Ann Intern Med*, 1985, 102(3), 319-324.
3. Pacifici, R., C. Brown, E. Puscheck, E. Friedrich, E. Slatopolsky, D. Maggio, R. McCracken, L. V. Avioli. Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(12), 5134-5138.
4. Wakley, G.K., H. D. Schutte Jr, K. S. Hannon, R. T. Turner. Androgen treatment prevents loss of cancellous bone in the orchietomized rat. *J Bone Miner Res*, 1991, 6(4), 325-330.
5. Vanderschueren, D., E. V. Herock, W. J. Visser, L. P. C. Schot, R. Bouillon. Bone and mineral metabolism in aged male rats: short and long term effects of androgen deficiency. *Endocrinology*, 1992, 130(5), 2906-2916.
6. Daniell, H. W., S. R. Dunn, D. W. Ferguson, G. Lomas, Z. Niazi, P. T. Stratte. Progressive osteoporosis during androgen deprivation therapy for prostate cancer. *J Urol*, 2000, 163(1), 1810-1816.
7. Vanderschueren, D., R. Bouillon. Androgens and bone. *Calcif Tissue Int*, 1995, 56(5), 341-346.
8. Colvard, D., T. Spelsberg, E. Eriksen, P. Keeting, B. L. Riggs. Evidence of steroid receptors in human osteoblast-like cells. *Connect Tissue Res*, 1989, 20(1-4), 33-40.
9. Orwoll, E. S., L. Stribrska, E. E. Ramsey, E. J. Keenan. Androgen receptors in osteoblast-like cell lines. *Calcif Tissue Int*, 1991, 49(3), 183-187.
10. Bruch, H.R., L. Wolf, R. Budde, G. Romalo, H. U. Schweikeert. Androstenedione metabolism in cultured human osteoblast-like cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992, 75(1), 101-105.
11. Eyre, L.J., R. Bland, I. J. Bujalska, M. C. Sheppard, P. M. Stewart, M. Hewison. Characterization of aromatase and 17 beta-hydroxy steroid dehydrogenase expression in rat osteoblastic cell. *J Bone Miner Res*, 1998, 13(6), 996-1004.
12. Nawata, H., S. Tanaka, S. Tanaka, R. Takayanagi, Y. Sakai, T. Yanase, S. Ikuyama, M. Haji. Aromatase in bone cell: association with osteoporosis in postmenopausal women. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1995, 53, 165-174.
13. Watanabe, T., S. Inoue, S. Ogawa, Y. Ishi, H. Hiroi, K. Ikeda, A. Orimo, M. Muramatsu. Agonistic effect of tamoxifen is dependent on cell type, ERE-promotor context, and estrogen receptor subtype: functional difference between estrogen receptors alpha and beta. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 236(1), 140-145.
14. Katchen, B., S. Buxbaum. Disposition of a new nonsteroid antiandrogen alpha-trifluoro-2-methyl-4'-nitro-m-propionotoluidide (Flutamide), in men following a single oral 200 mg dose. *J Clin Endocrinol Metab*, 1975, 41(2), 373-379.
15. Browne, L. J., C. Gude, H. Rodriguez, R. E. Steele, A. Bhatnager. Fadrozole hydrochloride: a potent, selective, nonsteroidal inhibitor of aromatase for the treatment of estrogen-dependent disease. *J Med Chem*, 1991, 34(2), 725-736.
16. Hofbauer, L. C., R. M. Ten, S. Khosla. The antiandrogen hydroxyflutamide and androgens inhibit interleukin-6 production by an androgen responsive human osteoblastic cell line. *J Bone Mineral Res*, 1999, 14(8), 1330-1337.
17. Vanderschueren, D., E. van Herck, R. de Coster, R. Bouillon. Aromatization of androgens is important for skeletal maintenance of aged male rats. *Calcif Tissue Int*, 1996, 59(3), 179-183.
18. Morishima, A., M. M. Grumbach, E. R. Simpson, C. Fisher, K. Qin. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995, 80(12), 3689-3698.
19. Bilezikian, J. P., A. Morishima, J. Bell, M. M. Grumbach. Increased bone mass as a result of estrogen therapy in a man with aromatase deficiency. *N Engl J Med*, 1998, 339(9), 599-603.

### ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Ichiro Iwamoto  
Department of Obstetrics and Gynecology  
Faculty of Medicine  
Kagoshima University  
8-35-1 Sakuragaoka  
Kagoshima 890-8520, Japan  
E-mail: ichiro@m.kufm.kagoshima-u.ac.jp

## **Влияе ли се развитието на микроалбуминурия при млади хора със захарен диабет тип 1 от размерите при раждане**

**В. Йотова, В. Маджова\*, В. Цанева**

Медицински университет - Варна

Катедра по педиатрия и медицинска генетика

\*Катедра по обща медицина

---

## **Does Size at Birth Influence the Development of Microalbuminuria in Young Patients with Type 1 Diabetes Mellitus**

**V. Iotova, V. Madjova\*, V. Tzaneva**

Medical University - Varna

Department of Paediatrics and Medical Genetics

\*Department of General Medicine

### **Резюме**

Добрият метаболитен контрол е задължителен за превенцията на диабетната нефропатия (ДН). Въпреки това се наблюдават случаи с добър контрол, при които ДН се развива сравнително рано. От друга страна, нарушеното вътреутробно развитие напоследък се разглежда като рисков фактор за редица заболявания на зрялата възраст, проявяващи се все по-рано. Цел на настоящата работа е да съпостави размерите при раждане на юноши със захарен диабет (ЗД) тип 1 със и без положителна микроалбуминурия (+MAU) в опит да се оцени ролята им в развитието на начална ДН. Проучени са 25 девойки и

### **Abstract**

The good metabolic control is mandatory for the diabetic nephropathy (DN) prevention. Nevertheless, there are well controlled cases, in whom DN develops relatively early. On the other hand, the impaired intrauterine development has been recently suggested as a risk factor for a number of adult diseases manifesting yet earlier. The aim of the present work is to compare the size at birth of adolescents with type 1 diabetes mellitus (DM), positive for microalbuminuria (+MAU) and negative for MAU (-MAU) in an attempt to evaluate their role in the development of initial DN. 25 females and 22 males with type 1 DM and +MAU, mean

22 юноши със ЗД тип 1 и +MAU на средна възраст  $20,9 \pm 2,6$  години, средна давност на диабета  $13,6 \pm 2,9$  години и средна давност при развитието на MAU  $8,35 \pm 3,3$  години. Резултатите са съпоставени с група от 24 девойки и 19 юноши без MAU на средна възраст  $19,4 \pm 3,4$  години, средна давност на диабета  $12,9 \pm 3,8$  години. Сравнявани са теглото и ръстът при раждане и на 1 година. Младешите с +MAU са родени с по-ниско тегло -  $3348 \pm 470$  g срещу  $3792 \pm 430$  g ( $p < 0,02$ ), както и девойките -  $3335 \pm 558$  g срещу  $3870 \pm 332$  g ( $p < 0,01$ ). Ръстът при раждане на момчетата е по-малък -  $51,2 \pm 1,8$  cm срещу  $52,4 \pm 1,2$  cm ( $p < 0,05$ ). Момчетата с +MAU са наддали сигнификантно повече за първата година от живота си -  $8805 \pm 875$  срещу  $7140 \pm 786$  g ( $p = 0,01$ ), както и момчетата -  $8666 \pm 1125$  срещу  $7348 \pm 1050$  g ( $p < 0,01$ ). Като цяло 66,7% от родените с тегло  $\leq -2$  SD са развили MAU срещу 22,2% от родените с тегло  $> +2$  SD. Представените резултати насочват към възможността нарушеното пренатално развитие на бъбреците да представлява преципитиращ фактор за ранното развитие на начална нефропатия при млади диабетици.

**КЛЮЧОВИ ДУМИ:** захарен диабет тип 1, начална диабетна нефропатия, размери при раждане.

В последното десетилетие микроалбуминурията (MAU) при млади хора със захарен диабет (ЗД) тип 1 се приема като ранен маркер на диабетна нефропатия (ДН). Наличието ѝ е достатъчно основание за диагностициране на начална ДН и съответни мерки за лечение (1). Доказано е, че добрият диабетен контрол е задължителен за превенцията на това тежко микроваскуларно усложнение (2). Наблюдават се обаче случаи с добър контрол, при които ДН се развива сравнително рано. От друга страна, нарушеното вътреутробно развитие на вътрешните органи напоследък се разглежда като основен рисков фактор за редица заболявания на зрялата възраст, проявяващи се все по-рано (3).

age  $20,9 \pm 2,6$  years, mean diabetes duration  $13,6 \pm 2,9$  years and diabetes duration prior to MAU -  $8,35 \pm 3,3$  years were studied. The results are compared to a group of 24 females and 19 males without MAU, aged  $19,4 \pm 3,4$  years, with diabetes duration  $12,9 \pm 3,8$  years. The +MAU males were born lighter than the controls -  $3348 \pm 470$  g vs.  $3792 \pm 430$  g ( $p < 0,02$ ), as were +MAU females -  $3335 \pm 558$  g vs.  $3870 \pm 332$  g ( $p < 0,01$ ). The boys were also shorter at birth -  $51,2 \pm 1,8$  cm vs.  $52,4 \pm 1,2$  cm ( $p < 0,05$ ). The +MAU girls gained more weight till the end of their first year -  $8805 \pm 875$  vs.  $7140 \pm 786$  g ( $p = 0,01$ ), as did +MAU boys -  $8666 \pm 1125$  vs.  $7348 \pm 1050$  g ( $p < 0,01$ ). As a whole, 66,7% of the born lighter than  $-2$  SD developed MAU against 22,2% of the born heavier than  $+2$  SD. The results suggest the possible role of the impaired intrauterine development of the kidneys as a precipitating factor for the early start of nephropathy in young people with diabetes.

**KEY WORDS:** type 1 diabetes mellitus, initial diabetic nephropathy, size at birth.

**Цел** на настоящата работа е да съпостави размерите при раждане (тегло и ръст) при млади пациенти със захарен диабет тип 1 на сходна възраст и давност със и без положителна микроалбуминурия (+MAU) в опит да се оцени ролята им в развитието на начална ДН.

## ПАЦИЕНТИ И МЕТОДИ

Проучването е проведено през 2001 г. в катедрите по педиатрия и обща медицина на Медицинския университет във Варна. Обхванати са само пациенти, диагностицирани и контролирани от началото на заболяването от авторите. Всички пациенти са със ЗД тип 1 без други зна-

**Таблица 1.** Разпределение на изследваните пациенти със и без MAV според пола, възрастта, давността на диабета и някои други признаци.

**Table 1.** Distribution of the studied patients with and without MAU according to gender, age, diabetes duration and some other signs.

Показатели Parameters	+ MAV		- MAV	
	момчета/boys n = 22	момичета/girls n = 25	момчета/boys n = 19	момичета/girls n = 24
Средна възраст (г.) (mean ± SD) Mean age (y.)	21,0 ± 2,7	20,9 ± 2,0	19,8 ± 2,8	19,1 ± 3,1
Средна давност (г.) (mean ± SD) Mean duration (y.)	14,0 ± 2,7	13,4 ± 3,1	13,4 ± 3,0	12,5 ± 4,1
Средна давност на ЗД до MAV (г.) (mean ± SD) Mean duration of DM to MAU (y.)	10,5 ± 3,9	7,4 ± 3,3	-	-
САН/SAP (mm Hg)	124,7 ± 5,6	127,9 ± 4,4	121,3 ± 6,0	118,4 ± 5,0
ДАН/DAP (mm Hg)	77,8 ± 3,1	78,4 ± 3,0	75,4 ± 4,0	72,3 ± 3,5
Фамилна обремененост с АХ (%) Family history of AH	39%	46%	26%	23%
Други микроваскуларни усложнения (%) Other microvascular complications	37,5%	31,3%	10,5%	12,5%
HbA <sub>1c</sub> (%)	8,7 ± 2,1	9,1 ± 3,1	7,8 ± 2,0	8,0 ± 1,1

чим заболявания. MAV е изследвана по полуколичествен метод чрез Micral test, положителен при стойности над 20 mg/l. Наличие на диабетна MAV е приемано след поне 2 положителни проби от сутрешна урина в рамките на 6 месеца и след изключване на други възможни причини (бъбречни заболявания, фамилна протеинурия, ортостатична протеинурия и пр.).

Датата на диагноза на диабета е извлечена от детския диабетен регистър, откъдето е изчислена давността на диабета и продължителността му преди настъпване на протеинурията. Контролът на диабета е преценяван чрез HbA<sub>1c</sub> (%) от същия период от време. Данните за теглото и ръста при раждане и на едногодишна възраст са взети от личните амбулаторни карти на пациентите.

Проучени са общо 90 младежи със захарен диабет тип 1 (средна възраст 20,1 ± 2,8 години, средна давност на диабета 13,3 ± 3,4 години). Разпределението на случаите по пол и според наличието на MAV е представено на таблица 1. Всички пациенти са завършили растежа си (4), като девойките са достигнали менархе поне 2 години преди изследването. Ръстът на родителите е проверен чрез анкета, а 28,9% от родителите са измерени лично. Таргетният ръст е изчислен спрямо

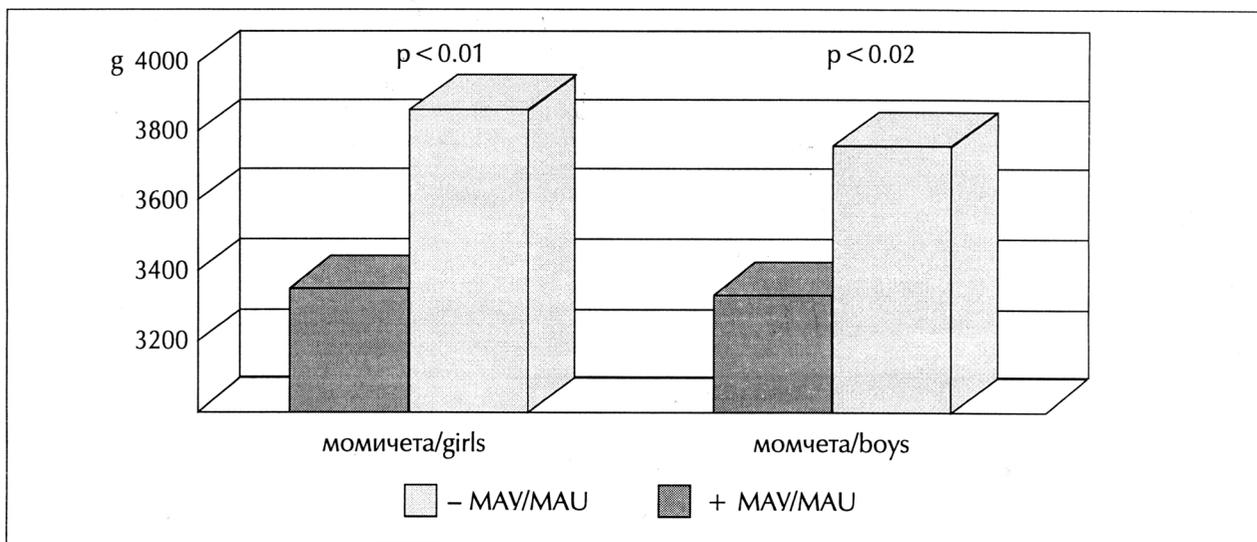
родителския (5), като при сравненията е отчитан 50-ият перцентил на получената стойност.

Чрез проведената анкета и проверка на личната здравна документация на пациентите е уточнено наличието на други микроваскуларни усложнения. Регистрирани са стойностите на систолното артериалното налягане (САН) и диастолното артериално налягане (ДАН) по време на последната проба за MAV, както и фамилната обремененост за артериална хипертония (таблица 1).

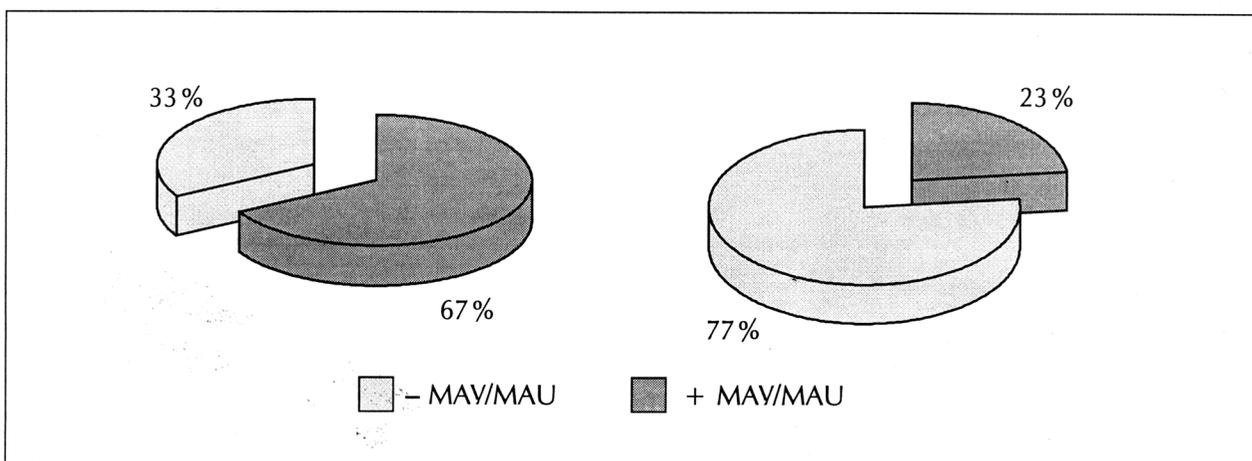
Данните от МАК за продължителността на естественото хранене при всички участници са проверени чрез анкетиране на майките им.

## РЕЗУЛТАТИ

Както младежите с положителна MAV (3348 ± 470 g срещу 3792 ± 430 g, p < 0,02), така и девойките (3335 ± 558 g срещу 3870 ± 332 g, p < 0,01) са родени със сигнификантно по-ниско тегло в сравнение с връстниците си с отрицателна MAV (фиг. 1). Ръстът при раждане на момчетата е също сигнификантно по-малък - 51,2 ± 1,8 cm срещу 52,4 ± 1,2 cm (p < 0,05), докато при момчетата разликата не достига сигнификантност (50,9 ± 1,1 cm срещу 51,6 ± 1,3 cm, p > 0,05).



**Фиг. 1.** Тегло при раждане на млади пациенти със ЗД тип 1 според наличие/отсъствие на МАУ.  
**Fig. 1.** Weight at birth in young patients with type1 diabetes mellitus according to the presence/absence of MAU.



**Фиг. 2.** Развитие на МАУ при млади пациенти със захарен диабет тип 1 според теглото при раждане.  
**Fig. 2.** MAU development in young patients with type 1 diabetes mellitus according to the weight at birth.

В групата като цяло 66,7% от родените с тегло  $\le -2 SD$  са развили МАУ срещу 22,2% от родените с тегло  $> +2 SD$  (фиг. 2).

Разглеждайки прираста на тегло през първата година от живота, е видно, че момичетата с +MAU са наддали с над 1,5 kg -  $8805 \pm 875$  срещу  $7140 \pm 786$  g ( $p = 0,01$ ). Същото явление е налице и при момчетата -  $8666 \pm 1125$  срещу  $7348 \pm 1050$  g ( $p < 0,01$ ). По отношение на ръста разликите, макар и отново в полза на пациентите с +MAU, са по-слабо изразени и не достигат сигнификантност.

Разликата в крайния ръст между пациентите с +MAU и -MAU е несигнификантна при двата пола ( $p > 0,06$ ). Въпреки това тенденцията към по-бурен растеж при развили МАУ млади пациенти със ЗД тип 1 се потвърждава от съпоставката на таргетния ръст с достигнатия при всички пациенти краен ръст. При проучените с -MAU - както при момичетата, така и при момчетата, крайният ръст несигнификантно надвишава таргетния (с около 0,5 cm). Крайният ръст на момчетата с +MAU обаче, независимо от по-лошия контрол, е по-нисък от таргетния само с 1,7 cm

(174,1 ± 9,7 срещу 175,8 ± 4,6 cm,  $p > 0,05$ ), докато при момичетата дори го надвишава с почти 1 cm (162,9 ± 7,3 срещу 162,2 ± 4,7 cm,  $p > 0,05$ ).

Пациентите с +MAV в настоящото проучване са хранени естествено сигнификантно по-дълго в сравнение с пациентите с -MAV - момчета 7,4 ± 3,3 срещу 4,8 ± 4,2 месеца ( $p < 0,01$ ), момичета 7,9 ± 2,5 срещу 5,7 ± 4,0 месеца ( $p < 0,01$ ).

## ОБСЪЖДАНЕ

Въпросът за връзката между диабетната нефропатия и теглото при раждане застава на дневен ред след първите публикации, излагащи хипотезата за феталното програмиране на най-честите заболявания в зрялата възраст (хипотезата на Barker). Самата същност на хипотезата предполага вътреутробна органна увреда, а оттам е логично да се предположи, че бъдещи увеличени изисквания към дейността на такива органи ще доведат до по-лесно развитие на патологични процеси (3). Доста след възникването на феталната хипотеза Manalich et al. категорично доказаха, че по-ниското тегло при раждане е свързано с намален брой и функционален капацитет на бъбречните гломерули (6).

Първото проучване върху връзката между ниското тегло при раждане и диабетната нефропатия е извършено от Rossing et al. през 1995 г. (7). Този колектив изследва само възрастни диабетици със захарен диабет тип 1 с явна протеинурия и вече разгърната клинична картина на диабетна нефропатия. Жените с нефропатия са родени със сигнификантно по-ниско тегло, а мъжете - със сигнификантно по-малък ръст. Развилите ДН се откриват сигнификантно по-често сред родените с тегло под 10-ия перцентил.

Настоящата разработка за първи път в достъпната ни литература съпоставя размерите при раждане и развитието на микроалбинурия като изява на начална ДН (1) при млади пациенти със ЗД тип 1. За първи път се отчита възможното влияние на постнаталния растеж върху този процес. Резултатите предполагат пряка връзка между размерите при раждане и ускорения постнатален растеж при двата пола, особено на тегло, с по-честото възникване на MAV. На 20-годишна възраст три пъти повече от родените

малки за гестационната си възраст юноши със захарен диабет тип 1 ( $\leq -2$  SD) са развили вече MAV в сравнение с родените "тежки" ( $> 2$  SD) за гестационната си възраст.

Съществуват достатъчно доказателства за участието на факторите на пренаталната среда и обусловените от нея намалени размери при раждане в развитието на хипертония при възрастни индивиди (8), а участието на хипертонията в трайната увреда на бъбреците е отдавна известен факт. Нещо повече, съвсем наскоро Guntzsch et al. откриха пряка връзка между фамилната обремененост с хипертония, ежедневните покачвания на артериалното налягане в периода преди развитието на диабетната нефропатия и ранното ѝ развитие (9). В този аспект изследваната от нас група пациенти не прави изключение от общоизвестните факти за по-висок дял на фамилно обременените с артериална хипертония (АХ) и по-високо артериално налягане. Възможно е АХ да е фактор, едновременно водещ до по-ниско тегло при раждане и по-ранно развитие на ДН (10). Известен факт е и по-голямото струпване на микроваскуларни диабетни усложнения при едни и същи пациенти (34% срещу 12% в настоящата изследвана група), за което се обвиняват някои генетични фактори (11), но също би могло да бъде обусловено от фактори на вътреутробната среда.

Дизайнът на настоящото проучване не позволява да се прецени точната роля на диабетния контрол в развитието на последвалите усложнения. Гликираният хемоглобин, твърде сходен в периода на диагностициране на MAV при изследваните, би могъл да бъде много по-висок при + MAV пациентите в предходни етапи от протичането на диабета. Това обаче не променя факта, че те са родени по-дребни - напротив, придава му още по-голяма тежест.

Растежът в кърмаческа възраст напоследък е широко изследван процес като пряко продължение от вътреутробния растеж, силно повлиян от факторите на постнаталната околна среда. В наши предишни разработки показахме евентуалната му роля в отключването на ЗД тип 1 (12). С настоящото проучване показваме по-ускорен растеж през първата година от живота при развилите MAV. Сигнификантно по-голямата продължителност на естественото хранене при

---

тях не противоречи на този факт - напротив; известна е неговата роля в осигуряване именно на добър кърмачески растеж. Какъв е точният механизъм на връзката, е все още неизвестно. В светлината на теорията на Barker тази връзка може да се търси във фактори, определящи едновременно намалени пренатални размери, бързо постнатално наваксване (catch-up) и развитие на по-ранна органна увреда. Такъв фактор е променената активност на ензима 11 $\beta$ -хидроксистероид-дехидрогеназа (13). Ролята му вътреутробно е да намалява вредното влияние на майчините стероиди върху плода. Съвсем наскоро бяха публикувани интересни данни относно асоциацията на някои генетични варианти на този ензим с развитието на диабетна нефропатия при захарен диабет тип 1 (14).

### ИЗВОДИ

1. Юношите със ЗД тип 1 с ниско тегло при раждане и по-голям прираст през първата година от живота си по-често развиват микроалбуминурия в сравнение със свои връстници с ед-

накъв пол, давност на диабета и сходен диабетен контрол.

2. Родените с най-ниско тегло развиват МАУ 3 пъти по-често в сравнение с родените най-тежки.

3. Представените резултати, въпреки относително малкия брой изследвани, насочват към възможността нарушеното пренатално развитие на бъбреците да представлява преципитиращ фактор в развитието на начална нефропатия при млади диабетици.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проследяването на настоящите пациенти в еволюция ще покаже дали размерите при раждане имат действително отношение към почестото развитие на МАУ, или се касае за по-ранно засягане в случаите с по-малки тегло и/или ръст при раждане. За потвърждаване/отхвърляне на тази асоциация са необходими мащабни проучвания, обхващащи цели популации от пациенти със захарен диабет тип 1, при които са документирани параметрите на ранния растеж.

## КНИГОПИС/REFERENCES

1. Adler, S. G., S. W. Kang, S. Feld et al. Glomerular mRNAs in human type 1 diabetes: biochemical evidence for microalbuminuria as a manifestation of diabetic nephropathy. *Kidney Int*, 2001, 60, 2330-2336.
2. Harvey, J. N., K. Rizvi, L. Craney et al. Population-based survey and analysis of trends in the prevalence of diabetic nephropathy in Type 1 diabetes. *Diabet Med*, 2001, 18, 998-1002.
3. Barker, D. J. P. Mothers, babies, and disease in later life. BMJ Publishing Group, London, 1994.
4. Albertsson-Wikland, K., J. Karlberg. Postnatal growth of children born small for gestational age. *Acta Paediatr*, 1997, Suppl 423, 193-195.
5. Йотова, В., К. Петрова. Методи за оценка на линейния растеж. Употреба и значение на растежните стандарти в практиката. *Хигиена и здравеопазване*, 2001, 44 (1), 48-53.
6. Manalich, R., L. Reeves, M. Herrera et al. Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: a histomorphometric study. *Kidney Int*, 2000, 58, 770-773.
7. Rossing, P., L. Tarnow, F. S. Nielsen et al. Low birth weight. A risk factor for development of diabetic nephropathy? *Diabetes*, 1995, 44 (12), 1405-1407.
8. Vehaskari, V. M., D. H. Aviles, J. Manning. Prenatal programming of adult hypertension in the rat. *Kidney Int*, 2001, 59, 238-245.
9. Guntche, Z., F. D. Saravi, E. A. Reynals et al. Parental hypertension and 24 h-blood pressure in children prior to diabetic nephropathy. *Pediatr Nephrol*, 2002, 17, 157-164.
10. Йотова, В. Ефект от ниските тегло и ръст при раждане върху постнаталния растеж и някои маркери на повишен кардиоваскуларен и метаболитен риск у юноши. Кандидатска дисертация. София, 2002, 107-108.
11. Parving, H. H., L. Tarnow, P. Rossing. Genetics of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 1996, 7 (12), 2509-2517.
12. Йотова, В., В. Цанева, К. Петрова. Роля на естественото хранене и растежа през първата година от живота в етиологията на захарния диабет в детската възраст. *Педиатрия*, 1997, 4, 30-33.
13. Edwards, C. R. W., R. Benediktsson, R. S. Lindsay, J. R. Seckl. Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension. *Lancet*, 1993, 341, 355-357.
14. Lavery, G. G., C. L. McTernan, S. C. Barn et al. Association studies between HSD11B2 gene (encoding human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2), type 1 diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Eur J Endocrinol*, 2002, 146, 553-558.

### АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Д-р Виолета Йотова  
Катедра по педиатрия  
и медицинска генетика  
Медицински университет  
ул. "Марин Дринов" 55, Варна 9002  
E-mail: iotovi@ms.ieee.bg

### ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Violeta Iotova, MD  
Department of Pediatrics  
and Medical Genetics  
Medical University  
55, Marin Drinov Str.  
9002 Varna, Bulgaria  
E-mail: iotovi@ms.ieee.bg

## Оценка на тиреоидната, панкреатичната $\beta$ -клетъчна и надбъбречната функции и на органоспецифичния аутоимунитет при деца и юноши с алопеция ареата

А. Куртев, D. Fisher\*, J. Nelson\*, Е. Илиев\*\*

Клиника по детска ендокринология, Катедра по педиатрия, Университетска педиатрична болница - София

\*Nichols Institute, Quest Diagnostics - CA, USA

\*\*Катедра по дерматология и венерология, Медицински университет - София

## Estimation of Thyroid, Pancreatic $\beta$ -cells and Adrenal Functions and Organ-Specific Autoimmunity in Children and Adolescents with Alopecia Areata

A. Kurtev, D. Fisher\*, J. Nelson\*, E. Iliev\*\*

Clinic of Pediatric Endocrinology, Chair of Pediatrics, University Pediatric Hospital - Sofia

\*Nichols Institute, Quest Diagnostics - CA, USA

\*\*Chair of Dermatology and Venerology, Medical University - Sofia

### РЕЗЮМЕ

Алопеция ареата (alopecia areata - AA) се среща често заедно с някои аутоимунни заболявания. Цел на проучването е да се оцени функцията и наличието на аутоимунно заболяване при щитовидната жлеза, панкреатичните  $\beta$ -клетки и надбъбречната кора. Бяха проучени 46 деца и юноши с AA (23 момичета и 23 момчета), възраст от 2,2 до 17,5 години. Изследвания: щито-

### ABSTRACT

Alopecia areata (AA) in children and adolescents is often associated with some autoimmune diseases. The aim of the study is to estimate the function and the presence of some autoimmune disease of the thyroid gland, pancreas and suprarenal glands in children and adolescents with AA. 46 children with AA (23 girls and 23 boys), age 2,2-17,5 years were studied: thyroid: size and function

видна жлеза: размер и функция -  $T_3$ ,  $T_4$ , TSH, TRH тест, антитела (ТА) - TAT, MAT, TBII, TSI, TGSI, ултразвуково изследване; панкреатични  $\beta$ -клетки: функция - ОГТТ, кръвна захар, ИРИ и антитела - срещу GAD 65, ICA 512, IAA; надбъбречни жлези: функция, кортизолов ритъм и ACTH тест и антиадренални антитела. Резултати: гуша - при 29 деца (63%), повишени стойности на TSH - базални при 6 деца (13,3%) и стимулирани (TRH тест) при 2 деца; повишени антитела: TAT при 17 (39,5%), MAT при 14 (33,3%) деца с АА; ехографски образ, суспектен или типичен за аутоимунен тиреоидит (АТ) при 18 деца (47,4%); АТ при 22 деца (47,8%); повишена стимулирана инсулинова секреция (ОГТТ) при деца с АА и нормални кръвнoзахарни криви; повишени титри на GAD 65 антитела - при 1 дете, и IА - при друго; променена стимулирана 17 ОНР секреция - при 3 деца (ACTH тест).

Установените промени във функцията и антиялообразуването най-вече в щитовидната и в по-малка степен в панкреатичните  $\beta$ -клетки и надбъбречната кора при децата с АА налагат изследването на тези жлези (преди всичко щитовидната) при диагностициране на алопеция и редовното им проследяване.

**КЛЮЧОВИ ДУМИ:** алопеция, тиреоидея, панкреатични  $\beta$ -клетки, надбъбречни жлези, функция, аутоимунитет.

Алопеция ареата (alopecia areata - АА), едно от честите кожни заболявания - до 1% от общата популация (1), засяга най-вече детско-юношеската възраст (11). Преобладаващото становище е, че АА е аутоимунно заболяване поради честото му съчетаване с други аутоимунни заболявания - аутоимунен тиреоидит (АТ), захарен диабет (ЗД), цьолиаксия, витилиго (В) (1, 7, 8, 10, 12), и повлияването му от лечение с имunosупресори.

**Целта** на настоящото проучване е да се оцени функционалното състояние и наличието на аутоимунно заболяване на най-често засяганите от аутоимунния полиендокринен синдром (АПС) ендокринни жлези - щитовидна жлеза, панкреатични  $\beta$ -клетки и надбъбрек.

-  $T_3$ ,  $T_4$ , TSH, TRH test (FIA, DELFIA), antibodies (ATA) - TAT, MAT, TBII, TSI, TGSI, ultrasound examination;  $\beta$ -cells: function (OGTT - blood sugar, IRI), antibodies against GAD 65, ICA 512, IA; adrenal glands: function, cortisol rhythm and ACTH test and antiadrenal antibodies. Results: goitre - in 29 children (63%), increased TSH - basal levels in 6 (13,3%) and hypothyroid type stimulated secretion (TRH test) in 2 children; increased TA - TAT in 17 (39,5%) and MAT in 14 children with AA (33,3%); ultrasound examination - picture suspicious or typical for AT in 18 (47,4%); AT in 22 (47,8%); increased stimulated insulin secretion in children with AA and normal blood sugar curves; increased titers of GAD 65 abs - in 1 child and IA - in another; changed stimulated 17 OHP secretion (ACTH test) - in 3 children.

The changes in the function and autoimmunity mainly in the thyroid gland and to a smaller extent in the pancreatic  $\beta$ -cells and adrenal glands in children and adolescents with AA makes it necessary to examine the function and antibody formation against these endocrine glands (first of all thyroid) at diagnosis and their regular follow up.

**KEY WORDS:** alopecia, thyroid, pancreatic  $\beta$ -cells, adrenal glands, function, autoimmunity.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Проучването включва 46 деца - 23 момчета и 23 момичета, на средна възраст  $9,9 \pm 3,4$  години (2,2-17,5 години) и продължителност на заболяването от 0 до 13,8 години.

Бяха изследвани:

**Щитовидна жлеза:** размери (по СЗО), консистенция; функция -  $T_3$ ,  $T_4$ , TSH (FIA, DELFIA) - 45 деца, и стимулирана TSH секреция (TRH тест - определяне нивото на TSH изходно, на 20-ата и 60-ата минута след i. v. приложение на protilerin 5-7 mg/kg телесно тегло, не повече от 200 mg) - 12 деца; антитиреоидни антитела - антитиреоглобулинови (TAT) и антимикрозомални (MAT), микрохемоагутинационен метод - съответно

при 43 и 42 деца; TBII (thyrotropin-binding inhibitory immunoglobulins) - 21 деца, TSI (thyroid stimulating immunoglobulins) - при 18 деца, и TGSI (thyroid growth stimulating immunoglobulins) - при 15 деца (всички изследвани с RIA, Nichols Institute, Quest Diagnostics, CA); ултразвуково изследване (с 5 и 7,5 MHz трансдюсери) - при 38 деца.

**Панкреатични  $\beta$ -клетки:** функция - ОГТТ (1,75 g глюкоза/kg идеално телесно тегло, не повече от 75 g; кръвна захар в mmol/l и ИРИ в  $\mu$ E/ml-RIA, изходно, на 30-ата, 60-ата, 120-ата и 180-ата минута); антиостровни антитела срещу: GAD 65 (glutamat acid decarboxylase) - при 20 деца, ICA 512 (islet cell antibodies) - при 17 деца, и IA (insulin antibodies) - при 15 деца (RIA, Nichols Institute).

**Кора на надбъбречните жлези:** функция - кортизолов ритъм в 8 и 20 часа, nmol/l (FIA, DELFIA) - 17 деца, и АСТН (synacten-depot 0,5-1 mg i. m.) с определяне на изходните стойности и стимулираната секреция (на 4-ия час) на кортизол и 17 ОНР (17 хидроксипрогестерон) (FIA, DELFIA) - при 8 деца; антиадренални анти-

тела срещу 17 ОН и 2 ОН фракциите - при 21 деца (RIA, Nichols Institute).

## РЕЗУЛТАТИ

Установихме уголемена щитовидна жлеза при 29 деца с АА (63,0%), главно IA степен (22 деца - 47,8%), а при останалите 7 (15,2%) - IB ( $p < 0,001$ ). Преобладаваше меко-еластичната консистенция - при 19 деца (65,5%), при 10 деца (34,5%) - плътно-еластична, и гладката повърхност - при 22 деца (75,9%), при 4 деца (13,8%) - налобена, а при 3 деца (10,3%) - зърниста.

Констатирахме повишен TSH (4-6,8  $\mu$ IU/ml), нормални нива на  $T_4$  и леко повишени стойности на  $T_3$  при 6 деца с АА (13,3%) - субклиничен хипотиреозидизъм (СХ) (таблица 1). Проследяването на стимулираната TSH секреция (TRH тест) показва повишени стойности на 20-ата и 60-ата минута, хипотиреозиден отговор, при 2 деца (от 12 - 8,3%) (таблица 2).

При определяне на антииреоидните антитела се намериха: ТАТ -позитивни титри при

**Таблица 1.** Средни стойности на  $T_3$ ,  $T_4$  и TSH при деца с алопеция ареата.

**Table 1.** Mean values of  $T_3$ ,  $T_4$  and TSH in children with alopecia areata.

	<b><math>T_3</math> nmol/l x <math>\pm</math> SD</b>	<b><math>T_4</math> nmol/l x <math>\pm</math> SD</b>	<b>TSH <math>\mu</math>IU/ml x <math>\pm</math> SD</b>
Здрави деца/ Healthy children	2,02 $\pm$ 0,58 n=118	118,2 $\pm$ 21,12 n=138	1,88 $\pm$ 0,87 n=162
Деца с АА и нормална тиреоидна функция/ Children with AA and normal thyroid function	2,52 $\pm$ 0,54 n=9	133,4 $\pm$ 23,9 n=33	1,98 $\pm$ 0,86 n=39
Деца с АА и субклиничен хипотиреозидизъм/ Children with AA and subclinical hypothyroidism	2,98 $\pm$ 0,32 n=4	111,8 $\pm$ 30,83 n=5	5,12 $\pm$ 1,1 n=6
p	<0,001	>	<0,001

**Таблица 2.** TRH тест при деца с алопеция ареата.

**Table 2.** TRH test in children with alopecia areata.

<b>TSH (<math>\mu</math>IU/ml)</b>	<b>0 мин/min x <math>\pm</math> SD</b>	<b>20 мин/min x <math>\pm</math> SD</b>	<b>60 мин/min x <math>\pm</math> SD</b>
Деца с АА и нормална тиреоидна функция/ Children with AA and normal thyroid function (n = 10)	2,05 $\pm$ 1,16	11,98 $\pm$ 3,11	6,68 $\pm$ 1,70
Деца с АА и СХ/ Children with AA and SH (n = 2)	1,87 3,81	21,87 37,1	14,79 20,2
Контролна група/ Control group (R.Illig et al., 1975) (n = 97)	1,50 $\pm$ 1,17	13,22 $\pm$ 4,60	9,14 $\pm$ 3,47

**Таблица 3.** Деца с АА и нормални кръвнозахарни криви - ОГТТ (n = 15).

**Table 3.** Children with AA and normal blood sugar curves - OGTT (n = 15).

	Кръвна захар/Blood sugar					ИРИ/IRI				
	0'	30'	60'	120'	180'	0'	30'/% увел. спрямо 0'/ % increase toward 0'	60'/% увел. спрямо 0'/ % increase toward 0'	120'/% увел. спрямо 0'/ % increase toward 0'	180'/% увел. спрямо 0'/ % increase toward 0'
x	4,724	7,56	6,112	5,447	5,1725	13,5	100,61/+ 650	78,18/+ 479	41,9/+ 211	36,66/+ 174
SD	0,641	1,053	1,5	1,122	1,5515	18,32	66,86	76,32672	29,87	31,421
n	15	9	9	15	8	15	9	8	13	7
p	>	>	>	>	>	>	< 0,05	>	>	>
Контролна група/Control group										
	ОГТТ/OGTT					ИРИ/IRI				
	0'	30'	60'	120'	180'	0'	30'/% увел. спрямо 0'/ % increase toward 0'	60'/% увел. спрямо 0'/ % increase toward 0'	120'/% увел. спрямо 0'/ % increase toward 0'	180'/% увел. спрямо 0'/ % increase toward 0'
x	4,71	7,92	6,6	5,54	5,02	12,2	50,94 / + 317	39,74/+ 225	27,2/+ 122	20,27/+ 66
SD	0,53	1,46	1,52	0,85	0,8	6,06	33,77	26,39	18,78	14,53
n	44	44	43	44	43	31	31	31	31	30

17 деца (от 43 - 39,5%), гранични - при 18 деца (41,9%) и отрицателни - при 8 деца (18,6%) ( $p < 0,05$ ); МАТ - повишени титри при 14 деца (33,3%), гранични - при 22 деца (52,4%), и отрицателни - при 6 деца (14,3%) ( $p < 0,05$ ). Останалите АТА (срещу ТВII, TSI и TGSi) бяха с титри в референтни граници.

Ехографското изследване показва картина, суспектна или типична за АТ (петниста хипо- до анехогенна структура с груб релеф) съответно при 13 (от 38 - 34,2%) и при 5 деца (13,2%). Автоимунен тиреоидит беше открит при 22 деца (от 46 - 47,8%) въз основа на гуша, СХ, АТА и отклонение в ехографската картина в различни комбинации. АТ беше диагностициран при всички деца след клиничната изява на АА.

При изследване функцията на панкреатичните  $\beta$ -клетки (ОГТТ) установихме: три вида кръвнозахарни криви - плоски при 4 деца (19,1%), високи - при 2 (9,5%), и нормални при 15 деца (71,4%), с почти три пъти по-висока инсулинова секреция от 0-ата до 180-ата минута, но със значима разлика само на 30-ата минута (таблица 3). Повишен ИРИ намерихме при децата с АА и АТ (30-а минута -  $p < 0,05$ ) ( $n = 15$ ), при децата с АА и нормална тиреоидна функция

( $n = 18$ ), а също и при децата с АА и повишен ВМІ (но само при 3 деца). Констатирахме повишени титри на следните антиостровни антитела: срещу GAD 65 - при 1 (от 20 деца - 5%), и ІА при 1 дете (от 15 - 6,7%).

При изследването на кортизоловия ритъм се констатира липса на ритъм - плоски и високи криви при 2 деца (от 17 - 11,8%), а проведенният АСТН тест показва липса на нормален 17 ОНР отговор при 3 деца (от 8 - 37,5%), липса на отговор при 1 дете и 8-12-кратно повишение на стимулираната 17 ОНР секреция при 2 деца. При едното от тях кортизолът на 4-ия час е много повишен, а при другото нивото му е под изходното (таблица 4). Антиадреналните антитела бяха с нормални титри при всички изследвани деца.

## ОБСЪЖДАНЕ

Големият брой деца с АА и тиреоидна хиперплазия, както и наличието на субклинично тиреоидно заболяване при нашите пациенти (отклонение в базалната и стимулираната ТSH секреция, TRH тест), отговаря на съобщенията в литературата - съответно 11,3% и 18% (11) и е доказателство за възможното участие на АА като

**Таблица 4.** АСТН тест при деца с алопеция ареата.  
**Table 4.** ACTH test in children with alopecia areata.

№	Пол/Sex	Възраст (г) Age (yrs.)	АТ	Тиреоидни антитела/ Thyroid antibodies		Тиреоидна функция/ Thyroid function	Кортизол/ Cortisol (nmol/l)		17 ОНР (nmol/l)	
				TAT	MAT		0 ч/h	4 ч/h	0 ч/h	4 ч/h
1	м/м	11,08	(-)			H/N	370,0	2000,0	2,14	16,42
2	ж/f	13,0	(+)	1:320		CX/SH	360,9	-	3,53	12,2
3	м/м	9,5	(+)	1:2560		H/N	329,4	1009,0	2,95	11,25
4	ж/f	7,72	(-)		1:160	H/N	475,0	220,0	1,4	16,75
5	м/м	9,4	(-)			H/N	-	-	3,5	5,4
6	ж/f	13,0	(+)	1:5120		H/N	175,8	841,5	1,02	4,1
7	ж/f	11,64	(+)		1:80	CX/SH	285,5	1160,0	3,02	12,11
8	ж/f	6,8	(+)	1:160	:1280	H/N	252,6	929,2	1,96	9,63

м/м = мъже/male, ж/f = жени/female, H/N = нормална/normal,  
 CX/SH = субклиничен хипотиреоидизъм/subclinical hypothyroidism

компонентно заболяване в автоимунния полиендокринен синдром тип III. Значителният дял на повишени титри на анти тиреоидни антитела, главно TAT и MAT, и особено откриването на АТ при 47,8% от пациентите, е още едно потвърждение на известното асоцииране 0-28% и 34,17% (5, 6, 9) на автоимунното тиреоидно заболяване с АА. Не се установи корелация между честота-та на АТ и пола, възрастта и продължителността на АА при изследваните деца. От особен интерес е фактът, че при 27,3% от случаите се касае за атрофичен вариант на АТ (със или без субклиничен хипотиреоидизъм), което поради най-често липсата на клинично изяви промени във функцията на щитовидната жлеза прави АТ недиагностицируем при пациенти с АА.

Констатираните промени при ОГТТ - повишена стимулирана инсулинова секреция при нормални кръвноразарни стойности при децата с АА със и без АТ ( $p < 0,05$  на 120-ата минута при децата с АТ), биха могли да се тълкуват като променена инсулинова чувствителност - инсулинова резистентност. Повишение на ИРИ на 120-ата минута установяваме и при децата с АА и нормална тиреоидна функция, CX, както и при тези с повишен BMI, но броят им е недостатъчен за дефинитивни заключения. Повишените титри на GAD 65 и инсулинови антитела (IA), макар и само при 2 деца, не показваха връзка с пола и нали-

чието на АТ. Те обаче подсказват за евентуална възможност за поява на второ автоимунно заболяване при пациентите с АА.

Установените отклонения в стимулираната секреция на кортизол, и преди всичко повишеният отговор на 17 ОНР на 4-ия час при АСТН тест, могат да се обсъждат като прояви на начален биохимичен (субклиничен) адреналит в унисон с публикациите в литературата (4). Те не показваха никаква зависимост от пола, възрастта, АТА и АТ. Известно е, че 21 хидроксилазата ограничава скоростта на синтеза на кортизола. При пациенти с АТ е установена повишена стимулирана секреция на 17 ОНР при АСТН тест, значително увеличение съотношението 17 ОНР/кортизол, а също по-често срещане на Адисоновата болест. Тези данни говорят за смутено надбъбречно стероидно 21 хидроксилиране при АТ. Обяснение Voehm et al. (2) търсят в хипотезата за връзка между надбъбречния стероиден 21 ОН ген с гените на HLA клас III и I, които участват в патогенезата на автоимунния тиреоидит. Действително една значителна част от нашите деца с АА и отклонения в кортизоловия ритъм са и с АТ, но все пак техният брой, и особено на тези с АСТН тест, не позволява дефинитивни заключения.

Констатираните при проучването ранни субклинични промени в ендокринните жлези

(функция) и повишеното антитялообразуване при децата с АА, най-вече в щитовидната и в известна степен в  $\beta$ -панкреатичните клетки и надбъбречната кора, потвърждават, че АА се среща и като част от аутоимунното полиендокринно заболяване (3).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Необходимо е на всеки 6 месеца да се определят размерите и функцията на щитовид-

ната жлеза при деца с АА, а при променена тиреоидна функция е желателно проследяване на глюкоза и ИРИ (изходно и 2 часа след нахранване), сутрешните нива на АСТН, кортизол и ренин в покой. Уместно е и едновременното определяне на ТАТ, МАТ, TSHRABs, ICA 512, IA, GAD 65 и 21 ОН антитела. Това ще помогне за ранното откриване на заболявания на някои ендокринни жлези при АА в техния субклиничен стадий, възпрепятствайки по-нататъшната им еволюция или довеждайки даже до излекуването им.

## КНИГОПИС/REFERENCES

1. Bertolino, A. P. Alopecia areata. A clinical overview. *Postgrad Med*, 107, 2000, 7, 81-85.
2. Boehm, B. O., E. Schifferdecker, B. Manifras et al. Association of HLA class I and class II and adrenal steroid 21 hydroxylase gene with subacute (de Quervain's) and Hashimoto's Thyroiditis, evidence for altered negative feedback in Hashimoto's thyroiditis. In: *Autoimmune Thyroiditis*, W. A. Scherbaum, V. Bogner et al. (eds.). Springer Verlag, 1991, 21-25.
3. Eisenbarth, G. S., C. F. Verge. Immunoendocrinopathy syndromes. In: *Williams textbook endocrinology*. 9 ed. J. D. Wilson et al. (eds.). WB. Saunders Co, Philadelphia, 1998, 1651-1652.
4. Koshiama, H., M. Ito, N. Yoshinome et al. Two cases of asymptomatic adrenocortical insufficiency with autoimmune thyroid disease. *J Endocrinol*, 41, 1994, 4, 373-378.
5. Kumar, B. et al. Antismooth muscle and antiparietal cell antibodies in Indians with alopecia areata. *Int J Dermatol*, 34, 1995, 542-545.
6. Kurtev, A. et al. Thyroid gland in children with alopecia areata - function and antibodies formation. In: Abstracts of 43 symposium of DGE, Kiel, 10-13.3.1996, *Experiment Clin Endocrinol & Diabet*, 107, 1999, Suppl. 1, 73.
7. McElwee, K. J., D. J. Tobin, J. C. Bystryn et al. Alopecia areata: an autoimmune disease. *Exp Dermatol*, 8, 1999, 5, 371-379.
8. Orecchia, G., P. G. Malagoli. Associazione di

vitiligne, tiroidite di Hashimoto, alopecia areata et lupus eritematoso discoide. *Giorn Ital Dermatol & Venerol*, 129, 1994, 429-431.

9. Puavilai, S. et al. Prevalence of thyroid diseases in patients with alopecia areata. *Int J Dermatol*, 33, 1994, 632-633.

10. Schwartz, R. A., C. K. Janniger. Alopecia areata. *Cutis*, 59, 1997, 5, 238-241.

11. Sharma, V. K. et al. A clinical study of childhood alopecia areata in Chandigarh, India. *Pediatr Dermatol*, 129, 1996, 372-377.

12. Wang, S. J. et al. Increased risk for type 1 (insulin dependent) diabetes in relatives of patients with alopecia areata (AA). *Am J Med Genet*, 51, 1994, 234-239.

### АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Д-р А. В. Куртев, д. м. н.  
Университетска педиатрична болница  
ул. "Иван Гешов" 11, София 1606

### ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

A. V. Kurtev, MD, DM Sc  
University Pediatric Hospital  
11, Ivan Geshov Str., 1606 Sofia, Bulgaria

## Витилиго в детско-юношеската възраст и аутоимунни ендокринни заболявания - случайно съчетание или закономерност?

А. Куртев, D. Fisher\*, J. Nelson\*, А. Дурмишев\*\*

Клиника по детска ендокринология, Катедра по педиатрия,  
Университетска педиатрична болница - София

\*Nichols Institute, Quest Diagnostics - CA, USA

\*\*Катедра по дерматология и венерология, Медицински университет - София

## Vititligo in Childhood and Adolescence and Autoimmune Endocrine Diseases - Accidental Combination or Regularity?

A. Kurtev, D. Fisher\*, J. Nelson\*, A. Dourmishev\*\*

Clinic of Pediatric Endocrinology, Chair of Pediatrics,  
University Pediatric Hospital - Sofia

\*Nichols Institute, Quest Diagnostics - CA, USA

\*\*Chair of Dermatology and Venerology, Medical University - Sofia

### Резюме

Съчетаването на витилиго (V) с някои аутоимунни ендокринни и системни заболявания е добре известно. Целта на настоящото проучване е да се определят функцията и аутоимунитетът на тиреоидната жлеза, панкреатичните  $\beta$ -клетки и надбъбреците при деца и юноши с V. Бяха изследвани 61 деца и юноши с V. Намеихме: гуша при 31 деца (53,45%), нарушена тиреоидна функция ( $T_4$ , TSH) при 8 деца (13,8%) - хипертиреозидизъм при 3 и субклиничен хипотиреоидизъм при 5 деца; хипотиреоиден тип отговор (TRH тест) - при 6 деца (27,3%). Антитиреоид-

### Abstract

The association between vitiligo (V) and some autoimmune endocrine and systemic diseases is well known. The aim of the present study is to determine the function and autoimmunity in thyroid, pancreatic  $\beta$ -cells and adrenal glands in children and adolescents with V. 61 children and adolescents with V (35 girls and 26 boys) were examined. Goiter was found in 31 children (53,45%), thyroid dysfunction ( $T_4$ , TSH) in 8 children (13,8%) - hyperthyroidism in 3 and subclinical hypothyroidism in 5 children; hypothyroid answer (TRH test) - in 6 children (27,3%). Antithyroglobulin (ATA) and

лобулиновите (ТАТ) и антимицрозомалните (МАТ) антитела бяха с повишен титър при 29 деца (50%), ТВІІ - при 5 деца (15,6%). Ултразвуковото изследване показва типична или суспектна картина за автоимунен тиреоидит (АТ) при 15 деца с В (34,1%) и типична за тиреотоксикоза (Т) при 2 деца (4,5%). Беше диагностицирано автоимунно тиреоидно заболяване при 32 деца с В (52,5% - АТ:Т = 29:3).

Намери се повишена инсулинова секреция при ОГТТ при деца с В и нормални кръвно-захарни криви (n = 24) и при В и АТ (n = 15). Не се откри корелация между промените в ІRІ и тиреоидната функция. Установихме повишен титър на GAD 65 антитела при 6 деца (18,8%) и ІСА 512 при 2 деца (7,4%). Всички изследвани деца с изключение на едно бяха с нормална кръвна захар и инсулинова секреция. Намери се повишена 17 ОНР секреция (АСТН тест) при 4 деца (33,3%). Всички изследвани деца бяха с нормални титри на антиадренални антитела.

Нашето проучване показва нарушена тиреоидна функция и автоимунитет, повишена стимулирана инсулинова секреция и островно-клетъчен автоимунитет, както и повишена 17 ОНР секреция (ранен субклиничен адреналит?) при децата с В.

Тиреоидната и β-клетъчната функция и автоимунитет трябва да се изследват в детската възраст при диагностициране на В и най-малко два пъти годишно след това.

---

**КЛЮЧОВИ ДУМИ:** тиреоидея, панкреас, надбъбреци, функция, автоимунитет.

---

Витилиго (В) е често заболяване (0,5-1% от населението на земята), засягащо кожата, но също космите и очите, с полово предилекция - жени:мъже = 2:1-4:1. В е заболяване на младата възраст - 25% от случаите са с начало преди 10-годишна възраст и 50% преди 25 години (1, 13). Особен интерес представлява честото съчетаване на В с някои автоимунни ендокринни и системни заболявания - тиреотоксикоза (Т), автоимунен тиреоидит (АТ), захарен диабет тип 1, Ади-

antimicrobial antibody (АМА) titers were elevated in 29 children (50%), ТВІІ - in 5 children (15,6%). Ultrasound examination showed picture typical or suspicious for АТ in 15 children with В (34,1%) and typical for Grave's disease (GD) in 2 children (4,5%). Autoimmune thyroid disease has been diagnosed in 32 children with В (52,5% - АТ:GD = 29:3).

Elevated insulin secretion during OGTT was found in children with В and normal blood sugar curves (n = 24) and in В and АТ (n = 15). There was no correlation between changes of ІRІ and thyroid function. GAD 65 antibodies were with elevated titer in 6 children (18,8%) and ІСА 512 in 2 children (7,4%). All except one were with normal blood sugar and insulin secretion. Increased stimulated 17 ОНР secretion (АСТН test) was found in 4 children (33,3%). All examined children were with normal titers of antiadrenal antibodies.

Our study showed increased thyroid dysfunction and autoimmunity, increased stimulated insulin secretion and islet cell autoimmunity as well as increased stimulated 17 ОНР secretion (early subclinical adrenalitis?) in children with В. Thyroid and β-cells function and autoimmunity should be checked in children with В at diagnosis and least twice a year thereafter.

---

**KEY WORDS:** thyroid, pancreas, adrenal, function, autoimmunity.

---

сонова болест (при първото описание на заболяването двама от пациентите са били с витилиго), алопеция, системен лупус еритематодес и др. (1, 2, 6, 9, 15, 16).

**Целта** на настоящото проучване е установяване на нарушения във функцията и наличието на изразен автоимунитет при трите ендокринни жлези, основни компоненти на АПС - щитовидна, панкреатични β-клетки и надбъбрек, при деца и юноши с витилиго.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Бяха проучени 61 деца с В - 35 момичета и 26 момчета, на средна възраст  $10,4 \pm 3,7$  години (1,16-16,16 години), средна възраст на заболяването  $8,1 \pm 4,2$  години (0,32-16,16 години) и продължителност от 0,08 до 11 години.

Бяха изследвани:

**Щитовидна жлеза:** размер (по критериите на С30), консистенция и повърхност на щитовидната жлеза; функция - чрез: а) базалните нива на  $T_3$  (норма -  $2,02 \pm 0,58$  nmol/l),  $T_4$  (норма -  $118,2 \pm 21,12$  nmol/l), TSH (норма -  $1,88 \pm 0,87$   $\mu$ IU/ml) (FIA, Delfia) - 58 деца и юноши с В; б) стимулирана TSH секреция, TRH тест (TSH изходно, на 20-ата и 60-ата минута след i. v. protilerin 5-7 mg/kg телесно тегло, не повече от 200 mg) - 22 деца; антиуреодни антитела (ATA): а) антиуреоглобулинови (TAT) и антимикрозомални антитела (MAT) (повишени титри  $\geq 1:80$ ) - 58 деца и юноши с В - микрохемоаглутинационен метод; б) антитела срещу thyroid binding inhibitory immunoglobulins (TBII - норма < 10% инхибиране) - при 32 деца; thyroid stimulating immunoglobulins (TSI - нормални стойности < 130% базална активност) - 26 деца; thyroid growth stimulating immunoglobulins (TGSI - норма < 130% базална активност) - 14 деца (RIA); ултразвуково изследване на щитовидната жлеза с 5 и 7,5 MGH трансдюсер - 44 деца.

**Панкреатични  $\beta$ -клетки:** функция - изследвана чрез орален глюкозотолерантен тест (ОГТТ) - 33 деца, кръвна захар в nmol/l и ИРИ в  $\mu$ E/ml (RIA), изходно, на 30-ата, 60-ата, 120-ата и 180-ата минута; при 17 от децата - на 0-ата и 120-ата минута; определяне на НОМА (homeostasis model assesment, съотношение на изходните стойности на кръвна захар и ИРИ; повишени стойности > 2,55), показател за базален хиперинсулинизъм; антиостровни антитела (RIA): срещу GAD 65 (glutamic acid decarboxylase-65 - норма до 1U/ml) - 32 деца с В, ICA 512 (islet cell antibodies 512 - норма до 0,070 индекс) - 27 деца, IA (insulin antibodies, highly sensitive - норма до 1,1%) - 25 деца.

**Надбъбреци:** функция на кората на надбъбреците: а) кортизолов ритъм (FIA, DELFIA) в 8 часа (норма - 727-244 nmol/ml) и 20 часа (418-110 nmol/ml) - 19 деца с В; б) стимулирана сек-

реция на кортизол и 17 ОНР (17 хидрокси прогестерон, FIA, DELFIA - nmol/l, норми: 1-7 години -  $4,88 \pm 2,75$ , 7-12 години -  $5,41 \pm 2,77$ , 12-16 години -  $3,06 \pm 1,94$ ) - АСТН тест - 12 деца; надбъбречни антитела срещу 17 ОН и 21 ОН фракциите (RIA - норма до 10 титрационни единици) - 32 деца.

**Статистика.** Компютърна статистическа обработка на данните чрез вариационен анализ (t-критерий на Student's Fisher) и непараметричен анализ (критерий  $\chi^2$ ).

## РЕЗУЛТАТИ

**Щитовидна жлеза.** Тиреоидна хиперплазия - 31 деца (от 58 - 53,4%), с преобладаване на лекостепенните гуши (IA степен: 17 деца - 29,3%, IB степен: 11 деца - 18,9%, II степен: 3 деца - 5,2%), мекоеластична консистенция (23 деца - 74,2%, при 8 - 25,8% - плтноеластична) и гладка повърхност (17 - 60,7%, зърниста: при 3 - 10,7%, и налобена: при 8 деца - 28,6%).

При изследване функцията на щитовидната жлеза установихме: 1. Базални стойности на тиреоидните хормони: а) нарушена функция - 8 деца (от 58 - 13,8%): хипертиреозидизъм при 3 деца (5,2%) - повишени  $T_3$ ,  $T_4$ , FT4 и нисък TSH; субклиничен хипотиреоидизъм (CX) - при 5 деца (8,6%), значимо повишени стойности на TSH,  $p < 0,001$ ; б) еутиреоидна функция - останалите 50 деца (86,2%), (таблица 1). 2. TRH тест: а) хипотиреоиден тип отговор - при 6 пациенти (от 22 - 27,30%) - значимо повишени стойности на TSH на 20-ата и 60-ата минута, съответно  $p < 0,001$  и 0,01; б) нормален отговор при 16 (72,7%) (таблица 2).

Изследването на ATA показва: 1. TAT - повишени титри ( $1:80$ ) при 29 (от 58 - 50%) изследвани деца, гранични (< 1:80) - при 24 деца (41,4%), и отрицателни при 5 деца с В (8,6%) ( $p < 0,001$ ); 2. MAT (в същите граници) - повишени титри при 29 деца (50,0%), гранични - при 27 деца (46,6%), и отрицателни - при 2 деца (3,4%) ( $p < 0,001$ ); 3. TBII антитела - повишени титри при 5 деца (от 32 - 15,6%); 4. TSI - 26 деца. 5. TGSI - 14 деца (при последните две групи деца не констатирахме повишени титри).

Ултразвуковото изследване на щитовидната жлеза показва отклонения, типични за авто-

**Табл. 1.** T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> и TSH при деца с витилиго.

**Table. 1.** T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> and TSH in children with Vitiligo.

	T <sub>3</sub> nmol/l x ± SD	T <sub>4</sub> nmol/l x ± SD	TSH μIU/ml x ± SD
Здрави деца/ Healthy children n = 118	2.02 ± 0.58	118.2 ± 21.12 n = 138	1.88 ± 0.87 n = 162
Деца с В и нормална тиреоидна функция/ Children with V and normal thyroid function n = 11	3.24 ± 0.94	117.88 ± 19.4 n = 41	1.65 ± 0.64 n = 50
p	>	>	>
Деца с В и СХ/ Children with V and SH n = 3	3,16 ± 1,22	133,92 ± 12,2 n = 4	5,41 ± 1,67 n = 5
p		<0.001	<0.001

В-витилиго; СХ-субклиничен хипотиреоидизъм  
V-vitiligo; SH-subclinical hypothyroidism

**Таблица 2.** TRH тест при деца с витилиго.

**Table. 2.** TRH test in children with vitiligo.

TRH (μU/ml)	0 мин/min x ± SD	20 мин/min x ± SD	60 мин/min x ± SD
Деца с В и нормална тиреоидна функция/ Children with V and normal thyroid function (n = 16)	1,87 ± 0,72	14,06 ± 3,74	7,36 ± 2,48
p	>	>	<0,05
Деца с В и хипотиреоиден отговор/ Children with V and hypothyroid answer (n = 6)	2,79 ± 1,63	30,83 ± 4,39	16,55 ± 5,95
p	<0,001	<0,001	<0,01
Контроли/Controls (R.Illig et al., 1975) (n = 97)	1,5 ± 1,17	13,22 ± 4,6	9,14 ± 3,47

**Таблица 3.** ОГТТ при деца с витилиго и нормални кръвнозахарни криви.

**Table. 3.** OGTT in children with vitiligo normal blood sugar curves.

	Кръвна захар/Blood sugar					ИРИ/IRI				
	0'	30'	60'	120'	180'	0'	30'/% увел. спрямо 0'/ % increase toward 0'	60'/% увел. спрямо 0'/ % increase toward 0'	120'/% увел. спрямо 0'/ % increase toward 0'	180'/% увел. спрямо 0'/ % increase toward 0'
n	24	6	7	24	6	18	6	7	17	6
X	4,58	6,88	7,49	5,25	4,22	9,75	83,1/ + 946%	133,1/ + 126%	46,97/ + 381%	16,37/ + 68%
Sx	0,11	0,42	0,60	0,17	0,4	1,88	17,7	31,36	9,47	3,1
II/K	>	>	>	>	>	>	>	<0,01	<0,05	>
	Контролна група/Control group									
n	44	44	43	44	43	31	31	31	31	31
x	4,71	7,92	6,6	5,54	5,02	12,21	50,9 (417%)	39,7 (325%)	27,2 (223%)	20,3 (166%)
Sx	0,06	0,22	0,13	0,13	0,12	1,09	6,1	4,74	3,37	2,65

имунен тиреоидит - при 4 деца (от 44 - 9,1%), суспектни за АТ - при 11 деца (25%), характерни за тиреотоксикоза - при 2 деца (4,5%), и нормална структура при 27 деца (61,4%).

Констатирахме автоимунно тиреоидно заболяване (АТЗ) при 32 деца (52,5%), АТ:Т = 29:3, въз основа на: гуша - 18 с АТ и 3-те с Т; при 11 (от 29-те деца с АТ - 37,9%) тя не се констатира - атрофичен вариант; отклонения в консистенция, функция (СХ, хипо- и хипертиреоиден тип на TSH крива); анти тиреоидни антитела, основно ТАТ и МАТ, в повишени титри - при 26 от 32 изследвани деца с АТ и Т (81,3%); ехографски промени, характерни (или суспектни) за АТ - при 8 от 24 деца (33,3%) и при 2-те изследвани деца с Т. Горейброените показатели бяха в различни комбинации. Изследването на панкреатичната  $\beta$ -клетъчна функция, ОГТТ, показва плоски кръвнотехарни криви при 9 деца (от 33 - 27,3%), с пониски стойности на 0-ата минута и съответно помалко покачване на стимулираната инсулинова секреция (спрямо контролната група) на всички минути. Децата с В и нормални кръвнотехарни криви (24 - 72,7%) бяха със статистически значимо повишена инсулинова секреция на 120-ата минута,  $p < 0,05$  (таблица 3), но с нормален НОМА - 1,98 срещу 2,55 в контролната група.

Подобно повишение в стойностите на ИРИ се установи при пациентите с В и АТ на 120-ата минута ( $p < 0,05$ ); НОМА - 2,26 (в норма).

Не установихме отклонения в стойностите на глюкозата и ИРИ в зависимост от тиреоидната функция, включително и при двете деца с тиреотоксикоза. При децата с нормална тиреоидна функция НОМА беше без отклонения от нормата - 2,16. Индивидуалните криви на стимулираната инсулинова секреция при ОГТТ при 5 деца с В и повишен ВМІ показва повишени ИРИ стойности на 120-ата минута само при 1 дете. Констатирахме повишени титри на антитела срещу: GAD 65 - при 6 деца (от 32 - 18,8%), с титри от 1,3-39,8; ICA 512 - при 2 деца (от 27 - 7,4%), от 0,325-0,214. Изследването не показва повишени титри на IA при 25 деца с В.

Изследването на функцията на надбъбречната кора - кортизолов ритъм при 4 деца (от 19 - 21,0%) установи: нисък ритъм - 2 деца (10,5%); висок ритъм - 1 момиче (5,25%); обърнат ритъм - 1 момче (5,25%). Изследването на

стимулираната секреция на кортизол и 17 ОНР при 12 деца с В (АСТН тест) констатира: нормален кортизолов отговор на 4-ия час при 10-те изследвани деца; липса на отговор и плоска крива на 17 ОНР при 2 деца (от 12 - 16,7%); повишена стимулирана секреция на 17 ОНР при 4 деца (33,3%) - от 15,8-17,4. Изследването на надбъбречните антитела (срещу 17 ОН и 21 ОН фракциите) показва нормални титри при всичките 32 деца.

## ОБСЪЖДАНЕ

По-честото засягане на момичетата (момчета:момчета = 1,35:1) в нашето проучване съвпада с общоприетите схващания за полова предилекция при В (13). Наличието на гуша в повече от половината от изследваните деца и нарушената тиреоидна функция при значителен брой от тях потвърждава отдавна известния факт за честото засягане на щитовидната жлеза при В. Ние не установихме изразена зависимост между нарушенията във функцията на щитовидната жлеза, възрастта на болните и продължителността на В. Позитивните титри на ТАТ, МАТ и ТВII и откриването на АТЗ в значителен брой деца с В говори за наличието на тиреоиден автоимунитет. Не се установи корелация между повишените титри на тиреоидни антитела и отклоненията в тиреоидната функция, преценена по базалните стойности на хормоните и TRH тест (за разлика от Betterle) (3). Не намерихме връзка между повишените стойности на ТВII и размерите на щитовидната жлеза. Като възможно обяснение може да се изтъкне фактът, че тиреоидните антитела при АТ при децата не се позитивират толкова често и в такива високи титри, както при възрастни. Особено внимание заслужава атрофичният вариант на АТ, установен в 37,9% от изследваните деца с В. Тъй като при тези деца отклоненията във функцията на щитовидната жлеза са най-често субклинични (СХ), това означава, че АТ при голям брой пациенти с В ще остане практически недиагностициран.

Констатираните при ОГТТ плоски кръвнотехарни криви и липсата на адекватна стимулирана ИРИ секреция при децата с В биха могли да се обяснят със засягане на инкретиновата система, променяща секрецията на стомашните ин-

кретинови пептиди (8). Повишената стимулирана инсулинова секреция при децата с нормални кръвнотехарни криви е може би проява на периферна инсулинова резистентност, за която обаче не установихме връзка с повишения ВМІ - най-вероятно във връзка с малкия брой изследвани деца. Не констатирахме също корелация между глюкозния толеранс, стимулираната инсулинова секреция и промените в тиреоидната функция, но и тук децата са малко на брой - 3 с тиреотоксикоза, а проявите на хипофункция са изцяло за сметка на СХ. Не установихме отклонение във въглехидратния толеранс и стимулираната инсулинова секреция при децата с позитивни GAD 65 антитела и с ICA 512, с изключение на едно дете с повишен ИРИ на 120-ата минута - 89  $\mu\text{E}/\text{мл}$ . От значение е и фактът, че не намерихме позитивни титри и на ІА при тези деца, тъй като едновременно позитивиране на трите антиостровни антитела има значителна прогностична стойност за предстоящо нарушение на въглехидратния толеранс и развитие на ЗД тип 1 до 100% в следващите 5 години (14). Тези деца ще бъдат проследени по отношение на техния въглехидратен метаболизъм.

Отклоненията в кортизоловия ритъм при малък брой деца с В в добро здраве нямаха връзка с възрастта, пола и промените в тиреоидната функция. Те не могат да се разглеждат като сигурен белег на надбъбречно засягане. Изразеното повишение в стимулираната 17 ОНР секреция при АСТН тест, говорещо за смутено надбъбречно 21

хидроксилиране, обаче би могло да се обсъжда като ранна проява на субклиничен адреналит, усътановен при деца с В и АТ (4, 10).

Нормалните титри на надбъбречни антитела при всичките 32 изследвани деца с В биха могли да се обяснят с много по-рядкото и късно засягане на надбъбречната кора при децата с АПС. В литературата има, макар и единични, съобщения за нарушена функция на кората на надбъбреците при пациенти с В (12).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нашето проучване при деца и юноши с витилиго констатира често засягане на функцията и повишен автоимунитет преди всичко на щитовидната жлеза и в по-малка степен на панкреатичните  $\beta$ -клетки и кората на надбъбрека. Съобщенията в литературата, посветени на този проблем, са малко (5, 7, 9, 15, 16), а в детската възраст - единични (11). При децата с В е необходимо изследване и периодично проследяване, поне два пъти годишно, на функцията на щитовидната жлеза и панкреатичните  $\beta$ -клетки и антитялообразуването спрямо антигени на тези жлези. При отклонения от нормата изследването трябва да обхване и надбъбречните жлези.

Ранната диагноза на клиничните, и особено на субклиничните форми на ендокринните заболявания при тези деца ще спомогне за своевременното им лечение, а в някои случаи и за възпиране на по-нататъшната им еволюция.

## КНИГОПИС/REFERENCES

1. Дурмишев, А. Vitiligo. В: Пигментни смущения на кожата. Медицина и физкултура, София, 1986, 59-64.
2. Куртев, А. АТ и други органоспецифични ендокринни, автоимунни, генетични и туморни образувания. В: Съвременни проблеми на педиатрията. Фокус, 1999, 177-179.
3. Betterle, C., G. Callegari, F. Presotto et al. Thyroid autoantibodies: a good marker for the study of symptomless autoimmune thyroiditis. *Acta Endocrinol*, 114, 1987, 3, 321-327.
4. Boehm, B. O., E. Schifferdecker. Association of HLA class I and class II genes and adrenal steroid 21 hydroxylase

gene with subacute (de Quervain's) and Hashimoto's thyroiditis: evidence for altered negative feedback in Hashimoto's thyroiditis. In: *Autoimmune thyroiditis*, eds. W. A. Scherbaum, U. Bogner et al. Springer Verlag, Berlin, 1991, 21-25.

5. Carsuzaaa, F., J. P. De Jaureguiberry, P. Carli et al. Affection cutanees relevant une dysthyroid autoimmune. *Rev Med Int*, 6, 1993, 14, 644.

6. Handa, S., I. Kaur. Vitiligo: clinical findings in 1436 patients. *J Dermatol*, 26, 1999, 10, 653-657.

7. Hegedus, L., M. Heidenheim, M. Gervil et al. High frequency of thyroid dysfunction in patients with Vitiligo. *Acta Derm Venerol*, 74, 1994, 2, 120-123.

8. Heinze, E., J. Schlickerrieder, R. W. Holl et al. Reduced secretion of gastric inhibitory polypeptide in Turner pa-

tients with impaired glucose tolerance. *Eur J Pediatr*, 150, 1991, 339-342.

9. Klisnick, A., J. Schmidt, J. L. Dupond et al. Le vitiligo au cours des syndromes autoimmuns multiples: etude retrospective de 11 observations et revue de la litterature. *Rev Med Intern*, 19, 1998, 5, 348-352.

10. Koshiama, H., M. Ito, N. Yoshiname et al. Two cases of asymptomatic adrenocortical insufficiency with autoimmune thyroid disease. *J Endocrinol*, 41, 1994, 4, 373-378.

11. Kurtev, A., R. Grigorova, A. Durmishev et al. Autoimmune thyroid disease, thyroid function and antibodies in children with Vitiligo. In: Abstracts, Clin. Thyroidology Day, 1998, Athens, 22.

12. Milkov, V. T., A. Dourmishev, G. Pironcheva et al. Plasma levels of ACTH and cortisol in vitiligo patients. *Biomed Letters*, 52, 1995, 127-131.

13. Nordlung, J. J., J. P. Ortonne. Vitiligo and depigmentation. *Curr Probl Dermatol*, 4, 1992, 1, 3-30.

14. Pietropaolo, M., M. Peakman, S. L. Pietropaolo et al. Combined analysis of GAD 65 and ICA 512 (IA2) autoantibodies in organ and non-organ-specific autoimmune diseases confers high specificity for insulin-dependent diabetes mellitus. *J Autoimmun*, 11, 1998, 1, 1-10.

15. Oblinger, E., A. Cibis, R. U. Peter et al. Genito-anale condylomata acuminata, mukokutane candidose, vitiligo, ketatopathie und primarer hypoparathyroidismus bei autoimmunem polyglandularem syndrom typ 1. *Deutsch Med Wochenschr*, 122, 1997, 45, 1382-1386.

16. Ueki, R., R. Imai, K. Takamori et al. Three patients with concurrent alopecia areata, vitiligo and chronic thyroiditis. *Eur J Dermatol*, 3, 1993, 6, 454-456.

#### АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Д-р А. В. Куртев, д. м. н.  
Клиника по детска ендокринология  
Университетска педиатрична болница  
ул. "Иван Гешов" 11, София 1606  
E-mail: alkurtev@yahoo.com

#### ADDRESS FOR CORRESPONDANCE

A. V. Kurtev, MD, DM Sc  
Clinic of Pediatric Endocrinology  
University Pediatric Hospital  
11, Ivan Geshov Str., Sofia 1606, Bulgaria  
E-mail: alkurtev@yahoo.com

## КУРСОВЕ ЗА ПРОДЪЛЖИТЕЛНО ОБУЧЕНИЕ И КВАЛИФИКАЦИЯ НА ЛЕКАРИТЕ ПО ЕНДОКРИНОЛОГИЯ

Секцията по Тиреоидология към Българското дружество по ендокринология и Съюза на научните медицински дружества /СНМД/ в България организират през 2003 г. курсове, които са включени в програмата на СНМД за продължително обучение и кредитна оценка на лекари - ендокринологи, педиатри и общопрактикуващи специалисти, както и специализиращи по горните специалности.

1/ Курс "Съвременни диагностични подходи и методи в тиреодологията" - 2 дни /13 и 14 юни 2003 г, петък и събота/

Лектори: Проф. Б.Лозанов /Ръководител на курса/, Доц. Г.Кирилов, Доц. А.-М. Борисова, Д-р Рус. Ковачева, Д-р Ил. Атанасова, Д-р Радина Иванова и други

2/ Курс "Лечение, профилактика и контрол на най-честите тиреоидни заболявания" - 2 дни /14 и 15 ноември 2003, петък и събота/

Лектори: Проф. Б.Лозанов /Ръководител на курса/, Доц. А.-М. Борисова, Д-р Рус. Ковачева, Д-р Рал. Иванова, доц. Т. Сечанов, Доц. Т.Хаджиева и др.

Такса правоучастие за всеки курс: 50 лв.

Всеки участник ще получи сертификат с кредитна оценка, определена от СНМД в България.

В срок до 30.04.2003 г. желаещите трябва да направят писмена заявка на адрес:

Специализирана болница по ендокринология /СБАЛЕНГ/, ул. Д. Груев № 6, София - 1303, за Проф.Б.Лозанов

**Международни  
научни прояви  
по ендокринология  
през 2003 г.**

1. Първи балкански конгрес по затлъстяване 6-9 февруари, Атина, Гърция
2. Трети международен уъркшоп върху инсулинова резистентност - 17-19 февруари, Ню Орлийнс, САЩ
3. Седма панарабска конференция върху диабета - 25-28 март, Кайро, Египет
4. Шести европейски конгрес по ендокринология - 26-30 април, Лион, Франция
5. Дванадесети балкански конгрес по ендокринология - 21-26 май, Солун, Гърция
6. Шестдесет и трети конгрес на Американската диабетна асоциация - 13-17 юни, Ню Орлийнс, САЩ
7. Осемдесет и пети конгрес на Американското ендокринно дружество - 19-22 юни, Филадельфия, САЩ
8. Осемнадесети конгрес на Международната диабетна федерация и EASD - 24-29 август, Париж, Франция
9. Осми конгрес на Европейската тиреоидна асоциация - 18-22 октомври, Единбург, Великобритания

**VII Национален  
конгрес по  
ендокринология**

Българското дружество по ендокринология ще проведе редовния си VII Национален конгрес с международно участие от 15 до 18 октомври 2003 г. във ваканционен клуб "Ривиера", Златни пясъци, Варна.

В програмата на конгреса са предвидени пленарни лекции, научни съобщения, постерни сесии, тематични симпозиуми и изложба на фармацевтични фирми. В работата на конгреса ще вземат участие и видни чуждестранни лектори.

Таксата за правоучастие е 30 лв.

Членски внос за Българското дружество по ендокринология - 10 лв.

Настаняването в хотелите на ваканционен клуб "Ривиера" ще става само с предварителна заявка чрез потвърден регистрационен талон, изпратен до Организационния комитет на конгреса. Участници, които не са направили предварителна резервация, няма да бъдат настанявани в хотелите на ваканционен клуб "Ривиера".

Краен срок за получаване на регистрационния талон с резервацията - 1 август 2003 г.

Краен срок за изпращане на резюметата за научни съобщения - 15 юли 2003 г.

Плащането на таксата за правоучастие и на членския внос за Българското дружество по ендокринология ще става на място при регистрацията на участниците.

За гарантиране на настаняване в хотела е необходимо предварително заплащане на 1 нощувка в срок до 30 септември 2003 г.

**Адрес на организационния комитет:**

Организационен комитет на VII Национален конгрес по ендокринология

Проф. Драгомир Коев

СБАЛЕНГ

ул. Дамян Груев 6, София 1303

тел. (02) 987 14 97, (02) 987 72 01 (03)

факс (02) 987 41 45

## РЕГИСТРАЦИОНЕН ТАЛОН

за участие в VII Национален конгрес  
по ендокринология с международно участие,  
ваканционен клуб "Ривиера", Варна

1. Име, презиме и фамилия .....
2. Месторабота .....
3. Адрес за кореспонденция .....
4. Телефон .....

Заявявам настаняването в хотел за следните дати:

- |                                      |                                      |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> 15 октомври | <input type="checkbox"/> 17 октомври |
| <input type="checkbox"/> 16 октомври | <input type="checkbox"/> 18 октомври |
|                                      | <input type="checkbox"/> 19 октомври |

Желая да бъда настанен/а при следните условия:

- |   |
|---|
| <input type="checkbox"/> 1 легло в стая за двама на цена 19\$       |
| <input type="checkbox"/> самостоятелна стая на цена 28\$            |
| <input type="checkbox"/> 1 легло в апартамент за двама на цена 25\$ |
| <input type="checkbox"/> самостоятелно в апартамент на цена 38\$    |

В цената се включва нощувка, закуска, вход в закрит и  
открит басейн и фитнес зала.

Ще участвам:  без доклад  
 с усетен доклад  
 с постер

**Срок за получаване на резюмето на доклада  
- 15 юли 2003 г.**

**Срок за получаване на регистрационния талон  
в Организационния комитет - 1 август 2003 г.**

Носете потвърждението при регистрирането си

### ПОТВЪРЖДЕНИЕ ЗА РЕГИСТРАЦИЯ

Д-р .....  
е регистриран за участие в VII Национален конгрес по ендокринология, 15-18 октомври 2003 г., ваканционен клуб "Ривиера", Варна.

Организационен комитет

## „Климактериум у мъжа?“

**Автор: Филип Куманов**  
**Издание на "АБ студио" ООД**  
**София, 2002 г. Обем 100 стр.**

Българската специализирана литература в областта на ендокринологията, андрологията и гериатрията се обогати с нова книга - монографията на доц. Филип Куманов "Климактериум у мъжа?". В монографията е направен оригинален и сполучлив опит да бъдат систематизирани съвременните схващания за процесите на остаряване при мъжа, които са свързани с постепенно отпадане на тестикуларната и някои други ендокринни функции. Тези промени, известни като "андропауза" или със съвременния акроним ADAM (Androgen Decline in the Aging Male), поставят важни практически въпроси. Тяхното разбиране и решаване изискват задълбочено познаване на физиологичните процеси и възрастовите им промени, засягащи тестикуларните функции, соматотропната ос, а също секретцията на мелатонин и надбъбречнокорови стероиди, които в синхрон съучастват в процеса на стареене при мъжа след 50-годишна възраст. Техните клинични прояви в значителна степен наподобяват, но не са аналогични с тези при женския климактериум. От патофизиологична гледна точка същите не представляват кризисно явление. На всички тези въпроси авторът се спира подробно, с необходимата компетентност и критичност, обосновавайки тезата, че *Climacterium virile* не съществува (стр. 45).

Като изграден и опитен клиницист доц. Филип Куманов представя по класическа схема признаците, диагностичните подходи и лечението на симптомокомплекса ADAM, а също възможностите на съвременните методи за лабораторна диагностика. Нозологията на сексуалните нарушения при стареещия мъж е разгледана обстойно в светлината на най-новите научни постижения. Същото се отнася за заместващата терапия с тестостерон и терапевтичните средства при еректилна дисфункция, извън общите терапевтични мерки. Този подход е твърде полезен за клиничната практика и прави монографията ценно практическо помагало не само за специалистите, но и за общопрактикуващите лекари.

Монографията е написана достъпно, с великолепен литературен стил. Правят впечатление подходящите съпоставки и примери от художествената литература, както и илюстрациите с образци на класическата живопис. Това прави книгата не само строго специализирано издание, но и произведение с по-общ литературен облик.

Проф. Боян Лозанов

## УКАЗАНИЯ ЗА АВТОРИТЕ / INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Списание

**ЕНДОКРИНОЛОГИЯ** ISSN 1310-8131

Българско дружество по ендокринология

Journal

**ENDOCRINOLOGIA** ISSN 1310-8131

Bulgarian Society of Endocrinology (BSE)

### Адрес на редакционната колегия:

Специализирана болница за активно лечение  
по ендокринология, нефрология и геронтология  
„Акад. Иван Пенчев“  
Проф. Б. Лозанов или доц. Ф. Куманов  
ул. „Д. Груев“ 6, 1303 София  
тел. (02) 987 7201; факс (02) 874 145

### Editorial Board Address for Correspondence:

Clinical Center of Endocrinology and Gerontology  
Prof. B. Lozanov or Assoc. Prof. Ph. Kumanov  
6, D. Gruev Str., 1303 Sofia – Bulgaria  
Tel (0359) (02) 987 7201; Fax (0359) (02) 874 145

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

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

Обемът на представените работи не трябва да превишава 10 стандартни страници – за оригиналните статии, 12 страници – за обзорните статии, 3–4 страници – за казуистичните съобщения, 4 страници – за информации относно научни прояви в България и в чужбина, както и за научни дискусии, 2 страници – за рецен-

The journal of the Bulgarian Society of Endocrinology “Endocrinologia” is published in 4 issues per year. It accepts for publication original research articles, case reports, short communications, reviews, opinions on new medical books, correspondence and announcements for scientific events (congresses, symposia, etc) in all fields of clinical endocrinology. The journal is published in Bulgarian. The detailed abstracts and the titles of the articles, the names of the authors and institutions as well as the legends of illustrations (figures and tables) are printed in Bulgarian and English. The papers from abroad are published “in extenso” in English, with complete or selected translation in Bulgarian, provided by the Editorial board.

The manuscripts should be submitted in two printed copies, on standard A4 sheets (21/30 cm), double spaced, 60 characters per line, 30 lines per standard page.

The size of each paper should not exceed 10 pages for original research articles, 12 pages for reviews, 3 pages for case reports, 2 pages for short communications, 4 pages for discussions or correspondence on scientific events on medical books or chronicles. The references or illustrations are included in this size (two 9x13 cm figures, photographs, tables or diagrams are considered as one standard page).

зии на книги (монографии и учебници). В посочения обем се включват книгописът и всички илюстрации и таблици. В същия не се включват резюметата на български и английски, чийто обем трябва да бъде около 200 думи за всяко (25–30 машинописни реда).

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

Структурата на статиите трябва да отговаря на следните изисквания:

#### **Титулна страница**

а) заглавие, имена на авторите (собствено име и фамилия), название на научната организация или лечебното заведение, в което те работят. При повече от едно заведение имената на същите и на съответните автори се маркират с цифри или звездички;

б) същите данни на английски език се изписват под българския текст.

Забележка: при статии от чужди автори българският текст следва английския. Точният превод от английски на български се осигурява от редакцията. Това се отнася и за останалите текстове, включително резюметата на български.

#### **Основен текст на статията**

Оригиналните статии задължително трябва да имат следната структура: увод, материал и методи, собствени резултати, обсъждане, заключение или изводи.

Методиките следва да бъдат подробно описани (включително видът и фирмата производител на използваните реактиви и апаратура). Същото се отнася и за статистическите методи.

Тези изисквания не важат за обзорите и другите видове публикации. В текста се допускат само официално приетите международни съкращения; при използване на други съкращения те трябва да бъдат изрично посочени в текста. За мерните единици е задължителна международната система SI. Цитатите вътре в текста е препоръчително да бъдат отбелязвани само с номерата им в книгописа.

The abstracts are not included in the size of the paper and should be submitted on a separate page with 3 to 5 key words at the end of the abstract. They should reflect the most essential topics of the article, including the objectives and hypothesis of the research work, the procedures, the main findings and the principal conclusions. The abstracts should not exceed one standard typewritten page of 200 words.

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

#### **Title page**

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

#### **Text of the article**

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

#### **Illustrations**

The figures, diagrams, schemes, photos should be submitted separately from the text (one original and two copies) in size 9 x 13 cm, all of them described on the back side with: consecutive number (in Arabic figures); titles of the article and name of the first author. These should be listed together with the corresponding and informative text in the legend (title, keys to symbols, etc.) on a separate sheet in consecutive order. The tables should be presented on separate sheets with Arabic num-

### Илюстрации и таблици

Илюстрациите към текста (фигури, графики, диаграми, схеми и др. – черно-бели копия с необходимия добър контраст и качество) се представят на отделни листове (без обяснителен текст), в оригинал и две копия за всяка от тях. Текстът към фигурите със съответната им номерация (на български и на английски език) се прилага на отделен лист-опис. На гърба на всяка фигура се надписват с молив съответният номер (с арабски цифри), заглавието на статията и името на водещия автор, като се посочва и положението (горе, долу). Таблиците се представят с готово написани обяснителни текстове на български и английски, които са разположени над тях; номерацията им е отделна (също с арабски цифри). Посочените в таблиците данни не трябва да се дублират с тези във фигурите. В текста не се оставя място за илюстрациите; същото се посочва със стрелка и съответния номер в лявото бяло поле на листа.

### Книгопис

Книгописът се представя на отделен лист. Броят на цитираните източници е препоръчително да не надхвърля 15 (за обзорите до 30), като 2/3 от тях да бъдат от последните 5 години. Подреждането става по азбучен ред (първо на кирилица, после на латиница), като след поредния номер се отбелязва фамиленото име на първия автор, след това инициалите му; всички останали автори се посочват с инициалите, последвани от фамиленото име (в обратен ред). Следва цялото заглавие на цитираната статия, след него – названието на списанието (или общоприетото му съкращение), том, година, брой на книжката, началната и крайната страница. Глави (раздели) от книги се изписват по аналогичен начин, като след автора и заглавието на главата (раздела) се отбелязват пълното заглавие на книгата, имената на редакторите (в скоби), издателството, градът и годината на издаване, началната и крайната страница.

### Примери:

#### Статия от списание:

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

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

### References

The references should be presented on a separate page at the end of the manuscript. It is recommended that the number of references should not exceed 15-20 titles for the original articles and 30-35 titles for the reviews; 2/3 of them should be published in the last 5 years. References in Cyrillic should be listed first, followed by the Latin ones in the respective alphabetic order. The number of the reference should be followed by the family name of the first author and then his/her initials, names of the second and other authors should start with the initials followed by family names. The full title of the cited article should be written, followed by the name of the journal where it has been published (or its generally accepted abbreviation), volume, year, issue, first and last page. Chapters of books should be cited in the same way, the full name of the chapter first, followed by "In:", full title of the book, editors, publisher, town, year, first and final page number of the cited chapter.

### Examples:

#### Reference to a journal article:

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

#### Reference to a book chapter:

2. Delange, F. Endemic Cretinism. In: "The Thyroid" Eds. L. Braveman and R. Utiger, Lippincott Co., Philadelphia, 1991, 942-955.

### Submission of manuscripts

The original and one copy of the complete manuscript are submitted together with a covering letter granting the consent of all authors for the publication of the article as well as a statement that it has not been published previously elsewhere and signed by the first author. The Editors will not be responsible for damages or loss of the papers submitted. Papers returned to the authors for revision and not received back in 60 days it shall be treated

**Глава (раздел) от книга:**

2. Delange, F. Endemic Cretenism. In: The Thyroid (Eds. L. Braveman and R. Utiger). Lippincott Co, Philadelphia, 1991, 942–955.

**Адрес за кореспонденция с авторите**

Той се дава в края на всяка статия и съдържа всички необходими данни (вкл. пощенски код) на български език за един от авторите, който отговаря за кореспонденцията.

Всички ръкописи трябва да се изпращат с придружително писмо, подписано от авторите, с което потвърждават съгласието си за отпечатване в сп. "Ендокринология". В писмото трябва да бъде отбелязано, че материалът не е бил отпечатван в други научни списания у нас и в чужбина. Ръкописи не се връщат.

Всички материали за списанието се изпращат на посочения адрес на редакцията.

as newly submitted manuscripts. Manuscripts of articles accepted for publication will not be returned to the authors.

**Address for sending of manuscripts and other editorial correspondence**

Editorial Board:  
Clinical Center of Endocrinology  
and Gerontology  
6, D. Gruev Str.  
1303 Sofia, BULGARIA  
Prof. B. Lozanov (Editor-in-chief)  
or Assoc. Prof. Ph. Kumanov  
(Scientific Secretary)

# ЕНДОКРИНОЛОГИЯ



**Списание  
на Българското дружество  
по ендокринология  
към СНМД в България  
Journal  
of Bulgarian Society  
of Endocrinology (BSE)**

**Главен редактор:**  
Проф. Боян Лозанов  
**Научен секретар:**  
Доц. Филип Куманов  
**Стилов редактор:** Багра Делчева  
**Редактор на английски:**  
Д-р Александър Шинков  
**Отговорен редактор:** Румен Нинов  
**Първа корица и графичен дизайн:**  
Румен Нинов  
**Предпечатна подготовка:** "Бетапринт"  
**Печат:** "График - К"

**Editor-in-chief:** Prof. B. Lozanov  
**Scientific secretary:**  
Assoc. prof. Ph. Kumanov  
**Style editor:** Bagra Delcheva  
**English editor:** Alexander Shinkov, MD  
**Art director:** Rumén Ninov  
**Prepress:** Betaprint  
**Printed by:** Graphic - K