



ISSN 1310-8131

ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ENDOCRINOLOGIA

Списанието се индексира от/The journal is indexed by:

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

Editorial Board/Редакционна колегия и съвет

Editor-in-Chief: Maria ORBETZOVA

Гл. редактор: Мария ОРБЕЦОВА

Honorary Editor-in-chief Bojan LOZANOV

Почетен главен редактор Боян ЛОЗАНОВ

Anna-Maria Borissova/

Анна-Мария Борисова

Vladimir Christov/Владимир Христов

Георги Кирилов

Dragomir Koev/Драгомир Коев

Julieta Gerenova/Жулиета Геренова

Zdravko Kamenov/Здравко Каменов

Ivan Tzinlikov/Иван Цинликов

Iliana Atanassova/Илиана Атанасова

Kalinka Koprivarova/Калинка Коприварова

Kiril Hristozov/Кирил Христозов

Lidia Koeva/Лидия Коева

Malina Petkova/Малина Петкова

Mihail Boyanov/Михаил Боянов

Roussanka Kovatcheva/Русанка Ковачева

Sabina Zacharieva/Сабина Захариева

Philip Kumanov/Филип Куманов

Tsvetalina Tankova/Цветалина Танкова

International Scientific Board/Международен научен съвет

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

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

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

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

A. Isidori (Rome) / А. Изидори (Рим)

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

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

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

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

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

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

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

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

Българско дружество по ендокринология

Том XXII / Volume XXII

Bulgarian Society of Endocrinology 1/2017

Съдържание**Обзори**

- *Митева, Мария Ж., Нончев, Боян Ив., Орбецова, Мария М.*
Молекулярно-генетични аспекти на тиреоидния карцином 3

Оригинални статии

- *Геренова, Жулиета Б., Watt Torquil, Диманова, Боряна Д.*
ThyPRO-39bg: Лингвистично валидиране на специфичния за тиреоидни заболявания въпросник за качество на живот ThyPRO-39 11
- *Грозева, Грета Г., Чакърова, Невена Я., Димова, Румяна Б., Танкова, Цветалина Ив., Атанасова, Илияна Б.*
Честота и диагностична стойност на антителата към цинков транспортер 8 (ZnT8) в българска популация пациенти със захарен диабет тип 1 21
- *Бояджиева, Мила Б., Ангелов, Атанас А., Хаджиева, Елица Г., Христозов, Кирил Х., Георгиев, Светослав Ж.*
Нива на гликемията след натоварване при лица с ангиографски установена коронарна артериална стеноза 32
- *Бояджиева, Мила Б., Хаджиева, Елица Г., Христозов, Кирил Х., Георгиева-Христова, Дарина К.*
Роля на продължителното глюкозно мониториране за откриване на асимптомни нощни хипогликемии и разграничаване етиологията на сутрешните хипергликемии 41

- Указания за авторите** 52

Journal ENDOCRINOLOGIA volume XXII, number 1, 2017**Contents****Reviews**

- *Miteva, Maria J, Nonchev, Boyan Iv., Orbetzova, Maria M.*
Molecular Genetic Aspects of Thyroid Cancer 3

Original articles

- *Geranova, Julieta B., Watt Torquil, Dimanova, Boryana D.*
ThyPRO - 39bg: Translation and Validation in Bulgarian of Thyroid-specific Quality of Life Questionnaire ThyPRO - 39 18
- *Grozeva, Greta G., Chakarova, Nevena Y., Dimova, Romyana B, Tankova, Tsvetalina Iv., Atanassova, Iliana B.*
Prevalence and Diagnostic Value of Zinc Transporter 8 (ZnT8) Antibodies in Bulgarian Population with Type 1 Diabetes 27
- *Boyadzhieva, Mila B., Angelov, Atanas A., Hadzhieva, Elitsa G., Hristozov, Kiril H, Georgiev, Svetoslav J.*
Post-load Glycemic Levels in Subjects With Angiographically Determined Coronary Artery Stenosis 36
- *Boyadzhieva, Mila B., Hadzhieva, Elitsa G., Hristozov, Kiril H., Georgieva-Hristova, Darina K.*
The Role of Continuous Glucose Monitoring for Detecting Asymptomatic Nocturnal Hypoglycemia and Differentiating Between Different Causes for Morning Hyperglycemia 46

- Instructions to authors** 52



Молекулярно-генетични аспекти на тиреоидния карцином

Митева, Мария Ж., Нончев, Боян Ив., Орбецова, Мария М.

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

Molecular Genetic Aspects of Thyroid Cancer

Miteva, Maria J, Nonchev, Boyan Iv., Orbetzova, Maria M.

Clinic of Endocrinology and metabolic diseases; „Sv. Georgy“ University Hospital, Medical University, Plovdiv

Резюме

Карциномът на щитовидната жлеза е най-разпространеният злокачествен тумор на ендокринната система. Най-често срещаният тип тиреоиден карцином е папиларният. Тези тумори често имат генетични изменения, водещи до активиране на сигналния път на митоген-активираната протеин киназа (МАРК). Най-често срещаните мутации при папиларните карциноми са точкови мутации на гените BRAF и RAS и прегрупирване на RET/PTC. Посочените генетични изменения се откриват при над 70% от папиларните карциноми като рядко се наблюдава припокриване в един и същ тумор. Най-разпространените нарушения при фоликуларните карциноми, вторият най-често срещан тип злокачествен процес на щитовидната жлеза, включват RAS мутации и пренареждане на PAX8-PPAR γ . От решаващо значение за развитие на медуларните тиреоидни карциноми са точковите мутации на RET протоонкогена. Много от изброените мутации, по-специално тези, водещи до активиране на МАРК пътя, са обект на активно изучаване като терапевтични цели при карцинома на щитовидната жлеза.

Ключови думи:

тиреоиден карцином, генетични нарушения, точкови мутации, сигнален път на митоген-активираната протеин киназа

Abstract

Thyroid cancer is the most common malignant tumor of the endocrine system. The most frequent type of thyroid malignancy is papillary carcinoma. These tumors frequently have genetic alterations leading to the activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. Most common mutations in papillary carcinomas are point mutations of the BRAF and RAS genes and RET/PTC rearrangement. These genetic alterations are found in >70% of papillary carcinomas and they rarely overlap in the same tumor. Most frequent alterations in follicular carcinomas, the second most common type of thyroid malignancy, include RAS mutations and PAX8-PPAR γ rearrangement. RET proto-oncogene point mutations are crucial for the development of medullary thyroid carcinomas. Many of these mutations, particularly those leading to the activation of the MAPK pathway, are being actively explored as therapeutic targets for thyroid cancer.

Key words:

thyroid carcinoma, genetic alterations, point mutations, mitogen-activated protein kinase signaling pathway

Въведение

Карциномът на щитовидната жлеза е най-честата ендокринна неоплазия, чието разпространение бързо нараства. Папиларният хистотип карцином е най-честият. Тиреоидният карцином може да произлезе както от фоликуларните, така и от парафоликуларните компоненти на щитовидната жлеза. Три злокачествени лезии могат да водят начало си от фоликуларните клетки: *добре диференциран, слабо диференциран и недиференциран или анапластичен тиреоиден карцином*.

Добре диференцираните тиреоидни карциноми са или папиларен, или фоликуларен тип. Добре диференцираните тиреоидни карциноми имат по-благоприятна прогноза за благоприятно възможността за комбиниране на хирургично отстраняване на тумора и терапия с радиоактивен йод. Независимо от това, 5-10% от добре диференцираните тиреоидни карциноми прогресират до развитие на нечувствителност към радиоидо лечение.

Слабо диференцираните и недиференцираните тиреоидни карциноми, за които се смята, че произлизат от предшествващи диференцирани тумори, не натрупват радиоактивния йод и реагират слабо на медикаментозно и хирургично лечение (1).

Медуларният карцином на щитовидната жлеза, който произлиза от парафоликуларните С-клетки на щитовидната жлеза, може да се унаследява в контекста на автозомно-доминантните синдроми на множествена ендокринна неоплазия (МЕН) тип 2 (МЕН 2А, МЕН 2В) и фамилен медуларен карцином на щитовидната жлеза (2).

Генетични нарушения при туморите на щитовидната жлеза

Генетичните нарушения при туморите на щитовидната жлеза могат да бъдат разделени в две категории, *наследствени* (герминативни) мутации и *спорадични* (соматични) мутации. Извършвани са редица проучвания паралелно и върху наследствените, и върху спорадичните мутации. Въпреки че са изучени много генни мутации, само една наследствена генетична мутация и пет до осем спорадични мутации понастоящем се приемат за значими (Табл. 1).

Единствената известна наследствена генетична мутация, свързана с рака на щито-

видната жлеза, е *точкова мутация в RET протоонкогена*, която води до развитие на медуларен тиреоиден карцином. Хипотезата за асоциация на медуларния карцином на щитовидната жлеза с определена генетична мутация е изказана за първи в края на 80-те години на миналия век, но мутацията не е била конкретно идентифицирана до 1993 г. (3).

Първата открита спорадична мутация при карцином на щитовидната жлеза е описана през 1987 г. и включва генетичен дефект в семейството на RAS протеините (4). През 1990г. са идентифицирани соматични RET/PTC транслокации при папиларен тиреоиден карцином. През 1992 г. са идентифицирани P53 мутации при анапластичен тиреоиден карцином и NTRK1 мутации при папиларен тиреоиден карцином (5-7). Следва известен период на затишие в откриването на генетични мутации при рака на щитовидната жлеза до 2000 г., когато при фоликуларни тиреоидни карциноми са открити PAX8/PPARγ транслокации (8). Това е последвано от откриването през 2003 г. на BRAF-мутации, първо при меланом, след това при папиларен тиреоиден карцином. BRAF-мутациите са най-честите соматични мутации при папиларен карцином на щитовидната жлеза и откриването им е вероятно едно от най-значимите постижения в откриването на генетични мутации при изучаване на рака на щитовидната жлеза въобще (9).

Редица изследователи са продължили търсенето на генетичната мутация, отговорна за фамилен не-медуларен карцином на щитовидната жлеза, но тази предполагаема мутация все още не е идентифицирана.

Генетични биомаркери за тиреоиден карцином

Тъй като разкриването на причините за възникване на карцинома на щитовидната жлеза напредва, идентифицирането на биомаркери, базирани върху генетични мутации, се измества от фокусиране върху единични генетични мутации към търсене на молекулярни сигнатури и панели от множествени мутации. Такава промяна в подхода настъпва, тъй като изследователите осъзнават, че прогресията от нормална клетка към туморна клетка е сложен процес, който включва по-скоро множество генетични и евентуално епигенетични събития, което прави по-малко вероятно една единствена мутация да е отговорна за възникване на спорадичен тирео-

Таблица 1.

Честота на спорадични мутации при тиреоидни агенони и различни фенотипове тиреоиден карцином.

Мутация	Агеном	ПТК	ФТК	АТК	Източник
BRAF	0%	44%	<1%	24%	(39)
RET/PTC	противоречива	35%	0%	0%	(40)
RAS	13%	10%	40%	22%	(41)
PAX8/PPAR γ	11%	0%	36%	0%	(42)
P53	0%	1%	1%	55%	(43)
NTRK1	неясна	12%	неясна	неясна	(44)

ПТК: папиларен тиреоиден карцином, ФТК: фоликуларен тиреоиден карцином, АТК: анапластичен тиреоиден карцином.

иден карцином. Вместо това, широк спектър от различни мутации може да стои в основата на спорадичния тиреоиден карцином.

Откриването на единичните генетични мутации остава важен фактор в разбирането на карциногенезата, но единичните мутации не могат да послужат в клиничната практика като биомаркери за рак на щитовидната жлеза. Панели от ДНК мутации се проучват като потенциални биомаркери за тиреоиден карцином. Друга област на научно изследователски интерес обхваща микросателитната нестабилност, която може да се използва като биомаркер за развитието на рака на щитовидната жлеза.

В около 70% от добре диференцираните тиреоидни карциноми не се откриват припокриващи мутации на гените RET, NTRK1, RAS и BRAF. Тези гени кодират активатори на каскадата на митоген-активираната протеин киназа (МАРК). Дерегулирането на пътя на МАРК/ERK (извънклетъчна сигнал-регулирана киназа) играе важна роля при много видове карциноми. МАРК/ERK пътят се състои от киназна каскада на три нива, която осъществява действието си чрез последователно активиране и фосфорилиране на митоген-активираната протеин киназна киназа (МКК) RAF, МКК1/2, и ERK1/2. В нормални клетки, МАРК/ERK пътят обикновено се активира от митогени и фактори на растежа, което има за резултат регулиране на различни клетъчни процеси, включително растеж, диференциация, апоптоза и преживяемост. При карциномите МАРК пътят обикновено се активира чрез свръхекспресия, усилване, или мутация на погорни сигнални компоненти.

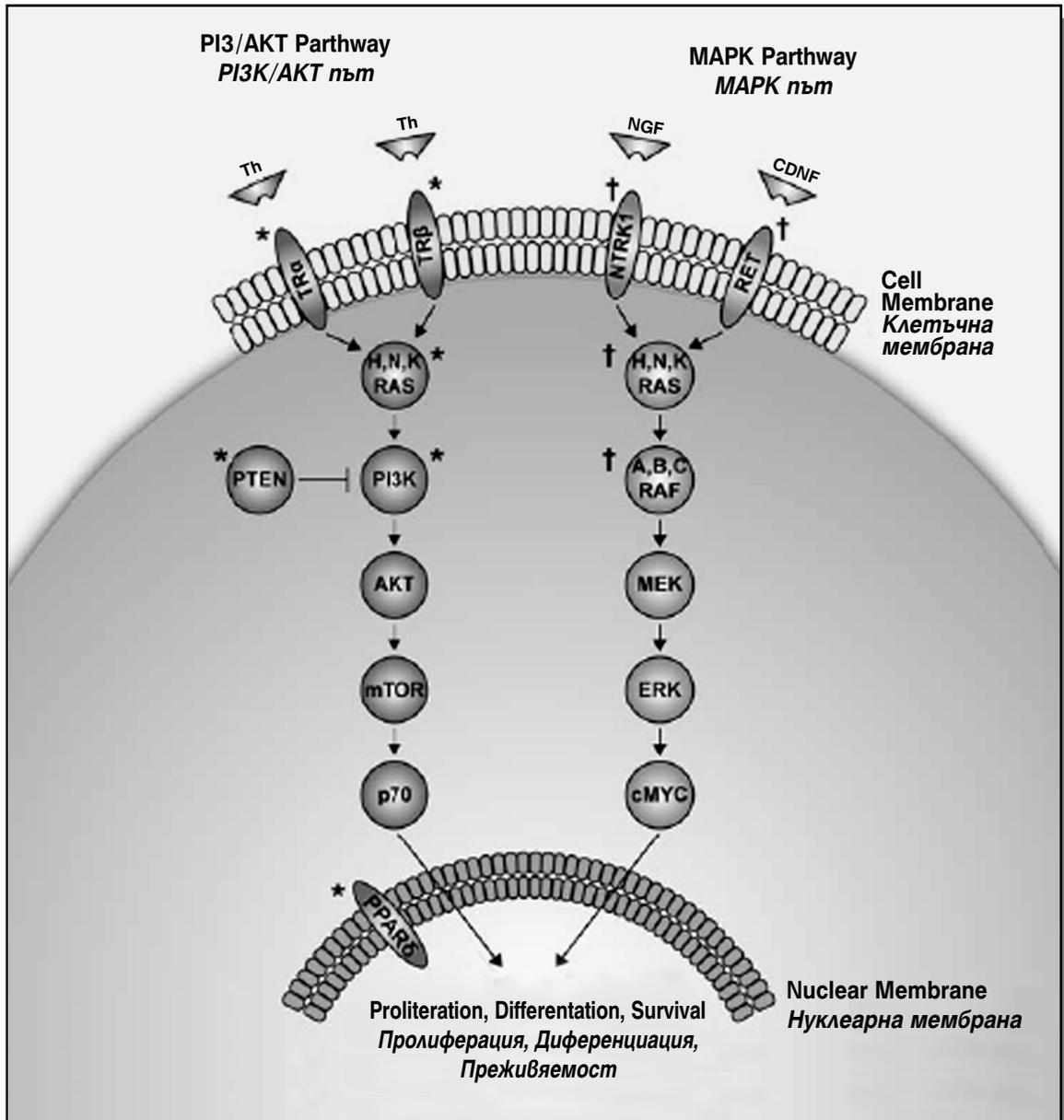
RET кодира тирозин киназния рецептор

на растежни фактори, принадлежащи към семейството на глиалния невротрофичен фактор (GDNF)(10). Мутациите на RET, които причиняват спорадичния папиларен тиреоиден карцином, са по-скоро пренареждания, отколкото точкови мутации, подобни на намерените при фамилен медуларен тиреоиден карцином. Усилване на функцията на RET гена настъпва, когато последният се пренарежда и се свързва с нов промотор от ген, който постоянно се експресира в клетките на тиреоидните фоликули.

Това води до неконтролирана последваща сигнализация и активиране на МАРК пътя. RET/PTC пренарежданията се смятат за ранни събития в тиреоидната туморогенеза, тъй като те са много често срещани при клинично безсимптомните малки по размер папиларни тиреоидни карциноми (11); откриват се в спорадичния и радиационно-свързания папиларен тиреоиден карцином, предимно в последния, както и в доброкачествени лезии на щитовидната жлеза.

За най-малко 15 отделни гени е известно, че се пренареждат с RET гена, което води до мутации, отговорни за папиларния тиреоиден карцином, но 80% от тях са представени от RET/PTC1 и RET/PTC3. Първата мутация е свързана с добре диференциран според хистологичната си характеристика карцином и по-добра прогноза (12,13), докато последната е свързана с по-агресивни видове тумори. Висока честота на RET/PTC пренарежданията се открива при папиларен карцином на щитовидната жлеза, индуциран от високи нива на радиация в резултат на ядрени аварии (напр. в Чернобил) или при лъчелечение. RET/PTC пренарежданията са също често срещани папиларен карцином на

Фигура 1. Пътища на генетични мутации, свързани със спорадичен карцином на щитовидната жлеза. Счита се, че спорадичният тиреоиден карцином възниква по три независими клетъчни пътища в зависимост от вида на спорадичната генетична мутация, която води до развитието му.



† Обозначава известни генетични мутации, свързани със спорадичния папиларен карцином. Мутациите на MAPK пътя са свързани с папиларен тиреоиден карцином.

* Обозначава известни генетични мутации, свързани със спорадичния фоликуларен тиреоиден карцином. Спорадични мутации на пътя PI3K/AKT са свързани с фоликуларен тиреоиден карцином. В третия път, мутации на ядрения рецептор PPAR-гама са свързани с фоликуларен.

Th = хормони на щитовидната жлеза, TR = рецептор на хормоните на щитовидната жлеза, NGF = нервнен растежен фактор, GDNF = невротрофичен фактор, произхождащ от глиалната клетъчна линия

щитовидната жлеза в детска възраст.

RET/PTC пренарежданията играят важна роля за разгадаване на причините за спорадична изява на тиреоиден карцином, но не са при-

ложими като клинични биомаркери.

Подобни пренареждания на рецептора с висок афинитет на нервния растежен фактор (NGF) също са намерени в човешки папи-

ларен тиреоиден карцином, макар и с по-слабо разпространение (14). Невротрофичният тирозин киназен тип 1 ген (**NTRK1**) кодира тирозин киназния рецептор на клетъчната повърхност, известен като NTRK1, който се свързва неговия лиганд NGF. След свързване с NGF, NTRK1 рецепторът активира RAS протеини, които от своя страна са отговорни за сигнализиране през MAPK пътя

и контролиране на клетъчната пролиферация, диференциация и апоптоза (Фиг. 1) (15). В средата на 90-те години на миналия век е намерено че, 3 гена – тропомиозин 3 (TPM3), транслоциран промоторен регион (TPR), и TRK слят ген (TFG), се пренареждат с NTRK1 с образуване на транслокации, които са свързани с папиларния тиреоиден карцином (7,15). NTRK1 транслокациите са свързани само с възникване на папиларен тиреоиден карцином, но се откриват с много по-ниска честота (5-15%) от RET транслокациите или BRAF точковите мутации. Малкото проучвания по отношение прогнозата на заболяването показват, че NTRK1 транслокациите са асоциирани с по-лоша прогноза в сравнение с RET транслокациите (16).

RAS протоонкогенът кодира 3 различни мембранно свързани GTP протеини: H-RAS, K-RAS и N-RAS. Активирането на точкови мутации в RAS гените предизвиква усилване на сигналната трансдукция и през двата пътя – на MAPK и на PI3K/Akt. (17,18), което води до аберадна клетъчна пролиферация и диференциация. При туморите на щитовидната жлеза най-често срещаните RAS мутации са в гена N-RAS, последвани от H-RAS, и най-накрая в K-RAS.

RAS мутации се откриват при широк спектър от тумори на щитовидната жлеза, включително фоликуларни аденоми, фоликуларни карциноми, папиларни карциноми, слабо диференцирани и недиференцирани карциноми. По-често, обаче, те са свързани с фоликуларните в сравнение с папиларните тумори. RAS мутации са идентифицирани в доброкачествени фоликуларни аденоми, но остава неясно дали RAS-положителните фоликуларни аденоми имат по-голяма вероятност за малигнизация (19). Честотата на този вид мутация при доброкачествените възли на щитовидната жлеза е между 20% и 40% (20).

BRAF е член на RAF семейството на серин/треонин киназите (A, B и C) и е компонент на RAF-MEK-ERK сигналния модул. Тези протеини препредават сигнали от мембранно-свързани рецептори към последващите регулатори на MAPK пътя, които в крайна смет-

ка контролират експресията на няколко гена, отговорни за клетъчната пролиферация, диференциация и апоптоза (Фиг. 1).

Повечето BRAF мутации са предизвикани от една единствена точкова мутация, която замества валин за глутаминова киселина в позиция 600, и е определена като BRAFV600E. Мутацията BRAFV600E в момента е най-честата генетична мутация, намерена при папиларен тиреоиден карцином (29-83%) (21). Също така, тази мутация е често срещана при вариант на папиларен тиреоиден карцином с продълговати клетки, слабо диференциран тиреоиден карцином, недиференциран тиреоиден карцином от папиларен произход. Последната мутация рядко се открива във фоликуларни неоплазми на щитовидната жлеза (22). Друга активизираща BRAF мутация – BRAFK601E, е установена в тиреоидни аденоми и фоликуларен вариант на папиларен тиреоиден карцином (23,24). Мутацията BRAF V600E, заедно с RET/PTC разместванията са отличителен белег на рака на щитовидната жлеза и болшинството негетерминирани възли на щитовидната жлеза, носещи която и да е от тези две мутации, се оказват злокачествени при окончателен хистологичен анализ (20,25). Като цяло, честотата на разпространение на BRAF мутациите в негетерминирани лезии на щитовидната жлеза варира между 15 и 40% (26-27), докато носителство на тези мутации се наблюдава в най-малко 45% от класическия вариант на папиларния тиреоиден карцином (9,28).

Някои, но не всички изследователи установяват, че активизиращи BRAF точкови мутации водят до висока степен на злокачествена трансформация на аденомите и се асоциират с по-късна възраст на изява на лезията, екстра-туморно разрастване, метастази в лимфните възли и по-висок процент на рецидиви (22-29). Един скорошен мета-анализ върху 1168 пациента потвърждава връзката на мутацията BRAFV 600E с по-тежка клинична изява, както и с по-изразена екстра-туморна инвазия (30, 31). С оглед роля на биомаркер, BRAF се открива почти изключително в папиларни тиреоидни карциноми, и може да се използва като отличителен белег за този вид тумор. BRAF се смята също за носител на по-лоша прогноза в сравнение със спорадичните тумори на щитовидната жлеза, при които не се открива тази мутация, но за да се докаже клиничната значимост на този факт за определяне на терапевтичното поведение, са необходими повече проспективни проучвания.

Фоликуларните тиреоидни карциноми се характеризират с RAS точкови мутации или (32) PAX8/PPAR пренареждания (33). PPAR-гама е ядрен рецептор, участващ в контрола на клетъчния цикъл и апоптозата. PAX8 е транскрипционен фактор, участващ в развитието и регулирането на специфични за щитовидната жлеза гени. Абнормна транслокация води до сливане (фузия) на PAX8 промотора с PPAR-гама гена, при което се формира мутирал PAX8/PPAR-гама слят протеин (PPFP), което води до инактивиране на дивия тип PPAR-гама ген. PAX8/PPAR-гама транслокации са намерени предимно във фоликуларни тиреоидни карциноми. Обаче, те също така се откриват, макар и с доста по-ниска честота, във фоликуларни аденоми и папиларни карциноми. PAX8/PPAR-гама мутациите са свързани типично с фоликуларен рак на щитовидната жлеза, който се появява в по-ранна възраст и по-често протича със съдова инвазия. Тази предразположеност към ранна съдова инвазия означава, че малкото тумори с тези мутации са открити в пре-малигнено състояние, ето защо в малък брой фоликуларни аденоми се доказва мутацията. Като биомаркер, PAX8/PPAR-гама пренареждането е силен индикатор, че туморът е фоликуларен карцином със склонност към ранна съдова инвазия, но само по себе си не е достатъчно чувствителен и специфичен показател, за да се използва самостоятелно за надеждно разграничаване на доброкачествени от злокачествени фоликуларни неоплазми. Въпреки това, ако във фоликуларна неоплазма е намерена PAX8/PPAR-гама мутация, съществува голяма вероятност лезията да прогресира към развитие на фоликуларен карцином (19). PAX8/PPAR-гама слят протеин се открива в 23-63% от фоликуларните тиреоидни карциноми, което има за резултат свръхактивиране на клетъчната пролиферация и диференциация. RAS точковите мутации и BRAF мутацията V600E преобладават в слабо диференцираните и недиференцираните тиреоидни карциноми (19, 34, 35).

В анапластичните (недиференцирани) тиреоидни карциноми често се откриват p53 мутации (36,37). P53 е важен тумор-супресорен ген, който регулира преустановяването на клетъчния цикъл и апоптозата. Когато една клетка е увредена, p53 е отговорен (чрез каскада от регулиращи фактори), както за спиране на клетъчния цикъл, за да се даде възможност за възстановяване на ДНК, така и за инициране процес на апоптоза в тежко увре-

дените клетки. По тези начини, p53 действа за предотвратяване превръщането на увредените клетки в туморни. Мутации, които причиняват инактивиране на p53 гена, могат да бъдат намерени в до 50% от всички злокачествени процеси при хора, правейки тези мутации най-честите при човешки карциноми (38). P53 мутациите са често срещани в слабо диференцираните и недиференцираните карциноми на щитовидната жлеза и в клетъчни линии на тиреоиден карцином, но са рядкост за добре диференцираните тиреоидни карциноми. Тази характеристика на разпространението показва, че някакво първоначално тригериращо събитие дестабилизира ДНК на клетките на щитовидната жлеза, което води до образуване на тиреоиден карцином, а след това първоначално събитие, p53 мутациите водят до прогресиране на тиреоидния карцином до недиференцирано състояние (39). Тази концепция помага да се обясни голямата честота на p53 мутациите в анапластичните карциноми на щитовидната жлеза в сравнение с добре диференцираните карциноми. Съществуват и доказателства, че инактивирането на p53, причинено от други събития, различни от наличието на мутации, може да играе роля в развитието на добре диференцираните тумори на щитовидната жлеза (40,41).

Медуларните тиреоидни карциноми могат да възникнат спорадично или като лезии в състава на автозомно-доминантните MEN 2 синдроми (MEN 2A, MEN 2B, фамилен медуларен тиреоиден карцином). MEN 2 синдромите се причиняват от герминативни точкови мутации, които превръщат RET в доминантен онкоген (42). При всички случаи с MEN 2A, мутациите са насочени към екстрацелуларните цистеинови остатъци в RET. При над 80% от случаите MEN 2B се причинява от субституцията Met918Thr в киназия домейн на рецептора. Приблизително 40% от спорадичните медуларни карциноми крият точкови мутации в RET.

RET генът, първият прото-онкоген, идентифициран през 1985 г. (43), кодира RET рецептора: тирозин-киназа, свързана с плазмената мембрана, която се експресира в невроендокринни и нервни клетки. Това означава, че продуктът на RET гена се експресира в нормални тиреоидни парафоликуларни или C-клетки, но не и в нормални тиреоидни фоликуларни клетки. Множествената ендокринна неоплазия тип 2A (MEN 2A) се асоциира с дефект в хромозома 10 според данни от геномно свързан

„линкидж“ анализ през 1987 г., когато локализацията на RET гена е все още неизвестна (44). На следващата година нуклеотидната последователност на гена на RET е вече определена и през 1989 г. RET генът е локализиран в хромозома 10q11,2 (45, 46). През 1991 г., „линкидж“ анализ във фамилии на пациенти с МЕН 2А стеснява връзката с хромозома 10q11,2, в която хромозома по това време се знае, че е локализиран RET генът (47). Това откритие се потвърждава през 1993 г., същата година, в която са открити специфични герминативни мутации на RET гена във фамилии с МЕН 2А. Тези факти окончателно потвърждават асоциацията на RET точковите мутации в хромозома 10q11,2 с развитието на медуларен карцином на щитовидната жлеза (48, 49,50). Тези мутации се откриват също при пациенти с МЕН 2В и в семейства с фамилен медуларен тиреоиден карцином, които развиват само този карцином без други съпътстващи ендокринопатии.

Точковите мутации на RET гена, които предизвикват медуларен тиреоиден карцином, имат за резултат повишена функция на RET рецептора. Мутациите на RET гена, индуциращи загуба на функция на RET рецептора, не водят до медуларен тиреоиден карцином, но могат да причинят болест на Hirschsprung и вроден мегаколон. Идентифицирани са множество индивидуални точкови мутации в RET гена, които са довели до установяване на генотип-фенотипни корелации и стратифициране на наследствения медуларен карцином на щитовидната жлеза в три рискови групи (нива 1, 2 и 3). Тези нива корелират с генотипа, както и с възрастта на изява и степента на агресивност на тиреоидния карцином, като при Ниво 1 мутациите са най-слабо агресивни, а при Ниво 3 – най-силно агресивни. Тъй като пенетрантността на рака на щитовидната жлеза е почти 100% при пациентите с RET точкови мутации, профилактичната тиреоидектомия сега е стандартно лечение при всички пациенти с тези мутации. Актуалните препоръки призовават към профилактична тиреоидектомия във възрастта между 5 и 10 г. за лица с мутации от Ниво 1, не по-късно от 5-годишна възраст при мутации от Ниво 2, и при поставяне на диагнозата или не по-късно от 6-месечна възраст при мутации от Ниво 3 (51, 52). По-ранно оперативно лечение е показано при тези пациенти, които не са калцитонин-отрицателни и ехографското изследване не е отхвърлило аденом на щитовидната жлеза. Генетичното тестване, бивайки

по-чувствително и специфично, измества мониторингът на серумния калцитонин за откриване на лицата, податливи на развитие на фамилен медуларен тиреоиден карцином (53). Ако нивото на серумния калцитонин е повишено или се открият възли при ултразвуково изследване на щитовидната жлеза, е показано оперативно лечение. Понастоящем, наследствените точкови мутации на RET са най-специфичните биомаркери в клиничната практика за диагностициране на пациенти, които ще се развиват медуларен тиреоиден карцином. До момента няма друг толкова чувствителен и специфичен биомаркер при диагностицирането на карциномите на щитовидната жлеза.

Някои от маркерите, включително галектин-3, Hector Battifora мезотелиална клетка-1 (HBMЕ-1), обратна транскриптаза на човешка теломераза (hTERT), теломераза, микро РНК, ДНК-фрагменти, мултигенни анализи се явяват многообещаващи за диагностициране и допълват характеризиранията на лезии с клетъчен атипизъм, суспектна цитологична находка и наличие на фоликуларни структури.

Заклучение

Последните години бележат разширяване на познанията за ролята на генетичните мутации във възникването на различните видове тиреоидни карциноми. Натрупващите се данни от редица проучвания и мета-анализи позволяват идентифициране на зависимости между специфични мутации и някои фенотипни характеристики на карциномите на щитовидната жлеза, биващи от съществено значение за тяхната прогноза. Специфичните мутации могат да бъдат надеждно идентифицирани в проби от тиреоидна тъкан чрез новите методи и молекулярни техники, което да подпомогне клиницистите в определяне на най-подходящото терапевтично поведение. Прилагането на молекулярни методи е довело до разработването на много чувствителни маркери за диагноза на нововъзникнали случаи на рак на щитовидната жлеза, за оценка на пациенти с рецидиви, за определяне на прогнозата на карцинома и за постоперативното проследяване на пациентите в насока ранно откриване на остатъчна и рецидивираща карциномна тъкан. Ето защо, внедряването на молекулярно-генетичния анализ за по-добро характеризиране на възлите на щитовидната жлеза е област на голям научно-изследователски и клиничен интерес.

1. Rosai J, Carcangiu ML, DeLellis RA Atlas of Tumor Pathology - Tumors of the thyroid gland. 1992. 3rd series. Washington: Armed Force Institute of Pathology.
2. Roman S, Mehta P, Sosa JA. Medullary thyroid cancer: early detection and novel treatments. *Curr Opin Oncol* 2009; 21(1):5-10.
3. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, et al. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993; 363: 458-460.
4. Knyazev PG, Fedorov SN, Serova OM, Pluzhnikova GF, Novikov LB, Kalinovsky VP, Seitz, J.F. Molecular-genetic analysis of myc and c-Ha-ras proto-oncogene alterations in human carcinoma. *Haematol Blood Transfus* 1987; 31: 469-473.
5. Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Melillo RM, Donghi R, Bongarzone I, et al. PTC is a novel rearranged form of the ret protooncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 1990; 60: 557-563.
6. Ito T, Seyama T, Mizuno T, Tsuyama N, Hayashi T, Hayashi Y, et al. Unique association of p53 mutations with undifferentiated but not with differentiated carcinomas of the thyroid gland. *Cancer Res* 1992; 52: 1369-1371.
7. Greco A, Pierotti MA, Bongarzone I, Pagliardini S, Lanzi C, Della Porta G. TRK-T1 is a novel oncogene formed by the fusion of TPR and TRK genes in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 1992; 7: 237-242.
8. Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA. PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected] *Science* 2000; 289: 1357-1360.
9. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 1454-1457.
10. Manie S, Santoro M, Fusco A, Billaud M.. The RET receptor: function in development and dysfunction in congenital malformation. *Trends Genet* 2001; 17: 580-589.
11. Fusco A, Chiappetta G, Hui P, Garcia-Rostan G, Golden L, Kinder BK, et al. Assessment of RET/PTC oncogene activation and clonality in thyroid nodules with incomplete morphological evidence of papillary carcinoma: a search for the early precursors of papillary cancer. *Am J Pathol* 2002; 160: 2157-2167.
12. Rabes HM, Demidchik EP, Sidorow JD, Lengfelder E, Beimfohr C, Hoelzel D, Klugbauer S, et al. Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications. *Clin Cancer Res* 2000; 6(3): 1093-1103.
13. Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, Steward DL, Fidler JP, Giordano TJ, Biddinger PW, et al. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2006; 30(2): 216-222.
14. Alberti L, Carniti C, Miranda C, Roccato E, Pierotti MA. RET and NTRK1 protooncogenes in human diseases. *J Cell Physiol* 2003; 195: 168-186.
15. Greco A, Miranda C, Pierotti MA. Rearrangements of NTRK1 gene in papillary thyroid carcinoma. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 321: 44-49.
16. Musholt TJ, Musholt PB, Khaladj N, Schulz D, Scheumann GF, Klemptner J. Prognostic significance of RET and NTRK1 rearrangements in sporadic papillary thyroid carcinoma. *Br J Surg* 2000; 87: 1256-1278.
17. Suarez HG, du Villard JA, Severino M, Caillou B, Schlumberger M, Tubiana M, et al. Presence of mutations in all three ras genes in human thyroid tumors. *Oncogene* 1990; 5(4): 565-570.
18. Suh I, Kebebew E. The biology of thyroid oncogenesis. *Cancer Treat Res* 2010; 153: 3-21.
19. Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW 2nd, Tallini G, et al. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(5): 2318-2326.
20. Zhu Z, Ciampi R, Nikiforova MN, Gandhi M, Nikiforov YE. Prevalence of RET/PTC rearrangements in thyroid papillary carcinomas: effects of the detection methods and genetic heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(9): 3603-3610.
21. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12: 245-262.
22. Kebebew E, Weng J, Bauer J, Ranvier G, Clark OH, Duh QY, et al. The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Ann Surg* 2007; 246: 466-471.
23. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 2003; 22: 4578-4580.
24. Trovisco V, Vieira de Castro I, Soares P, M6ximo V, Silva P, Magalhães J, et al. BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. *J Pathol* 2004; 202: 247-251.
25. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev* 2007; 28(7): 742-762.
26. Cohen Y, Rosenbaum E, Clark DP, Zeiger MA, Umbricht CB, Tufano RP, et al. Mutational analysis of BRAF in fine needle aspiration biopsies of the thyroid: a potential application for the preoperative assessment of thyroid nodules. *Clin Cancer Res* 2004; 10(8): 2761-2765.
27. Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, Haugen BR, Klopper JP, Zhu Z, et al. Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(6): 2092-2098.
28. Puxeddu E, Moretti S, Elisei R, Romei C, Pascucci R, Martinelli M, et al. BRAF(V599E) mutation is the leading genetic event in adult sporadic papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(5): 2414-2420.
29. Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden, K. J. et al. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005, 90, 6373-6379.
30. Kim TY, Kim WB, Song JY, Rhee YS, Gong G, Cho YM, et al. The BRAF mutation is not associated with poor prognostic factors in Korean patients with conventional papillary thyroid microcarcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 63: 588-593.
31. Lee JH, Lee ES, Kim YS. Clinicopathologic significance of BRAF V600E mutation in papillary carcinomas of the thyroid: a meta-analysis. *Cancer* 2007; 110: 38-46.
32. Nikiforova MN, Caudill CM, Biddinger P, Nikiforov YE. Prevalence of RET/PTC rearrangements in Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid carcinomas. *Int J Surg Pathol* 2002; 10: 15-22.
33. Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA. PAX8-PPAR gamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma. *Science* 2000; 289: 1357-1360.
34. Begum, S., Rosenbaum, E., Henrique, R., Cohen, Y., Sidransky, D., Westra, W.H., 2004. BRAF mutations in anaplastic thyroid carcinoma: implications for tumor origin, diagnosis and treatment. *Mod. Pathol.* 17, 1359-63.
35. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Feijro T, Rebocho AP, Fonseca E, et al. BRAF mutations typical of papillary thyroid carcinoma are more frequently detected in undifferentiated than in insular and insular-like poorly differentiated carcinomas. *Virchows Arch* 2004; 444:57
36. Donghi R, Longoni A, Pilotti S, Michieli P, Della Porta G, Pierotti MA. Gene p53 mutations are restricted to poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland. *J Clin Invest* 1993; 91: 1753-1760.
37. Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH, Koeffler HP. High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J Clin Invest* 1993; 91: 179-84.

38. **Morita N, Ikeda Y, Takami H.** Clinical significance of p53 protein expression in papillary thyroid carcinoma. *World J Surg* 2008; 32: 2617-2622.
39. **Jossart GH, Epstein HD, Shaver JK, Weier HU, Greulich KM, Tezelman S, et al.** Immunocytochemical detection of p53 in human thyroid carcinomas is associated with mutation and immortalization of cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3498-3504.
40. **Park KY, Koh JM, Kim YI, Park HJ, Gong G, Hong SJ, Ahn .M.** Prevalences of Gs alpha, ras, p53 mutations and ret/PTC rearrangement in differentiated thyroid tumours in a Korean population. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998; 49: 317-323.
41. **Pollina L, Pacini F, Fontanini G, Vignati S, Bevilacqua G, Basolo F.** bcl-2, p53 and proliferating cell nuclear antigen expression is related to the degree of differentiation in thyroid carcinomas. *Br J Cancer* 1996; 73: 139-143.
42. **Santoro M, Carlomagno F, Romano A, Bottaro DP, Dathan NA, Grieco M, et al.** RET/PTC activation in human thyroid carcinomas. *Science* 1995; 267: 381-383.
43. **Takahashi M, Ritz J, Cooper GM.** Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell* 1985; 42: 581-588.
44. **Simpson NE, Kidd KK, Goodfellow PJ, McDermid H, Myers S, Kidd JR, et al.** Assignment of multiple endocrine neoplasia type 2A to chromosome 10 by linkage. *Nature* 1987; 328: 528-530.
45. **Takahashi M, Buma Y, Iwamoto T, Inaguma Y, Ikeda H, Hiai H.** Cloning and expression of the ret proto-oncogene encoding a tyrosine kinase with two potential transmembrane domains. *Oncogene* 1988; 3:571-578.
46. **Ishizaka Y, Itoh F, Tahira T, Ikeda I, Sugimura T, Tucker J, et al.** Human ret proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2. *Oncogene* 1989; 4: 1519-1521.
47. **Yamamoto M, Miki T, Tanaka N, Miya A, Shin E, Karakawa K, et al.** Tight linkage of the ret proto-oncogene with the multiple endocrine neoplasia type 2A locus. *Jpn J Clin Oncol* 1991; 21: 149-152.
48. **Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, et al.** Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993; 363: 458-460.
49. **Mole SE, Mulligan LM, Healey CS, Ponder BA, Tunnacliffe A.** Localisation of the gene for multiple endocrine neoplasia type 2A to a 480 kb region in chromosome band 10q11.2. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 247-252.
50. **Donis-Keller H, Dou S, Chi D, Carlson KM, Toshima K, Lairmore TC, et al.** Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 851-856.
51. **Skinner MA, Moley JA, Dilley WG, Owzar K, Debenedetti MK, Wells SA.** Prophylactic thyroidectomy in multiple endocrine neoplasia type 2A. *N Engl J Med* 2005; 353: 1105-1113.
52. **Machens A, Niccoli-Sire P, Hoegel J, Frank-Raue K, van Vroonhoven TJ, Roehrer HD, et al.** Early malignant progression of hereditary medullary thyroid cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 1517-1525.
53. **American Thyroid Association Guidelines Task Force; Kloos RT, Eng C, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, Gharib H, et al.** Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid* 2009; 19: 565-612.

Address for correspondence:

Д-р Мария Митева

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

Dr Maria Miteva

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

ThyPRO-39bg: Лингвистично валидиране на специфичния за тиреоидни заболявания въпросник за качество на живот ThyPRO-39

Геренова, Жулиета Б.¹, Watt Torquil², Диманова, Боряна Д.³

¹ Клиника по Ендокринология и болести на обмяната,

УМБАЛ „Проф. д-р Ст. Киркович“, Тракийски Университет, Стара Загора, България,

² Катедра по медицинска ендокринология, Университет Копенхаген,

Болница Ringhospitalet, Копенхаген, Дания,

³ Катедра по психология и чужди езици, Медицински Университет,

Тракийски Университет, Стара Загора, България

Адрес за кореспонденция:

Проф. д-р Жулиета Геренова, гм

Клиника по ендокринология и болести на обмяната

УМБАЛ „Проф. Киркович“ ул. „Столетов“ 2, Стара Загора

Резюме

Увод: В клиничната практика от нарастващо значение е оценката на качеството на живот на пациенти с различни заболявания, както и на ефекта от провежданото лечение върху различни аспекти от здравния статус, ежедневния и социалния живот на хората. Използват се въпросници, отчитащи качеството на живот при хора с различни хронични заболявания, каквито са например SF-36 и EQ-5D, но все по-голям интерес представляват въпросници, свързани със специфичните характеристики на конкретното заболяване.

Целта на настоящето изследване е да се преведе и лингвистично валидира на български език, на въпросника ThyPRO-39.

Материал и методи ThyPRO е специфичен за пациентите с тиреоидни заболявания въпросник за качество на живот. Неговата кратка версия - ThyPRO-39 е от особен интерес, тъй като освен че е специфичен за пациенти с доброкачествени тиреоидни заболявания, той също така е бърз и лесен за приложение.

Резултати Извършено е лингвистично валидиране на въпросника ThyPRO-39 на български език според утвърдените правила.

Заключение: Препоръчваме широкото приложение на ThyPRO-39bg сред българските пациенти с доброкачествени тиреоидни заболявания, което би дало по-задълбочена оценка за възможните нарушения на качеството на живот и повлияването им от прилаганата терапия.

Ключови думи: доброкачествени тиреоидни заболявания, качество на живот, въпросник.

Увод

Оценката на качеството на живот свързано със здравето (КЖСЗ) представлява опит да се определи как променливите в обхвата на здравния статус на човека (например заболяването или неговото лечение) се отнасят до конкретни измерения на живота, които са важни за хората като цяло (общо КЖСЗ) или за хората, които имат специфично заболяване (специфично за заболяването КЖСЗ). Повечето схващания за КЖСЗ подчертават ефектите на болестта

върху физическото, социалното, психологично/емоционално и когнитивно функциониране на индивида (1). Специфичните въпросници за измерване на качеството на живот се считат за по-чувствителни от общите (2).

Доброкачествените тиреоидни заболявания и захарният диабет (ЗД) са чести ендокринни заболявания, които засягат голям брой пациенти по света. Наличието на доброкачествени заболявания на щитовидната жлеза засяга в много аспекти общото КЖСЗ на пациентите (3, 4). Изучаването на качеството на живот при пациентите със ЗД в България даде информация за

специфичните нужди на хората и подобри медицинските грижи за тях (5, 6), но за пациентите с тиреоидни заболявания в България, нямаме специфичен въпросник. В научните изследвания са използвани различни инструменти за оценка на промените в КЖСЗ, но понастоящем 85-точковият тиреоид-специфичен въпросник (ThyPRO) е най-широко използваният от изследователите (7). От тази гледна точка, ThyPRO се препоръчва за оценка на КЖСЗ при пациентите с доброкачествени тиреоидни заболявания (8). Поради това, че тази версия е малко по-дълга, от създателите му бе разработена кратка версия ThyPRO-39, но със запазени добри свойства за измерване на качеството на живот (9). ThyPRO и неговата кратка версия ThyPRO-39 днес са преведени на повече от 15 езика и са с доказана добра валидност при различните култури и етноси, следователно възможност да се употребява от хора, живеещи в различни страни (10).

Цел на настоящето изследване е да се преведе и лингвистично валидира на български език въпросникът ThyPRO-39.

Материал и методи

Приложена е стандартната методика за превод на въпросници, свързани със състоянието на пациентите и качеството им на живот (КЖ), одобрена и препоръчана от Световната здравна организация. Получено бе съгласието на създателя на въпросника за превода.

Процедурата включваше:

Преводач с роден български език и свободно говорещ английски език преведе въпросника от английски на български език (първа българска версия). Друг преводач, също с роден български език и свободно говорещ английски език, независимо от първия, преведе въпросника от английски на български език (втора българска версия). Дватама преводачи сравниха своите версии и съгласуваха обща версия (консенсусна българска версия). След това, трети преводач с роден английски език и свободно говорещ български език, бе помолен обратно да преведе българската версия на английски език (обратно преведена версия).

Тази обратно преведена версия бе прегледана неколккратно съвместно от езиков консултант в страната, познаващ добре областта на превода (BD), създателят на въпросника ThyPRO-39 (TW) и български ендокринолог (JG). Бяха направени допълнителни корекции, с цел достигане на пълна идентичност между българския текст и смисъла на въпроса, създаден от автора.

След формирането му, въпросникът ThyPRO-39bg бе тестван сред пет пациента с доброкачествени тиреоидни заболявания с когнитивни интервюиращи методики. Допълнителни

промени във формулировките бяха направени, когато бе необходимо (само една фраза бе променена като текст, за оптимизиране на разбираемостта).

Всички тези етапи на процедурата са стриктно документирани.

Резултати:

ThyPRO-39 бе преведен и валидиран на български език, съгласно стандартната методология за превод на въпросници, свързани със състоянието на пациентите и качеството им на живот.

ThyPRO-39 се състои от 39 въпроса, обобщени в 13 скали измерващи различни аспекти на КЖ, отнасящи се за пациенти с тиреоидни заболявания. Те включват области от физикалните, умствени и социални аспекти на функционирането и благополучието на организма при хипотиреоидизъм, хипертиреоидизъм, нетоксична гуша и тиреоид-асоциирана офталмопатия. Дванадесетте обобщаващи и едната с единствен въпрос скали са: скала за симптоми при наличие на гуша, скала за симптоми при хипертиреоидизъм, скала за симптоми при хипотиреоидизъм, скала за очни симптоми, скала за симптоми за умора, скала за наличие на когнитивни нарушения, скала за наличие на тревожност, скала за депресивност, скала за оценка на емоционалната чувствителност, скала за наличие на нарушения в социалния живот, скала за наличие на нарушения в ежедневието, скала оценяваща наличие на козметични оплаквания и скала за качеството на живот като цяло. Въпросите се позовават на спомените на пациента за период от 4 седмици.

Всеки въпрос е оценяван от пациента по 5 точковата скала на Likert (0-4; 0 – изобщо не; 1 - малко; 2 – в известна степен; 3 – доста; 4 – много/напълно). Всяка скала варира от 0 до 100 (средната стойност от точките за скалата *25), като по-високият брой точки показва по-лош здравен статус.

Времето необходимо за попълване на въпросника е около 5 минути.

За специфичните въпроси, моля вижте *целия ThyPRO-39bg въпросник – българска версия (S1Appendix)*.

В заключение

ThyPRO-39bg е разбираем и добре приет от пациентите въпросник, лесен за клинична употреба. ThyPRO-39bg осигурява възможност за измерване на специфичните нарушения в качеството на живот, причинени от тиреоидните заболявания при българските пациенти. Ние препоръчваме употребата на ThyPRO-39bg за оценка на качеството на живот на българските пациенти с доброкачествени заболявания на щитовидната жлеза.

Въпросник за качеството на живот за пациенти със заболявания на щитовидната жлеза

ThyPRO39bg

*Настоящият въпросник
касае начините, по които
заболяването на щитовид-
ната жлеза е оказало влия-
ние на живота ви.*

**Моля, отговорете на всеки
въпрос като маркирате в
отговора, който най-пълно
отразява вашето мнение.
Ако не сте сигурни как да
отговорите, моля, опитай-
те да дадете възможно най-
добрия отговор.**

Copyright ©Torquil Wait, Copenhagen Univesity Hospital Rigshospitalet, Denmark

Въпросник

• Първата част на въпросника е за симптомите, умората, паметта, настроението и здравето.

• Моля основете вашите **отговори на това как най-общо** сте се чувствали през последните 4 седмици.

1. През последните 4 седмици имали ли сте?	изобщо не	малко	в известна степен	доста	много
1a – усещане за пълнота в областта на шията?	<input type="checkbox"/>				
1c – чувство на напрежение в гърлото?	<input type="checkbox"/>				
1h – чувство на дискомфорт при преглъщане?	<input type="checkbox"/>				
1i – треперене на ръцете?	<input type="checkbox"/>				
1m – склонност да се потите много?	<input type="checkbox"/>				
1n – сърцебиене (ускорен сърдечен ритъм)?	<input type="checkbox"/>				
1q – чувствителност към студено?	<input type="checkbox"/>				
1t – разстроен стомах?	<input type="checkbox"/>				
1w – усещане за сухота или „пясък“ в очите?	<input type="checkbox"/>				
1x – нарушение на зрението?	<input type="checkbox"/>				
1bb – голяма чувствителност към светлината?	<input type="checkbox"/>				
1cc – подуване на ръцете или краката?	<input type="checkbox"/>				
1dd – суха кожа?	<input type="checkbox"/>				
1ee – сърбеж на кожата?	<input type="checkbox"/>				

Въпросник

2. Следващите въпроси са за чувството на умора

През последните 4 седмици имали ли сте?

- | | изобщо не | малко | в известна степен | доста | много |
|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 2a – чувство на умора? | <input type="checkbox"/> |
| 2c – проблем с мотивацията за правене на каквото и да е било? | <input type="checkbox"/> |

3. Следващите въпрос е за вашата жизненост

През последните 4 седмици имали ли сте?

- | | изобщо не | малко | в известна степен | доста | много |
|------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 3b – чувство за енергичност? | <input type="checkbox"/> |

4. Следващите въпроси са за паметта и концентрацията

През последните 4 седмици имали ли сте?

- | | изобщо не | малко | в известна степен | доста | много |
|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 4a – трудност при запомняне? | <input type="checkbox"/> |
| 4b – бавно и неясно мислене? | <input type="checkbox"/> |
| 4f – трудности при концентрацията? | <input type="checkbox"/> |

5. Следващите въпроси са за нервност и напрежение

През последните 4 седмици имали ли сте?

- | | изобщо не | малко | в известна степен | доста | много |
|------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 5b – страх и тревожност? | <input type="checkbox"/> |
| 5c – чувство на напрегатост? | <input type="checkbox"/> |
| 5e – чувство на неловкост? | <input type="checkbox"/> |

Copyright ©Torquil Wait, Copenhagen University Hospital Rigshospitalet, Denmark

Въпросник

6. Следващите въпроси са за психологическо благополучие

През последните 4 седмици имали ли сте?

	изобщо не	малко	в известна степен	доста	много
6a – чувство за тъга?	<input type="checkbox"/>				
6e – чувство за нещастие?	<input type="checkbox"/>				
6g – чувство за самоувереност?	<input type="checkbox"/>				

7. Следващите въпроси са за затруднения в овладяване или промяна на настроението

През последните 4 седмици имали ли сте?

	изобщо не	малко	в известна степен	доста	много
7c – впечатление, че лесно се стресирате?	<input type="checkbox"/>				
7d – промени в настроението?	<input type="checkbox"/>				
7b – чувство, че контролирате живота си?	<input type="checkbox"/>				

• Останалите въпроси са за това как вашето заболяване на щитовидната жлеза може да е въздействало върху различни страни на живота ви.

8. Следващите въпроси са за взаимоотношенията с другите хора

През последните 4 седмици заболяването на щитовидната ви жлеза било ли е причина да:

	изобщо не	малко	в известна степен	доста	много
8a – имате затруднения, когато сте с други хора (например съпруг/а, деца, приятел/приятелка, приятели или други)?	<input type="checkbox"/>				
8b – сте се чувствали в тежест на околните?	<input type="checkbox"/>				
8c – да сте имали конфликти с други хора?	<input type="checkbox"/>				

Въпросник

9. Следващите въпроси са за ежедневните ви дейности

През последните 4 седмици заболяването на щитовидната ви жлеза ставало ли е причина да:

- | | изобщо не | малко | в известна степен | доста | много |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 9a – имате затруднения в управлението на ежедневния ви живот? | <input type="checkbox"/> |
| 9c – не сте в състояние да участвате в живота около вас? | <input type="checkbox"/> |
| 9e – чувствате, че всичко, което правите ви отнема повече време? | <input type="checkbox"/> |

11. Заболяванията на щитовидната жлеза (тяхното лечение) може да окажат въздействие върху външния ви вид (например да причини подуване на шията, подуване на лицето, ръцете или краката, промяна в теглото или очите)

През последните 4 седмици,

- | | изобщо не | малко | в известна степен | доста | много |
|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 11a – заболяването на щитовидната ви жлеза оказало ли е въздействие върху вашия външен вид (например подуване на шията, промяна в очите и теглото)? | <input type="checkbox"/> |
| 11d – притеснявал ли ви е начинът, по който ви гледат околните? | <input type="checkbox"/> |
| 11c – заболяването на щитовидната ви жлеза оказало ли въздействие върху избора ви на грехи? | <input type="checkbox"/> |

12. Последният въпрос е за степента, в която заболяването на щитовидната ви жлеза е оказало влияние върху целия ви живот през последните 4 седмици

През последните 4 седмици,

- | | изобщо не | малко | в известна степен | доста | много |
|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 12 – заболяването на щитовидната ви жлеза оказало ли отрицателно влияние върху качеството на живота ви? | <input type="checkbox"/> |

Моля, върнете се в началото, за да се уверите, че сте отговорили на всички въпроси.

Благодарим ви за помощта, която ни оказахте, като попълнихте този въпросник!

ThyPRO - 39bg: Translation and Validation in Bulgarian of Thyroid-specific Quality of Life Questionnaire ThyPRO - 39

Geranova, Julieta B.¹, Watt Torquil², Dimanova, Boryana D.³

¹ Department of Endocrinology and Metabolic Diseases, University Hospital, Medical Faculty, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria,

² Department of Medical Endocrinology, Copenhagen University, Hospital Ringhospitalet, Copenhagen, Denmark,

³ Department of Psychology and Foreign Language, Medical Faculty, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria

Address for correspondence:

Prof. Julieta Geranova, MD, PhD

Department of Endocrinology and Metabolic Diseases, University Hospital „Prof. Kirkovich“, Medical Faculty, Trakia University, 2, Stoletov street, Stara Zagora, Bulgaria e-mail: jgeranova@mf.uni-sz.bg

Abstract

Introduction: It is very important in clinical work to evaluate the quality of life of patients with various diseases, as well as the influence of medical treatment on various aspects of health status and the daily and social life of the patients. The questionnaires used, such as SF-36 and EQ-5D, reflect the quality of life of people with various chronic diseases but of more interest are the questionnaires related to the specific characteristics of the particular disease.

Material and methods: For patients with thyroid diseases such a questionnaire is ThyPRO (Thyroid - Specific Patient Reported Outcome). For us, its short form – ThyPRO-39 is of particular interest, because besides being specific for patients with benign thyroid diseases, it is also short and easy to use.

Aim: The aim of current study was the translation and the validation in the Bulgarian language of the ThyPRO-39 questionnaire.

Results: A linguistic validation of the questionnaire ThyPRO-39bg was prepared in the Bulgarian language according to the established rules.

Conclusion: We recommend the wide use of ThyPRO-39bg among Bulgarian patients with benign thyroid diseases, which would then allow a more thorough evaluation of the possible disturbances to their quality of life and the influence of the applied therapy.

Key words: benign thyroid diseases, quality of life, questionnaire.

Introduction

The assessment of health related quality of life (HRQL) represents an attempt to determine how variables within the dimension of health (e.g., a disease or its treatment) relate to particular dimensions of life to be important to people in general (generic HRQL) or to people who have a specific disease (condition-specific HRQL). Most conceptualizations of HRQL emphasize the effects of disease on physical, social/ role, psychological/emotional, and cognitive functioning (1). Specific questionnaires for measuring the quality of life are considered to be more sensitive than general ones (2).

Benign thyroid diseases and diabetes mellitus are frequent endocrine diseases and affect a great number

of patients worldwide. The presence of benign thyroid diseases affects in many aspects the generic HRQL of patients (3, 4). The study of quality of life among patients with diabetes mellitus in Bulgaria provides information on the specific needs of people and to improve medical care for them (5, 6). However, for patients with thyroid diseases in Bulgaria we do not have a specific questionnaire. Different instruments are used in studies to assess the changes in HRQL, but the 85-item thyroid-specific patient reported outcome measure (ThyPRO) nowadays is the most extensively evaluated questionnaire (7). In this view ThyPRO is recommended for the assessment of HRQL in patients with benign thyroid diseases (8). But this version is rather long and a shortened version ThyPRO-39 was developed with conserved good measurement

properties (9). ThyPRO and its short version ThyPRO - 39 have now been translated into more than 15 languages and has been proven to demonstrate good cross-cultural validity, thus allowing the possibility to be used by patients living in different countries (10). The aim of current study was the translation and the validation in the Bulgarian language of the ThyPRO-39 questionnaire.

Material and methods:

The standard methodology for translation of patient-reported outcomes approved and recommended from World Health Organisation was applied. The developer of the questionnaire gave consent for translation.

The procedure was as follows:

A translator native in Bulgarian and fluent in English translated the ThyPRO - 39 from English to Bulgarian (forward translation 1). Another, independent translator native in Bulgarian and fluent in English translated the ThyPRO - 39 from English to Bulgarian (forward translation 2). The two translators compared their versions and agreed on a common version (consensus Bulgarian version). Then a third translator native in English and fluent in Bulgarian was asked to back - translate the Bulgarian version to English (back-translated version).

This back-translated version was reviewed by an in-country consultant (BD) and the developer of ThyPRO-39 (TW) in collaboration with the Bulgarian endocrinologist (JG). Additional revisions were made in order to reach absolute parity between the Bulgarian text and the meaning of questions created by the author. After formation the version of ThyPRO -39bg was tested among five patients with thyroid benign diseases with cognitive interview techniques and additional changes in wordings were made, when necessary. Only one phrase was changed as text to optimize comprehensibility.

All these steps of procedure are strictly documented.

Conclusion:

ThyPRO - 39bg (short version) is a questionnaire well perceived and accepted by the patients and easy for clinical use. ThyPRO - 39bg provides the possibility to measure patient-related outcomes regarding thyroid specific quality of life in Bulgarian patients. We recommend the use of ThyPRO - 39bg for the evaluation of quality of life in Bulgarian patients with benign thyroid diseases.

Results:

ThyPRO-39 was translated and validated in Bulgarian according to the standard methodology for translation of patient-related outcomes.

ThyPRO 39 consists of 39 questions summarized in 13 scales measuring aspects of quality of life (QoL) relevant to thyroid patients including physical, mental and social domains of functioning and wellbeing in hypothyroidism, hyperthyroidism, non-toxic goiter, and thyroid associated ophthalmopathy. The 12 multi-item and one single-item scales are: Goitre symptoms scale; Hyperthyroid symptoms scale; Hypothyroid symptoms scale; Eye symptoms scale; Tiredness scale; Cognitive problems scale; Anxiety scale; Depression scale; Emotional Susceptibility scale; Impaired Social life scale; Impaired Daily life scale; Cosmetic Complaints scale; Overall QoL. The items employ a recall period of four weeks. Each question is rated by the patient on a five-point Likert scale (0 - 4; 0 - not at all; 1 - a little; 2 - some; 3 - quite a bit; 4 - very much/completely). Each scale ranges 0-100 (item mean * 25), with higher scores indicating poorer health status.

The time required for completing the questionnaire was about 5 minutes.

For specific items, please see the entire ThyPRO - 39bg questionnaire (S1Appendix).

References

1. Ware JE. The status of health assessment. *An Rev Pub Health* 1995; 16: 327-335.
2. Dowie J. Decision validity should determine whether a generic or condition-specific HRQOL measure is used in health care decisions. *Health Econ* 2002; 11(1):1-8.
3. Winther KH, Cramon P, Watt T, Bjorner JB, Ekholm O, Feldt-Rasmussen U, et al. Disease-specific as well as generic quality of life is widely impacted in autoimmune hypothyroidism and improves during the first six months of levothyroxine therapy. *PLoS ONE* 2016; 11(6): e0156925. doi:10.1371/journal.pone.0156925
4. Gerenova J, Petrov D. Assessment of health related quality of life in patients with thyroid diseases. *Trakia J Sci* 2015; 13(4): 29-32.
5. Tankova T, Dakovska G, Koev D. Education and quality of life in diabetic patients. *Patient Educ Couns* 2004; 53(3), 285-290.
6. Lefterova BA, Lefterov GE, Dimitrova DD. Diabetes dependent quality of life. *Endocrinologia* 2016; XXI (1): 34-44.
7. Watt T, Hegedus L, Groenvold M, Bjorner JB, Rasmussen AK, Bonnema SJ, et al. Validity and reliability of the novel thyroid-specific quality of life questionnaire, ThyPRO. *Eur J Endocrinol* 2010; 162(1):161-167.
8. Wong CK, Lang BH, Lam CL. A systematic review of quality of thyroid-specific health-related quality-of-life instruments recommends ThyPRO for patients with benign thyroid diseases. *J Clin Epidemiol* 2016; 78: 63-72.
9. Watt T, Bjorner JB, Groenvold M, Cramon P, Winther KH, Hegedus L, et al. Development of a short version of the thyroid-related patient-reported outcome ThyPRO. *Thyroid* 2015; 25(10): 1069-1079.
10. Watt T, Barbesino G, Bjorner JB, Bonnema SJ, Bukvic B, Drummond R, et al. Cross-cultural validity of the thyroid-specific quality-of-life patient-reported outcome measure, ThyPRO. *Qual Life Res* 2015; 24(3):769-780.

Честота и диагностична стойност на антителата към цинков транспортер 8 (ZnT8) в българска популация пациенти със захарен диабет тип 1

Грозева, Грета Г., Чакърова, Невена Я., Димова, Румяна Б., Танкова, Цветалина Ив., Атанасова, Илияна Б.

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

Адрес за кореспонденция:

Д-р Невена Чакърова, дм

Клиничен Център по Ендокринология, Медицински Университет, София

1431 София, ул. Здраве №2

e-mail: veni_chakarova@abv.bg

Резюме

В последните години в диагнозата на захарен диабет тип 1 се утвърди нов имунологичен маркер – антитяло към цинков транспортер 8 (ZnT8-Ab).

Целта на изследването е да се определят честотата и диагностичната стойност на антителата към ZnT8 в българска популация пациенти със захарен диабет тип 1.

Материал и методи: Изследвани са 70 лица (40 мъже и 30 жени), на средна възраст $37,24 \pm 11,08$ години, среден ИТМ $23,46 \pm 4,49$ кг/м², с давност на заболяването до 5 години, като при 47% захарният диабет е новооткрит или с давност под 1 година. Изследвани са антитела към бета-клетъчни структури – антитела към геркабоксилазата на глутаминовата киселина (GAD 65-Ab), антитела към тирозин фосфатаза (IA 2-Ab) и антитела към цинков транспортер 8 (ZnT8-Ab).

Резултати: При 85,7% от участниците се установяват едно или повече от изследваните антитела. Антителата към ZnT8 са втори по честота – установяват се при 45,7% от изследваните, като се нареждат след GAD 65-Ab – 77,1% и преди IA 2-Ab – 34,3%. Негативни и към трите антитела са 14,3% от изследваните. Позитивни само с ZnT8-Ab са 2,9%, което съставлява 16,6% от случаите на идиопатичен захарен диабет. В подгрупата с новооткрит захарен диабет и диабет с давност под 1 година процентът на антитялопозитивност към ZnT8 е сигнификантно по-висок – 63,6%, ($p=0,04$). Изследването на класическата комбинация GAD 65-Ab + IA-2-Ab води до идентифициране на 83% от случаите на захарен диабет тип 1 ($F=[2,3]$ 43,4, $p<0,001$, $r=0,462$). Използването на ZnT8-Ab вместо IA 2-Ab като втори имунологичен маркер идентифицира по-висок процент от случаите – 87% ($F=[2,3]$ 46,6, $p<0,001$, $r=0,486$), а комбинацията от трите антитела диагностицира 92% от случаите на захарен диабет тип 1. ($F=[3,3]$ 50,7, $p=0,043$, $r=0,515$).

Изводи: ZnT8-Ab е второто по честота антитяло при възрастните пациенти с аутоимунен захарен диабет и второ по диагностична значимост след GAD 65-Ab. Изследването на ZnT8-Ab в допълнение към GAD 65-Ab и IA-2-Ab води до редуциране на случаите на идиопатичен захарен диабет тип 1, а въвеждането им като втори имунологичен маркер към GAD 65-Ab превъзхожда утвърдената комбинация GAD 65-Ab + IA 2-Ab.

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

Увод

Захарен диабет тип 1 е класически модел на аутоимунно заболяване. В серума на пациенти със заболяването се доказват антитела към структури на β -клетката на панкреаса. Утвърдените имунологични маркери, които се използват в клиничната практика с диагностична цел, включват три антитела – антитела към декарбоксилазата на глутаминовата киселина (GAD 65-Ab), антитела към тирозин фосфатаза (IA 2-Ab) и антиинсулинови антитела (IAA), като последните имат приложение основно в детската възраст. Наличие на поне едно от тези антитела се установява в около 80-85% от новодиагностицираните случаи със захарен диабет тип 1. В останалите 15-20% от случаите липсват антитела и диабетът се означава като идиопатичен захарен диабет тип 1 (1). Последният също се характеризира с абсолютен инсулинов дефицит и β -клетъчна деструкция, но механизмите, по които се развива, не са достатъчно изяснени. Една от хипотезите е, че при тези пациенти също е налице аутоимунен процес с наличие на антителата, които са насочени към все още неидентифицирани аутоантигени (2). Поради това продължава търсенето на нови аутоантигени, свързани с развитието на захарен диабет тип 1.

През последните години сред множество други кандидати гени бе селектиран нов имунологичен маркер - цинков транспортер 8 (ZnT8), който представлява специфична за β -клетката структура и съответно аутоантиген (3,4). Изследването на антителата към ZnT8 (ZnT 8-Ab) понастоящем се утвърди и навлезе в практиката като четвърти имунологичен маркер в панела за диагноза на захарен диабет тип 1, а при възрастната популация пациенти класическата комбинация от GAD 65-Ab + IA 2-Ab се допълва с ZnT8-Ab.

В България изследването на ZnT 8-Ab навлезе в клиничната практика през последните около две години и към момента липсват данни за честотата и диагностичната стойност на този нов имунологичен маркер за българската популация пациенти със захарен диабет тип 1.

Цел

Да се определи честотата и диагностичната стойност на антителата към ZnT8 в българска популация пациенти със захарен диабет тип 1 с давност на заболяването до 5 години.

Материали и методи

В периода м. декември 2014 г. – м. септември 2016г. са набрани 70 лица със захарен диабет тип 1 с давност на заболяването до 5 години. Всички изследвани лица са пациенти на Клиника по Диабетология, УСБАЛЕ „Акад. Иван Пенчев“, хоспитализирани за диагностично и терапевтично уточняване в посочения период. Участниците са получили пълна информация от изследвателите за същността и целта на изследването и са подписали информирано съгласие за участие. На всеки участник е снета пълна анамнеза и физикален статус. Взети се серумни проби за изследване на имунологични маркери, които са съхранявани при температура -60°C . В събраните проби са изследвани имунологични маркери за аутоимунитет към β -клетката на панкреаса – GAD 65-Ab, IA 2-Ab и ZnT8-Ab.

Изследванията са осъществени в Лаборатория по Имунология, УСБАЛЕ „Акад. Иван Пенчев“. Всички имунологични маркери са изследвани с количествен имуоензимен анализ ELISA. Идиопатичен захарен диабет тип 1 е приет при пациенти с негативни антитела и при допълнително проведен тест за изследване на стимулирана инсулинова секреция – венозен глюкозотолерансен тест с изследване на имунореактивен инсулин или глюкозагонен тест с изследване на C-пептид, обективизиращи наличие на инсулинопения.

Статистическата обработка на данните е осъществена със статистически пакет SPSS версия 21, като е приложен дескриптивен анализ, chi-square test и логистичен регресионен анализ – stepwise forward метод. За статистически достоверна е приета стойност на $p < 0,05$ (2-sided) при използване на Fisher's exact test.

Резултати

• **Характеристики на изследваната група**

В изследването участват 70 лица (40 мъже и 30 жени), на средна възраст $37,24 \pm 11,08$ г. и среден ИТМ $23,46 \pm 4,49$ kg/m^2 . Давността на заболяването е до 5 години, като при 33 от участниците (47%) захарният диабет е новооткрит или с давност под 1 година.

• **Антитяло позитивност**

При 85,7% от участниците в изследваната група се установяват едно или повече от изследваните антитела. Процентът на позитивност за всяко от трите антитела е както следва – GAD 65-Ab – 77,1%, ZnT8-Ab – 45,7% и IA 2-Ab – 34,3% (Фиг.1).

Позитивни и за трите антитела са 27,1% от участниците, а негативни и към трите антитела са 14,3%. Антитела към ZnT8 се установя-

Таблица 1.

Диагностична стойност на имунологичните маркери и на комбинираното им изследване

Изследвани антитела	GAD 65	GAD 65 + IA 2	GAD 65 + ZnT 8	GAD 65 + ZnT8 + IA 2
% идентифицирани случаи на захарен диабет тип 1	72	83	87	92

ват при 16,6% от случаите на идиопатичен захарен диабет, определени като такива на базата на изследването на GAD 65-Ab и IA 2-Ab.

Позитивни с комбинация от две антитела са 21,5% от участниците – 14,3% са с позитивни GAD 65-Ab + ZnT8-Ab, 4,3% с GAD 65-Ab + IA-2-Ab и 2,9% са с комбинацията IA 2-Ab + ZnT8-Ab.

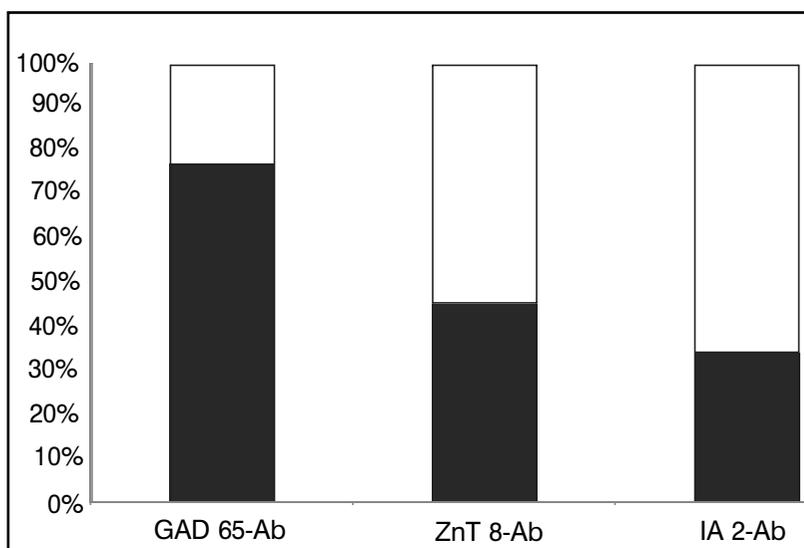
Позитивни само с едно антитяло са 37,2% от участниците, от които 32,9% са само с GAD 65-Ab, 2,9% – само с ZnT8-Ab и 1,4% само с IA-2-Ab.

• Антитела в подгрупата с новооткрит захарен диабет и диабет с давност под 1 година

Допълнително е проведен субанализ на антитялопозитивността в подгрупата с новооткрит захарен диабет и диабет с давност под 1 година. Получените резултати показват сигнификантно по-висок процент на антитялопозитивност към ZnT8 – 63,6%, в тази подгрупа спрямо останалата част от пациентите с давност на заболяването над 1 и под 5 години ($p=0,04$). Вероятността за наличие на положителни антитела към ZnT8 в тази подгрупа е 4,5 пъти по-голяма спрямо тази при останалите пациенти – OR 4,5 (95% CI 1,6-12,5). Процентът на позитивност при анализ на останалите антитела също е по-висок без разликата да достига статистическа значимост – с позитивни GAD 65-Ab са 78,8 % ($p=0,7$), а с позитивни IA 2-Ab – 45,5% ($p=0,07$).

Фигура 1.

Честота на трите антитела в изследваната група – антитела към декарбоксилазата на глутаминовата киселина (GAD 65-Ab), антитела към тирозин фосфатаза (IA 2-Ab) и антитела към цинков транспортер 8 (ZnT8-Ab).



• Диагностична стойност на имунологичните маркери и комбинираното им изследване

Изследването на GAD 65-Ab диагностицира 72% от пациентите със захарен диабет тип 1 ($F=[1,3]$ 36,2, $p<0,001$, $r=0,404$). Добавянето на IA 2-Ab като втори имунологичен маркер увеличава този процент на 83% ($F=[2,3]$ 43,4, $p<0,001$, $r=0,462$), а използването на ZnT8-Ab вместо IA 2-Ab като втори имунологичен маркер, води до идентифициране на 87% от случаите ($F=[2,3]$ 46,6, $p<0,001$, $r=0,486$). Комбинацията от трите антитела идентифицира 92% от случаите на захарен диабет тип 1. ($F=[3,3]$ 50,7, $p=0,043$, $r=0,515$) (Табл.1).

Обсъждане

В голяма степен получените в настоящото изследване резултати съответстват на публикуваните в литературата и са в подкрепа на ролята на антителата към ZnT8 като важен и независим диагностичен маркер.

В настоящото изследване честотата на антитялопозитивност към ZnT8 е относително висока – ZnT8-Ab се установяват при почти половината от изследваните – 45,7%, и при повече от половината от тези с давност на захарния диабет под 1 година – 63,6%, което напълно отговаря на известните данни. По първоначални

данни в литературата антитета към ZnT8 се установяват в 60-80% от пациентите с новооткрит захарен диабет тип 1 в зависимост от възрастта (5). Освен от възрастта на изява, известните до момента данни предполагат и съществуването на расови различия в антитялопозитивността към ZnT8. Най-висока честота на антитела към ZnT8 е докладвана за Кавказката раса, към която се причислява и нашата популация, а най-ниска е установена в изследвания при азиатци (4,6,7). Wenzlau и колектив, които са откривателите на ZnT8 като автоантиген, съобщават за наличие на антитела към ZnT8 в Кавказка популация с новооткрит захарен диабет тип 1 в 63% от случаите при наличие на останалите антитела както следва – IA-2-Ab - 72%, GAD 65-Ab - 68% и антинулинови (IAA-Ab) – 55% (4). Посоченият резултат за ZnT8-Ab е сходен с получения в настоящото изследване, а основната разлика е в честотата на антителата към IA-2, които в нашето изследване се нареждат на трето място след GAD 65-Ab и ZnT8-Ab. Получените от нас резултати са сходни с тези на Shivarasad и колектив при индийска популация със захарен диабет тип 1 с до 4-годишна давност на заболяването, според които ZnT8-Ab е второто по честота антитяло след GAD 65-Ab и се установява в 31,8% от случаите, при честота на GAD 65-Ab - 64,7% и на IA-2-Ab – 19,3%, като при новооткрит захарен диабет честотата на ZnT8-Ab е по-висока и достига 45% (8).

В настоящото проучване допълнителното изследване на антитела към ZnT8 при пациенти над 18-годишна възраст редуцира случаите на идиопатичен захарен диабет тип 1 с 2,9%. Антитела към ZnT8 се установяват при 16,6% от пациентите, които биха били диагностицирани като идиопатичен захарен диабет тип 1 при изследване на стандартната към момента комбинация от GAD 65-Ab и IA 2-Ab. Данните от регресионния анализ показват, че добавянето на ZnT8-Ab към изследването на GAD 65-Ab и IA 2-Ab, води до повишаване на диагностичната чувствителност с 9% – от 83% на 92%. Тези резултати също са в голяма степен съпоставими с известните към момента данни. Wenzlau и колектив, установяват ZnT8-Ab при 26% от пациентите със захарен диабет тип 1, класифицирани като антитялонегативни на базата на изследването на антитела към GAD 65, IA-2, островноклетъчни антитела и инсулинови антитела, което редуцира случаите на идиопатичен захарен диабет тип 1 с 4% (4,5). Според данни на Yang и колектив антитела към ZnT8 се установяват в 13,5% от пациентите с негативни IA-2-Ab и GAD

65-Ab, които също биха били класифицирани като идиопатичен захарен диабет тип 1 (7). Andersson и колектив в шведска популация деца със захарен диабет тип 1 установяват позитивност само към ZnT8-Ab в 3,4% от изследваните, като допълнителното изследване на ZnT8-Ab повишава диагностичната чувствителност до 93% (9,10).

Освен, че повишава диагностичната чувствителност като трети имунологичен маркер, може би с най-съществено значение за практиката е фактът, че според получените в настоящото изследване резултати за българска популация пациенти с изява на захарен диабет тип 1 над 18-годишна възраст и давност на заболяването до 5 години, изследването на антителата към ZnT8 показва по-висока диагностична стойност от това на IA 2-Ab и въвеждането им като втори имунологичен маркер към GAD 65-Ab идентифицира по-голям процент случаи на захарен диабет тип 1 в сравнение с изследването на класическата към момента комбинация от GAD 65-Ab + IA-2-Ab. Заместването на IA-2-Ab с ZnT8-Ab като втори имунологичен маркер увеличава с 4% диагностицираните случаи на автоимунен захарен диабет тип 1. Този резултат се отличава до известна степен от публикуваните данни на други изследователски колективи. Според Wenzlau и колектив изследването на ZnT8-Ab има най-голяма стойност като четвърти автоимунен маркер в допълнение към утвърдения стандарт GAD 65-Ab, IA-2-Ab и IAA-Ab като повишава диагностичната чувствителност от 94% на 98%, докато заместването на което и да е от трите утвърдени антитела, не променя значимо броя на диагностицираните антитялопозитивни пациенти със захарен диабет тип 1 (4). Според данните на Shivarasad и колектив при индийска популация комбинираното използване на GAD 65-Ab и ZnT8-Ab разпознава до 97% от антитялопозитивните пациенти и може да замести използването на IA-2-Ab като серологичен маркер без загуба на чувствителност и специфичност (8).

По отношение на GAD 65-Ab получените резултати имат предимно потвърдителен характер като доказват водещата роля на този имунологичен маркер в диагнозата на захарен диабет тип 1 при възрастни – най-висока честота на антитялопозитивност, най-дълго персистиране във времето, най-висок процент идентифицирани случаи при самостоятелното използване – 72% от случаите на захарен диабет тип 1.

• Недостатъци и потенциални насоки за бъдещи изследвания

Основен недостатък на настоящото проучване е относително малкият брой изследвани пациенти и крос-секционният дизайн на изследването, които не позволяват да се направи анализ на антитялопозитивността към ZnT8 по възрастни декади на изява на заболяването, както и анализ на динамиката на титъра на ZnT8-Ab във времето.

Данните в литературата посочват най-висока честота на позитивност към ZnT8 в детската и юношеската възраст – пикова честота от около 80% при 16-18 годишните, както и при новодиагностицирани пациенти, и намаляване на антитялопозитивността с напредване на възрастта и давността на заболяването (4,7,11). Едновременно с това, обаче, се посочва, че най-голяма стойност има изследването на антителата към ZnT8 именно при възрастната популация пациенти със захарен диабет, тъй като при тях допълнителното им изследване води до редуциране на случаите с идиопатичен захарен диабет тип 1, докато при деца не повишава диагностичната чувствителност в сравнение с утвърдените маркери (6,11). Постава се и въпросът за потенциалната роля на ZnT8-Ab в диагнозата на захарен диабет тип LADA, което е от особено практическо значение. В настоящото изследване средната възраст на изследваните пациенти е относително ниска – $37,24 \pm 11,08$ г., което вероятно повлиява получения висок процент на позитивност към ZnT8. По литературни данни позитивни за ZnT8-Ab са около 42% от случаите на захарен диабет тип LADA (12). Изследваните в настоящото проучване пациенти са реално такива и полученият процент на позитивност към ZnT8 – 45,7% е сходен с посочения в литературата.

Интерес и обект на бъдещи изследвания би бил анализът на антитялопозитивността към ZnT8 по възрастни декади на изява на заболяването, който вероятно допълнително би очертал субпопулации от пациенти, при които изследването на този маркер би било с по-висока диагностична стойност. Получените в настоящото изследване резултати със сигурност откриват водещо място на изследването на антителата към ZnT8 в посочената популация пациенти – на практика това е вторият по диагностична значимост маркер след GAD 65-Ab. Възможно е при по-възрастни пациенти маркерът да губи от диагностичната си стойност или обратното – значението му да нараства.

Необходим е също така анализ на динамиката на титъра на антителата към ZnT8 във времето, което допълнително би очертало място-

то им в диагнозата на захарния диабет при неуточнени случаи в зависимост от давността на заболяването. По литературни данни титърът на ZnT8-Ab спада бързо след изявата – при пациенти с 20-годишна давност на заболяването антителата се установяват при 6,7%, като динамиката показва слаба корелация с тази на IA-2-Ab (12,13). Получените в настоящото изследване резултати също са в подкрепа на тезата, че титърът на тези антитела намалява бързо след изявата. Единствено за антителата към ZnT8 е налице значима разлика между подгрупата със захарен диабет с давност до 1 година, включително новооткрит захарен диабет и подгрупата с давност между 1 и 5 години – 63,6% спрямо 45,7%, OR 4,5, $p=0,04$. Вероятно, ако изследваната група се състоеше само от новодиагностицирани пациенти, честота на ZnT8-Ab би била още по-висока. Следва да се отбележи, че за антителата към IA 2 разликата е с гранична значимост и вероятно при по-голям брой изследвани също би достигнала статистическа значимост, тъй като за антителата към IA 2 е известно, че титърът им намалява бързо във времето. От практическа гледна точка въпросът за персистенето на антителата във времето е много важен, тъй като би очертал времеви диапазон след изявата на заболяването, в който е оправдано изследването им. При по-голяма давност на заболяването от изследваната в настоящото проучване, вероятно маркерът губи от диагностичната си стойност. В клиничната практика, обаче, сравнително по-рядко се налага ревизиране на диагнозата при над 5-годишна давност на заболяването, така че на базата на настоящите резултати при пациенти с давност на заболяването до 5 години, със сигурност може да се посочи, че в масовия случай изследването на антителата към ZnT8 има висока диагностична стойност.

При наличие на допълнителни данни за честотата на антитялопозитивност по възрастни декади на изява на заболяването и за динамиката на титъра във времето, биха могли да се очертаят и изработят конкретни диагностични алгоритми за изследване на антителата в определени комбинации и последователност, съобразно възрастта на изява и давността на заболяването. Това би имало практическо приложение при ограничени възможности за изследване и на трите диагностични маркера, в каквито условия се работи в нашата страна. В идеални условия обаче, категорично би трябвало да изследват и трите имунологични маркера.

• Потенциални приноси с научен и практически характер

Настоящото изследване представя за първи път данни за антитялопозитивност към ZnT8 в българска популация пациенти със захарен диабет тип 1 с изява на заболяването над 18-годишна възраст и давност до 5 години. Получените резултати имат важно практическо приложение, тъй като отреждат водещо място на антителата към ZnT8 в диагнозата на захарен диабет тип 1 – това е второто по честота антитяло при възрастните пациенти с аутоимунен захарен диабет и второ по диагностична значимост след GAD 65-Ab. Изследването на ZnT8-Ab в допълнение към GAD 65-Ab и IA-2-Ab води до редуциране на случаите на идиопатичен захарен диабет тип 1, а въвеждането им като втори имунологичен маркер към GAD 65-Ab превъзхожда утвърдената комбинация GAD 65-Ab + IA 2-Ab.

Основни изводи

В българска популация пациенти със захарен диабет тип 1 с изява на заболяването над 18-годишна възраст и давност на захарния диабет до 5 години:

- антителата към ZnT8 са важен и независим диагностичен маркер;

- допълнителното изследване на антителата към ZnT8 към утвърдените маркери намалява случаите на идиопатичен захарен диабет тип 1 с 2,9%;

- антителата към ZnT8 са с относително висока честота и са на второ място след тези към GAD 65;

- антителата към ZnT8 са на второ място по диагностична значимост след тези към GAD 65;

- комбинираното изследване на GAD 65-Ab+ZnT8-Ab идентифицира повече случаи на захарен диабет тип 1 в сравнение с утвърденото до момента в практиката изследване на GAD 65-Ab+IA2-Ab

Благодарности

Авторският колектив изказва благодарност на всички колеги от УСБАЛЕ „Акад. Ив. Пенчев“ за оказаната помощ и съдействие в набирането на изследваната популация пациенти, на екипите на Клиника по Диабетология и Лаборатория по Имунология, УСБАЛЕ „Акад. Ив. Пенчев“ за осъществената практическа дейност по изследването.

Настоящото проучване е финансирано от МУ - София, Договор №85/2015г.

Prevalence and Diagnostic Value of Zinc Transporter 8 (ZnT8) Antibodies in Bulgarian Population with Type 1 Diabetes

Grozeva, Greta G., Chakarova, Nevena Y., Dimova, Rumyana B., Tankova, Tsvetalina Iv., Atanassova, Iliana B.

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

Address for correspondence:

Nevena Chakarova, MD, PhD

Clinical Center of Endocrinology, Medical University, Sofia

2 Zdrave Str., 1431 Sofia, Bulgaria

e-mail; veni_chakarova@abv.bg

Abstract

A new immunologic marker – antibody to zinc transporter 8 (ZnT8-Ab), has been established in the diagnosis of type 1 diabetes in recent years.

The aim of the study is to investigate the prevalence and diagnostic value of ZnT8-Ab in a Bulgarian population of type 1 diabetes patients.

Material and methods: 70 patients (40 males and 30 females), of mean age $37,24 \pm 11,08$ years and mean BMI $23,46 \pm 4,49$ kg/m², of up to 5 years duration of the disease (in 47% of the patients diabetes being newly-diagnosed or of less than a year duration), were investigated.

Antibodies to beta-cell structures, antibodies to glutamic acid decarboxylase, GAD 65-Ab, antibodies to tyrosin phosphatase and IA 2-Ab and ZnT8-Ab were assessed.

Results: One or more of the investigated antibodies were detected in 85,7% of the participants, ZnT8-Ab being the second most prevalent – in 45,7% of the group, following GAD 65-Ab – 77,1% and exceeding the prevalence of IA-2-Ab – 34,3%. 14,3% of the participants were triple negative. 2,9% of the participants were positive to ZnT8 which accounts for 16,6% of the cases of idiopathic type 1 diabetes. ZnT8-Ab was significantly more prevalent in the subgroup with newly-diagnosed diabetes and diabetes of less than a year's duration – 63,6%, ($p=0,04$). The assessment of the classical combination GAD 65-Ab + IA-2-Ab identified 83% of type 1 diabetes cases ($F=[2,3]$ 43,4, $p<0,001$, $r=0,462$). The use of ZnT8-Ab instead of IA 2-Ab as a second immunologic marker identified more cases of type 1 diabetes – 87% ($F=[2,3]$ 46,6, $p < 0,001$, $r=0,486$), and the combination of all the three antibodies led to the diagnosis of 92% of the type 1 diabetes cases ($F=[3,3]$ 50,7, $p = 0,043$, $r=0,515$).

Conclusions: In adult patients with autoimmune diabetes ZnT8-Ab is the second most prevalent antibody and the second in diagnostic importance after GAD 65-Ab. The assessment of ZnT8-Ab in addition to GAD 65-Ab and IA 2-Ab reduces the cases of idiopathic type 1 diabetes and the use of ZnT8-Ab as a second immunologic marker in addition to GAD 65-Ab outweighs the established combination of GAD 65-Ab+IA 2-Ab.

Key words: zinc transporter 8, type 1 diabetes, antibodies, beta-cell

Introduction

Diabetes mellitus type 1 is a classical model of autoimmune disease. Antibodies to pancreatic beta-cell structures can be detected in the sera of patients with the disease. The established immunologic mark-

ers used in the clinical practice for diagnostic purposes include three antibodies – glutamic acid decarboxylase antibodies (GAD 65-Ab), tyrosin phosphatase antibodies (IA 2-Ab) and insulin antibodies (IAA), the later being used predominantly in children. The presence of at least one of these antibodies can be detect-

ed in 80-85% of newly-diagnosed type 1 diabetes patients. The remaining 15-20% of cases lack any antibody and are classified as idiopathic type 1 diabetes (1). It is also characterized by absolute insulin deficiency and beta-cell destruction but of unknown mechanisms. One of the hypotheses is that it is also the case of autoimmunity with antibodies to yet unidentified autoantigens (2). For that reason the investigation of new autoantigens involved in type 1 diabetes development continues.

In recent years a new immunologic marker – zinc transporter 8 which is a beta-cell specific structure and therefore autoantigen, was selected amongst multiple candidate autoantigens. (3,4) Assessment of zinc transporter 8 antibodies (ZnT 8-Ab) is now well-established and is used in clinical practice and has become the fourth immunologic marker in the diagnostic panel of type 1 diabetes. In the adult population of type 1 diabetes ZnT 8-Ab assessment is a supplement to the classical to that point diagnostic combination of GAD 65-Ab + IA 2-Ab.

In Bulgaria the assessment of ZnT 8-Ab has become available for the past two years. Up to the present there is no data for the prevalence and diagnostic value of this new immunologic marker for the Bulgarian population of type 1 diabetes patients.

Aim

The aim of the present study is to investigate the prevalence and diagnostic value of ZnT8-Ab in Bulgarian population of type 1 diabetes patients of up to 5 years duration of the disease.

Materials and methods

70 subjects with type 1 diabetes of up to five years duration of the disease were selected during the period December 2014 - September 2016. All enrolled subjects are patients of the Department of Diabetology, University Hospital of Endocrinology „Acad. Ivan Penchev“ and had been hospitalized for diagnostic and therapeutic purposes in the above mentioned period. The participants received complete information from the investigators for the aim of the study and they signed informed consent. A detailed medical history and physical examination were obtained for each participant. Serum samples for assessment of immunologic markers were collected and stored at a temperature of -60° C. Markers of beta-cell autoimmunity – GAD 65-Ab, IA 2-Ab and ZnT8-Ab were assessed in the collected samples.

All of the assays were performed in the Laboratory of Immunology of the University Hospital of Endocrinology „Acad. Ivan. Penchev“. The immuno-

logic markers were measured by a quantitative immunoenzyme assay ELISA. The diagnosis of idiopathic type 1 diabetes was established in antibody negative patients with the additional performance of insulin secretion stimulatory tests – venous glucose tolerance test with assessment of immunoreactive insulin or intravenous test with glucagon with measurement of C-peptide, confirming insulinopenia.

Statistical analysis of data was performed with SPSS vs. 21 applying descriptive analysis, chi-square test and logistic regression – stepwise forward method. A p value of less than 0,05 (2-sided) using Fisher's exact test was considered significant.

Results

• characteristics of the studied group

70 patients (40 males and 30 females) of mean age 37,24 ±11,08 years and mean BMI 23,46±4,49 kg/m², of up to 5 years duration of the disease were enrolled. In 33 of the participants (47%) diabetes was newly-diagnosed or of less than a year's duration.

• antibody positivity

One or more of the investigated antibodies were detected in 85,7% of the participants, the percentage of positivity for each antibody being as follows – GAD 65-Ab – 77,1%, ZnT8-Ab – 45,7% and IA 2-Ab – 34,3%. (Fig.1)

27,1% of the participants were triple positive and 14,3% were triple negative. ZnT8-Ab was detected in 16,6% of the cases of idiopathic type 1 diabetes established on the basis of GAD 65-Ab and IA 2-Ab assessment.

Positive to the combination of two antibodies were 21,5% of the participants of whom 14,3% had GAD 65-Ab + ZnT8-Ab, 4,3% - GAD 65-Ab + IA-2-Ab and 2,9% had IA 2-Ab + ZnT8-Ab combination.

Only 37,2% of the participants were positive to one antibody, of whom 32,9% had GAD 65-Ab only, 2,9% – ZnT 8-Ab only and 1,4% IA 2-Ab only.

• antibodies in the subgroup of newly-diagnosed diabetes and diabetes of less than a year duration

An additional subanalysis of the antibody positivity in the subgroup of newly-diagnosed diabetes and diabetes of less than a year's duration was performed. The results showed a significantly higher percentage of ZnT8-Ab positivity – 63,6% - in this subgroup compared to the rest of the studied group with duration of the disease for more than one and less than five years (p=0,04). The probability of positive ZnT8-Ab in this subgroup was 4,5 times higher than that in the rest of the group – OR 4,5 (95% CI 1,6-12,5). The analysis of the positivity of the rest of the antibodies in this subgroup also showed higher percentages, the difference being insignificant – GAD 65-Ab positive were 78,8 % (p=0,7) and IA 2-Ab positive were 45,5 % (p=0,07).

Table 1.

Diagnostic value of the immunological markers and their combined assessment

Assessed antibodies	GAD 65	GAD 65 + IA 2	GAD 65 + ZnT 8	GAD 65 + ZnT8 + IA 2
% identified cases of type 1 diabetes	72	83	87	92

• diagnostic value of the immunologic markers and their combined assessment

The assessment of GAD 65-Ab diagnosed 72% of type 1 diabetes patients (F=[1,3] 36,2, p<0,001, r=0.404). The addition of IA 2-Ab as a second immunologic marker increased this percentage up to 83% (F=[2,3] 43,4, p<0,001, r=0,462), while the use of ZnT8-Ab instead of IA 2-Ab as a second marker led to the identification of 87% of the cases (F=[2,3] 46,6, p<0,001, r=0,486). The combination of all the three antibodies identified 92% of type 1 diabetes cases (F=[3,3] 50,7, p = 0,043, r=0,515) (Table 1).

Discussion

The results of the present study are highly consistent with the published data and support the role of ZnT8-Ab as a significant and independent diagnostic marker.

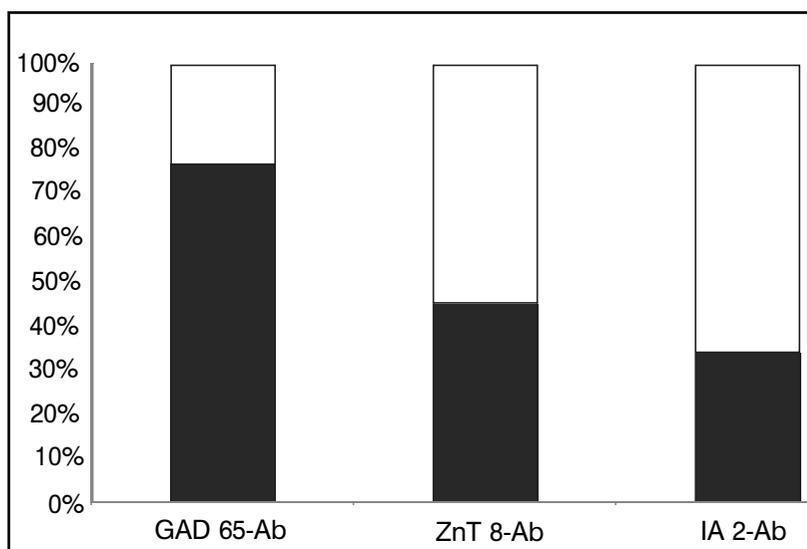
The prevalence of ZnT8-Ab positivity in the present study is relatively high- ZnT8-Ab was detected in almost half of the studied patients - 45,7%, and in more than a half of those with diabetes of less than a year duration - 63,6%, which matches exactly the published data. According to the initial data ZnT8-Ab can be detected in 60-80% of the newly diagnosed type 1 diabetes patients depending on the age (5). Despite the dependence of the age of diagnosis on the ZnT8-Ab positivity, the published results assume some racial influence and differences. The highest reported prevalence

of ZnT 8-Ab is in Caucasians, to whom our population belongs, and the lowest one is in Asians (4,6,7). Wenzlau and collaborators who are the discoverers of ZnT8 as an autoantigen report a prevalence of 63% of ZnT8-Ab in newly diagnosed type 1 Caucasians with a prevalence of the other antibodies as follows - IA-2-Ab - 72%, GAD 65-Ab - 68% and IAA - 55% (4). This result for ZnT8-Ab is quite similar to that in the present study, the main difference being in the IA 2-Ab prevalence, which in our study rates third after GAD 65-Ab and ZnT8-Ab. Our results are similar to those of Shivaprasad and collaborators in an Indian population of type 1 diabetes of up to 4 years duration, according to which ZnT8-Ab is the second in prevalence after GAD 65-Ab and can be detected in 31,8% of the cases, with prevalence of GAD 65-Ab of 64,7% and of IA-2-Ab - 19,3% and higher prevalence of ZnT8-Ab in newly-diagnosed population - in up to 45% (8).

In the present study the additional assessment of ZnT 8-Ab in patients above the age of 18 years reduced the cases of idiopathic type 1 diabetes by 2,9%. ZnT8-Ab was detected in 16,6% of the patients who otherwise would be diagnosed as idiopathic type 1 diabetes on the basis of the assessment of the standard at present combination of GAD 65-Ab + IA 2-Ab. The results of the logistic regression demonstrated that the addition of ZnT8-Ab to the assessment of GAD 65-Ab and IA 2-Ab, increased the diagnostic sensitivity by 9% - from 83% to 92%. These results are also in line with the published data. Wenzlau and collaborators

Figure 1.

Prevalence of the three antibodies in the studied group - antibodies to glutamic acid decarboxylase (GAD 65-Ab), antibodies to tyrosin phosphatase (IA 2-Ab) and antibodies to zinc transporter 8 (ZnT8-Ab).



detect ZnT8-Ab in 26% of the antibody negative type 1 patients according to the assessment of GAD 65-Ab, IA 2-Ab, islet cell antibodies and IAA, which reduces the cases of idiopathic type 1 diabetes by 4%. (4,5] According to the results of Yang and collaborators ZnT8-Ab are present in 13,5% of IA-2-Ab and GAD 65-Ab negative patients, who otherwise would also be classified as idiopathic type 1 diabetes (7). Andersson and collaborators in a Swedish population of type 1 diabetes children report positivity only to ZnT8-Ab in 3,4% of the studied patients and an increase of the diagnostic sensitivity of up to 93% by the additional assessment of ZnT8-Ab (9,10).

Despite the increase of the diagnostic sensitivity when added as a third immunologic marker, probably of utmost significance for the clinical practice is the fact that according to the present results for a Bulgarian population of type 1 diabetes patients diagnosed above the age of 18 years and of up to five years duration of the disease, the assessment of ZnT8-Ab performs with higher diagnostic value than IA 2-Ab and their introduction as a second immunologic marker to GAD 65-Ab identifies a higher percentage of type 1 diabetes cases compared to the measurement of the classical at present combination of GAD 65-Ab + IA2-Ab. The replacement of IA-2-Ab with ZnT8-Ab as a second immunologic marker increased the diagnosed cases of type 1 diabetes by 4%. This result is somehow different from the published data. According to Wenzlau and collaborators the assessment of ZnT8-Ab is most valuable as a fourth immunologic marker in addition to the established standard of GAD 65-Ab, IA-2-Ab u IAA and increases the diagnostic sensitivity from 94% to 98%, while the replacement of any of the three established antibodies, does not affect significantly the number of the diagnosed autoantibody positive patients with type 1 diabetes. (4] According to the results of Shivaprasad and collaborators in an Indian population the combined assessment of GAD 65-Ab and ZnT8-Ab identifies up to 97% of the antibody positive patients and could replace entirely the use of IA-2-Ab as a serological marker with no loss of sensitivity and specificity (8).

Regarding GAD 65-Ab our results confirm the leading place of this immunologic marker in the diagnosis of type 1 diabetes in adults – it has the highest prevalence, the longest duration of seropositivity and the highest percentage of diagnosed cases of type 1 diabetes in separate analysis – identifies 72% of type 1 diabetes cases.

• **Disadvantages of the study and potential for future research**

The main disadvantages of the present study is the relatively small number of studied patients and the cross-sectional design which do not allow separate analysis of the antibody positivity according to decades of disease diagnosis as well as analysis of the changes of the antibody positivity over time.

According to the published data ZnT8-Ab posi-

tivity has the highest prevalence in children and adolescents with a peak of about 80% at 16-18 years of age as well as in newly-diagnosed patients and declines with the increase of age and duration of the disease (4-7,11). Nevertheless the assessment of ZnT8-Ab has the greatest value exactly in the adult population of type 1 diabetes where it reduces the cases of idiopathic type 1 diabetes while in children it does not improve the diagnostic sensitivity of the already established markers (6,11). The potential place of ZnT8-Ab assessment in the diagnosis of LADA which would be of great importance in clinical practise has also been discussed. In the present study the mean age of the studied group is relatively low – 37,24 ±11,08 years, and probably it affects the high percentage of ZnT8-Ab detected. According to the published data 42% of LADA cases are ZnT-8-Ab positive. (12) The population of this study is in fact LADA and the observed percentage of ZnT8-Ab positivity – 45,7%, is quite similar to that reported in the literature.

A subject of interest and for future research would be the analysis of the antibody positivity to ZnT 8 according to decades of disease diagnosis, which would probably define a subpopulation of patients in which the assessment of the marker has greater diagnostic value. The results of the study definitely point out a leading place of ZnT 8-Ab in the defined population – in actual fact ZnT 8-Ab is the second marker in diagnostic importance after GAD 65-Ab. It is possible that in patients of higher age the marker loses some of its diagnostic value or on the contrary – its significance increases.

Analysis of the of the changes in the antibody positivity to ZnT 8 over time is also necessary as it would additionally define the place of ZnT 8-Ab in the diagnosis of type 1 diabetes in unresolved cases depending on the duration of the disease. According to the published data ZnT 8-Ab decline shortly after the diagnosis and in patients of 20 years duration of the disease antibodies can be detected in 6,7%. The dynamic of ZnT 8-Ab positivity over time is showing a weak correlation to that of IA 2-Ab. (12,13) The results of the present study are also in support of the thesis for the rapid decline of ZnT-8-Ab following diagnosis. The only significant difference found between the subgroup with diabetes of duration of less than a year including newly-diagnosed diabetes, and the subgroup with diabetes of duration between one and five years was in ZnT 8-Ab positivity – 63,6% vs. 45,7%, OR 4,5, p=0,04. Probably if the studied group was of newly-diagnosed patients only, the prevalence of ZnT 8-Ab would be even higher. It has to be taken into consideration that the difference for IA 2-Ab is of borderline significance and probably if the number of studied patients was higher, it would have reached significance as it is known that IA 2-Ab positivity declines rapidly over time. The question for the antibody per-

sistence over time is highly significant for clinical practice as it would define the time window after the diagnosis in which the assessment of ZnT 8-Ab is valid. Probably in diabetes of longer than the studied duration, the marker loses some of its diagnostic value. In routine clinical practice however, revision of the diagnosis of diabetes after the fifth year of duration is seldom needed and based on the present results in patients with diabetes of up to 5 years duration it can be concluded that in the standard case the assessment of ZnT8-Ab is of high diagnostic value.

In the presence of additional data of the antibody positivity to ZnT 8 according to decades of disease diagnosis and for its change over time a specific diagnostic algorithm for the assessment of the different antibodies in specific combinations and sequence could be defined according to the age of diagnosis and the duration of the disease. That would be of practical implication in the setting of limited resources for the assessment of all the three antibodies which is the case in our country. In the ideal case however, all the three immunologic markers have to be assessed.

• **Potential contributions of scientific and practical importance**

The present study provides for the first time data for the ZnT 8-Ab positivity in a Bulgarian population of type 1 diabetes patients diagnosed above the age of 18 years and of up to five years duration of the disease. The results have significant value for the routine clinical practice as they determine a leading position of ZnT8-Ab in the diagnosis of type 1 diabetes – it is the second most prevalent antibody in adult patients with autoimmune diabetes and the second in diagnostic importance after GAD 65-Ab. The assessment of ZnT8-Ab in addition to GAD 65-Ab and IA 2-Ab reduces the cases of idiopathic type 1 diabetes and the use of ZnT8-Ab as a second immunologic marker in addition to GAD 65-Ab outweighs the established combination of GAD 65-Ab + IA 2-Ab.

Conclusions

In a Bulgarian population of type 1 diabetes patients diagnosed above the age of 18 years and of up to five years duration of the disease:

- ZnT8-Ab is a significant and independent diagnostic marker
- the addition of ZnT8-Ab assessment to the established markers reduces the cases of idiopathic type 1 diabetes by 2,9%
- ZnT8-Ab has a relatively high prevalence rating second after GAD 65-Ab
- ZnT 8-Ab is second in diagnostic importance after GAD 65-Ab
- the combined assessment of GAD 65-Ab +

ZnT8-Ab identifies more type 1 diabetes cases compared to the present established in the clinical practice measurement of GAD 65-Ab + IA2-Ab

Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude to their colleagues from the University Hospital of Endocrinology for their support in the selection of the studied patient population and to the staff of the Department of Diabetology and Laboratory of Immunology for the performance of the study.

The present study is supported by a grant from the Medical University Sofia - Contract № 85/2015.

References

1. **Tankova T.** Diabetes mellitus. Sofia: Paradigma; 2013. (In Bulgarian) (Танкова Ц. Захарен диабет. София: Парадигма; 2013.)
2. **Seissler J, Scherbaum WA.** Autoimmune diagnostics in diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44(2): 133-137.
3. **Wenzlau JM, Hutton JC, Davidson HW.** New antigenic targets in type 1 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2008; 15(4): 315-320.
4. **Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, et al.** The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104 (43): 17040-17045.
5. **Wenzlau J.** Zinc transporter 8 (ZnT8) autoantibodies [internet]. 2016 Apr 4; *Diapedia* 2105812817 rev. no. 9. Available from: <http://dx.doi.org/10.14496/dia.2105812817.9>
6. **Kawasaki E.** Type 1 diabetes and autoimmunity. *Clin Pediatr Endocrinol* 2014; 23(4): 99-105.
7. **Yang L, Luo S, Huang G, Peng J, Li X, Yan X, et al.** The diagnostic value of zinc transporter 8 autoantibody (ZnT8A) for type 1 diabetes in Chinese. *Diabetes Metab Res Rev* 2010; 26(7): 579-584.
8. **Shivaprasad C, Mittal R, Dharmalingam M, Kumar PK.** Zinc transporter-8 autoantibodies can replace IA-2 autoantibodies as a serological marker for juvenile onset type 1 diabetes in India. *Indian J Endocrinol Metab* 2014; 18: 345-349.
9. **Andersson C, Larsson K, Vaziri-Sani F, Lynch K, Carlsson A, Cedervall E, et al.** The three ZNT8 autoantibody variants together improve the diagnostic sensitivity of childhood and adolescent type 1 diabetes. *Autoimmunity* 2011; 44(5): 394-405.
10. **Andersson C, Vaziri-Sani F, Delli A, Lindblad B, Carlsson A, Forsander G, BDD Study Group et coll.** Triple specificity of ZnT8 autoantibodies in relation to HLA and other islet autoantibodies in childhood and adolescent type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 2013; 14(2): 97-105.
11. **Kawasaki E, Nakamura K, Kuriya G, Satoh T, Kobayashi M, Kuwahara H et al.** Differences in the humoral autoreactivity to zinc transporter 8 between childhood- and adult-onset type 1 diabetes in Japanese patients. *Clin Immunol* 2011; 138(2): 146-153.
12. **Vaziri-Sani F, Oak S, Radtke J, Lernmark K, Lynch K, Agardh CD, et al.** ZnT8 autoantibody titers in type 1 diabetes patients decline rapidly after clinical onset. *Autoimmunity* 2010; 43(8): 598-606.
13. **Wenzlau JM, Walter M, Gardner TJ, Frisch LM, Yu L, Eisenbarth GS, et al.** Kinetics of the post-onset decline in zinc transporter 8 autoantibodies in type 1 diabetic human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(10): 4712-4719.

Нива на гликемията след натоварване при лица с ангиографски установена коронарна артериална стеноза

Бояджиева, Мила Б.¹, Ангелов, Атанас А.², Хаджиева, Елица Г.¹, Христов, Кирил¹, Х. Георгиев, Светослав Ж.³

¹ Клиника по Ендокринология, УМБАЛ „Св. Марина“, Медицински университет, Варна

² Първа клиника по кардиология, УМБАЛ „Св. Марина“, Медицински университет, Варна

³ Клиника по интервенционална кардиология, УМБАЛ „Св. Марина“, МУ, Варна

Адрес за кореспонденция:

г-р Мила Бояджиева,
Клиника по Ендокринология,
УМБАЛ „Света Марина“
бул. „Христо Смирненски“1, Варна 9000
e-mail: milaboja@yahoo.com

Резюме

Въведение: Нивата на плазмената глюкоза на 2^{ри} час след ОГТТ (2-ч-ПГ) са силен предсказващ фактор за сърдечно-съдовия (СС) риск, независимо от добре известните рискови фактори, включително плазмената глюкоза на гладно (ПГГ) и HbA_{1c}.

Цел: Да се потърсят разлики в гликемичните показатели и, особено, в нивата на 2-ч-ПГ между лица с и без значима коронарна стеноза.

Материали и методи: Изследвахме 96 лица (81,3% мъже) с проведена коронарна ангиография и без известни гликемични нарушения. Глюкознит толеранс се определи чрез стандартен ОГТТ на 3-10 ден след дехоспитализацията. Значима коронарна стеноза се прие при $\geq 50\%$ стеснение от артериалния лумен. Допълнително сравнихме гликемичните показатели между нормогликемичните пациенти с установена коронарна артериална болест (КАБ) (n=26) с тези при здрави контроли с нормален глюкозен толеранс и без известни ССЗ, съпоставими по пол и възраст (n= 19).

Резултати: Лицата със значима коронарна стеноза показаха достоверно по-високи нива на 2-ч-ПГ ($9,53 \pm 4,26$ ммол/л; $8,04 \pm 1,83$ ммол/л, респ., $p=0,03$) и HbA_{1c} ($6,24 \pm 1,62\%$; $5,57 \pm 0,33\%$, респ., $p=0,01$) спрямо тези без значима такава, докато ПГГ не достигна статистическа значимост. Интересно, дори при нормогликемичните лица с установена КАБ, ПГ на 2ри час беше значимо по-висока спрямо тази при здрави контроли ($6,41 \pm 0,16$ ммол/л; $5,18 \pm 0,28$ ммол/л, респ., $p=0,0002$). За разлика от това, ПГГ и HbA_{1c} показаха сходни нива при двете групи.

Заклучение: Установихме по-високи нива на 2-ч-ПГ при пациентите със значима коронарна стеноза спрямо тези без значима такава. От друга страна, намерихме, че средната стойност на 2-ч-ПГ, дори при лицата без значима стеноза (8,04 ммол/л), попада в диапазона за хипергликемия на 2ри час. Резултатите съответстват на публикуваните данни относно неблагоприятното влияние на хипергликемията след натоварване върху ангиографски установената степен на КАБ.

Ключови думи: коронарна артериална болест, хипергликемия след натоварване, ОГТТ, коронарна стеноза

Въведение

Нивата на плазмената глюкоза на 2^{ри} час (2-ч-ПГ) след орален глюкозо-толерантен тест (ОГТТ) са мощен предсказващ фактор за сърдеч-

но-съдовия (СС) риск, независимо от добре известните други рискови фактори, включително плазмената глюкоза на гладно (ПГГ) и HbA_{1c}. Проучването DECODE демонстрира, че връзката между гликемията и СС риск започва още при

нормални граници на кръвната глюкоза (КГ) и нараства с линейна зависимост (1,2). За всяко увеличение на нивото на 2-ч-ПГ с 2,1 ммол/л, относителният риск за СС събитие се увеличава с 12-42% (3). Funagata Diabetes Study, показва че нарушеният глюкозен толеранс (НГТ), а не ПГГ, е рисков фактор за СС заболявания (ССЗ) (4). Все още продължават разискванията относно това кой е най-ефективният тест за откриване на пациентите с коронарна артериална болест (КАБ), притежаващи допълнителен СС риск, съобразно нарушенията в глюкозния метаболизъм (12,13). Докато HbA_{1c} се счита за по-лесен и по-удобен тест за извършване, то ОГТТ открива повече рискови лица (9). Проучването GAMI намира, че хипергликемията на 2ри час е честата при пациенти с остър миокарден инфаркт (ОМИ) и е рисков фактор за бъдещи СС инциденти при тези вече високо-рискови лица. Противоположно на това нито ПГГ, нито HbA_{1c} притежават същата предсказваща стойност (10). В този смисъл, КГ след натоварване (ОГТТ) е значимо по-важен рисков маркер, отколкото глюкозата на гладно, особено в ранните етапи на нарушена глюкозна регулация, когато ПГГ и HbA_{1c} могат да бъдат още в нормални граници (11). Следователно, измерването на КГ след натоварване (ОГТТ) идентифицира лицата с повишен риск за ССЗ извън риска, свързан с оценка само на ПГГ и HbA_{1c} (5, 6, 10).

Коронарната ангиография е прецизен метод за оценка на атеросклерозата, което позволява да се търсят зависимости между различни рискови фактори и ангиографски определената тежест на атеросклерозата. Независимо, че съществуват категорични данни за връзката между тежестта на КАБ и наличен диабет, малко проучвания са фокусирани специално върху нивата на 2-ч-ПГ съобразно наличието на значима коронарна стеноза.

Цел: Да се потърсят разлики в гликемичните показатели и, особено, в нивата на 2-ч-ПГ между лица със и без значима коронарна стеноза.

Материал и методи:

Изследвахме 96 лица с проведена коронарна ангиография (КА) поради известна или подозирана коронарна артериална болест (КАБ), без известни гликемични нарушения. Глюкозният толеранс се определи чрез стандартен ОГТТ на 3-10 ден след дехоспитализацията. Основните характеристики на изследваните са показани в

Таблица 1. Плазмена глюкоза се изследва по хексокиназен метод. Коронарна атеросклероза се диагностицира при наличие на всякакво стеснение на коронарния лумен, а значима коронарна стеноза се прие при $\geq 50\%$ стеснение от артериалния лумен. Допълнително сравнихме гликемичните показатели между нормогликемичните пациенти с установена КАБ (n=26) с тези при здрави контроли с нормален глюкозен толеранс и без известни ССЗ, съпоставими по пол и възраст (n= 19).

Резултати:

Лицата със значима коронарна стеноза (n=75) показаха достоверно по-високи нива на 2-ч-ПГ и HbA_{1c} спрямо тези без значима коронарна стеноза ($9,53 \pm 0,50$ ммол/л спрямо $8,04 \pm 0,43$ ммол/л, $p=0,03$; $6,24 \pm 0,25\%$ спрямо $5,57 \pm 0,09\%$, $p=0,01$ съответно). За разлика от това, ПГГ не достигна значими различия (Фиг.1). Двете групи пациенти бяха със сходна възраст, коремна обиколка (КО), индекс на телесна маса (ИТМ) и липидни показатели ($p>0,05$ за всички) (Табл. 2). Допълнително сравнихме нивата на 2-ч-ПГ между две групи лица с нормален ГТ – тези с проведена КА и установена КАБ и здрави контроли без анамнеза за ССЗ, съпоставими по възраст ($51,8 \pm 7,9$ год. спрямо $56,4 \pm 8,6$ год., $p=0,1$) и полови разпределение ($p=0,5$). Първата група показа значимо по-висока 2-ч-ПГ ($6,41 \pm 0,16$ ммол/л спрямо $5,18 \pm 0,28$ ммол/л, $p=0,0002$), докато ПГГ и HbA_{1c} не достигнаха достоверна разлика (Фиг. 2, Фиг. 3).

Обсъждане и заключение:

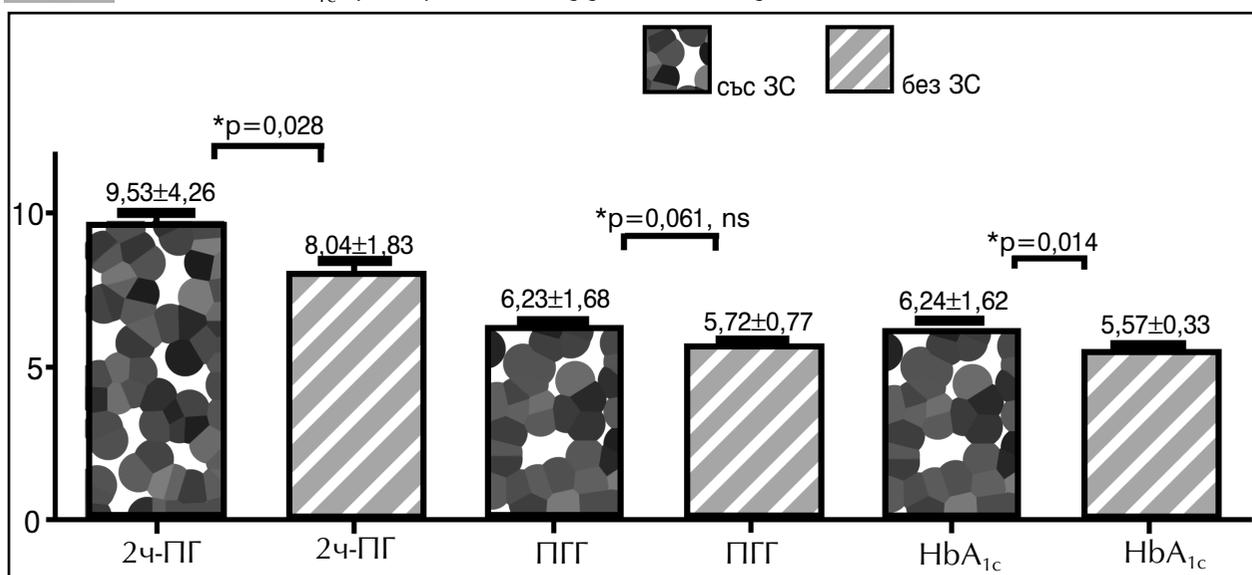
В нашето изследване, лицата със значима коронарна стеноза ($\geq 50\%$) показаха достоверно по-високи нива на 2-ч-ПГ и HbA_{1c} спрямо тези без значима такава, докато ПГГ не достигна статистическа разлика. Средната стойност на 2-ч-ПГ при първите беше $9,53$ ммол/л, която попадна в диапазона за хипергликемия на 2ри час. Резултатите съответстват на посочените данни за неблагоприятното влияние на гликемията след натоварване (ОГТТ) върху ССЗ, независимо от добре известните СС-рискови фактори Това е и възможно обяснение за намерената от нас по-висока 2-ч-ПГ при тези със значима стеноза спрямо тези без значима такава, при сравними групи метаболитни показатели. Saely и съавт. намират, че новооткритите лица, както с НГТ, така и с диагностициран на 2ри час захарен диабет при ОГТТ, са силно и независимо свързани с наличието и степента на коронарната атеросклероза, оценена чрез ангиография (7). Освен това, и двете форми на новооткрит абнормен

Таблица 1. Основни показатели при участниците

Показател	Стойност	Показател	n (%)	Терапия	n (%)
Възраст (гог.)	58,2± 8,6	значима стеноза	75 (78,1)	ACEI/ARB	81 (84,4)
Мъже (n,%)	78 (81,3)	без значима стеноза	21(21,9)	статици	88 (91,7)
Жени (n,%)	18 (18,7)	ПКИ	73 (76)	бета-блокери	83 (86,5)
VMI kg/m ²	30,1 ± 4,2	ОМИ	21 (21,9)	аспирин	75 (78,1)
КО (см)	105,6±10,5	предходен МИ	32 (33,3)	диуретици	25 (26)

Забележка: ПКИ – перкутанна коронарна интервенция; МИ – миокарден инфаркт; ACEI/ARB-инхибитори на ангиотензин конвертиращ ензим/ангиотензин-рецепторни блокери

Фигура 1 ПГГ, 2-ч-ПГ и HbA_{1c} при лицата със и без значима стеноза



ЗС – значима стеноза, плазмена глюкоза в mmol/L; HbA_{1c} в %

Таблица 2. Основни показатели между лицата със значима и незначима стеноза.

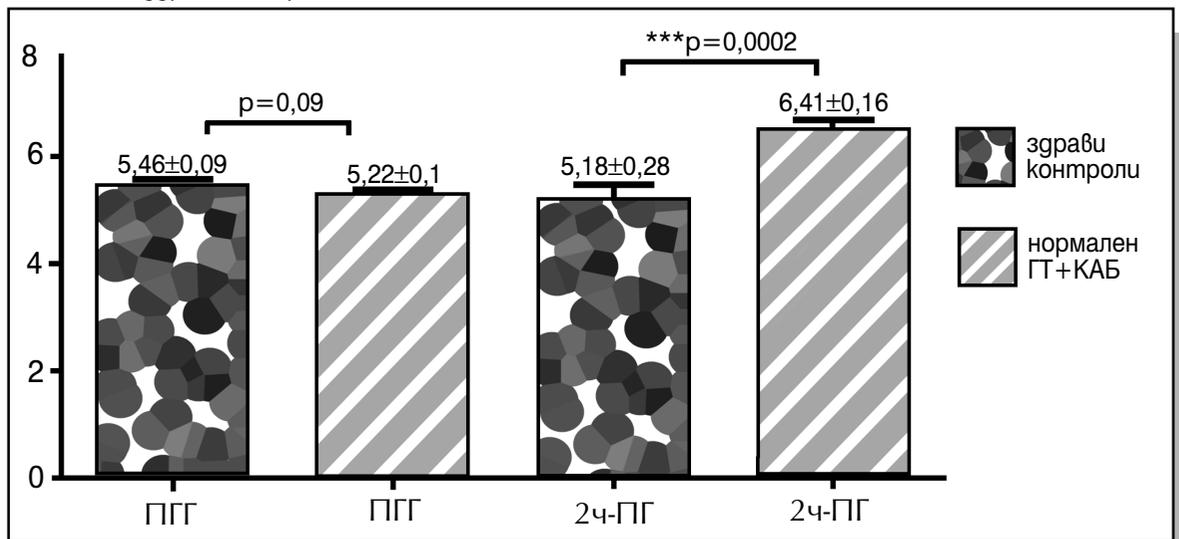
	значима стеноза (n=75)	незначима стеноза (n=21)	p
ОХ	5,28 ± 1,21	5,20 ± 1,15	0,8
ТГ	2,157 ± 1,17	2,620 ± 3,02	0,2
HDL-хол.	1,18 ± 0,35	1,20 ± 0,33	0,7
LDL-хол.	3,08 ± 1,07	3,29 ± 1,08	0,6
възраст	58,15 ± 1,06	58,11 ± 1,87	0,99
КО	105,5 ± 1,43	104,1 ± 3,44	0,7
VMI	29,25 ± 0,82	30,05 ± 1,35	0,7

ОХ – общ холестерол; ТГ – триглицериди

глюкозен толеранс са важни предиктори за СС събития при пациенти с ОМИ, без големи различия помежду си (10). За разлика от това, HbA_{1c} дори в праговата стойност за предиабет (5,7%), не е значим предиктор при такива пациенти (7,14,15).

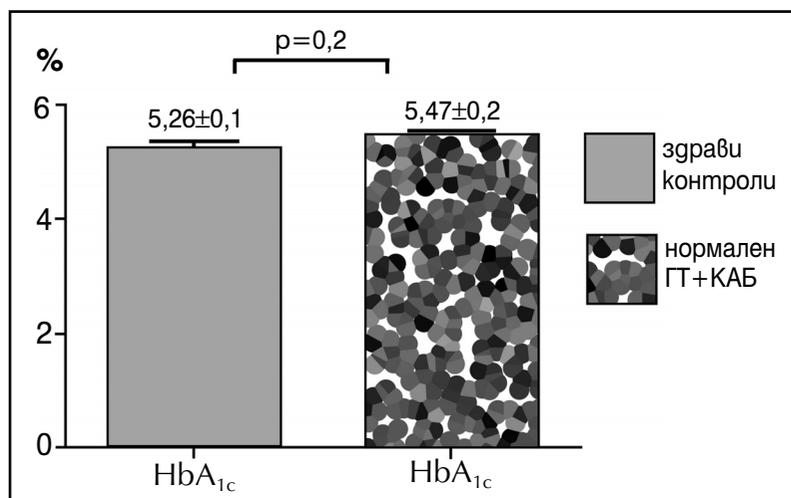
От друга страна, лицата със стеноза < 50% показаха средна стойност на 2-ч-ПГ 8,04 ммол/л, която макар и по-ниска, също попада в диапазона за хипергликемия на 2ри час, и то при средна стойност на HbA_{1c} 5,57% (Фиг.1). Въпреки че при тези лица не е наблюдавана значима стеноза, те не показват различен метаболитен профил спрямо тези със стеноза ≥ 50% и вероятно са в по-ранен етап

Фигура 2 Сравнение на ПГГ и 2-ч-ПГ между лицата с нормален ГТ и установена КАБ и здрави контроли.



на коронарното заболяване. Това е и възможна причина за повишените средни стойности на 2-ч-ПГ при тях. Съществуват данни, че незначимата (<50%) коронаросклероза е по-честа при лицата с НГТ, отколкото при нормогликемичните (7). Интересно, дори сред лицата с нормален ГТ, ПГ на 2ри час показва разлика между тези с установена КАБ спрямо здрави контроли, които са без анамнеза за ССЗ и са съпоставими по пол и възраст (Фиг. 2). От трите гликемични показателя, само 2-ч-ПГ беше значимо по-висока при първите, докато ПГГ и HbA_{1c} показаха сходни нива (Фиг. 2 и 3). През 2012 г. се публикуваха резултати, посочващи, че нормогликемични лица, при които 2-ч-ПГ не се връща до нивото на ПГГ в хода на ОГТТ, имат повишен риск от ССЗ (8). Това е и възможно обяснение на намерените от нас резултати.

Фигура 3 HbA_{1c} при лицата с нормален ГТ и установена КАБ и здрави контроли.



Действително, в нашето проучване нормогликемичните лица с установена КАБ при проведената КА не са успели да понижат концентрациите на 2-ч-ПГ до тези на ПГГ, докато при здравите контроли, нивото на 2-ч-ПГ е дори леко по-ниско от това на ПГГ. Според някои автори, коронарната атеросклероза прогресира паралелно с прогресиращото влошаване на глюкометаболитното състояние.

Сред пациенти с НГТ, коронарната атеросклероза е разпространена, но не в такава степен, че да се представи със значима стеноза както при диабетните пациенти. От друга страна незначимата (<50%) коронаросклероза е по-честа при лицата с НГТ, отколкото при нормогликемичните (7).

Провеждането на ОГТТ при пациенти, показани за КА, открива висока честота на хипергликемия на 2ри час. Нашите резултатите съответстват на публикуваните данни относно връзката между хипергликемията след натоварване и ангиографски установената степен на КАБ.

Post-load Glycemic Levels in Subjects With Angiographically Determined Coronary Artery Stenosis

Boyadzhieva, Mila B.¹, Angelov, Atanas A.², Hadzhieva, Elitsa G.¹, Hristozov, Kiril H.¹, Georgiev, Svetoslav J.

¹ Clinic of Endocrinology, UMHAT „St. Marina“, Medical university, Varna

² 1st Clinic of Cardiology, UMHAT „St. Marina“, Medical university, Varna

³ Clinic of Interventional Cardiology UMHAT „St. Marina“, Medical university, Varna

Address for correspondence:

Dr Mila Boyadzhieva

Clinic of Endocrinology, „Sveta Marina“ University Hospital

1 „Hristo Smirnenki“ Bul., 9000 Varna

e-mail: milaboja@yahoo.com

Abstract

Introduction: Post-load glycemia (2-h-PG) is a strong predictor for cardiovascular (CV) risk independently of well-known risk factors, including fasting plasma glucose (FPG) and HbA_{1c}.

Aim: To search for differences in glycemic indices and especially in 2-h-PG in subjects with or without significant coronary artery stenosis.

Materials and Methods: We studied 96 patients (81,3% males) without a history of glucose abnormalities who underwent coronary angiography. Glucose tolerance was defined during OGTT performed 3-10 days after hospital discharge. Coronary stenosis with lumen narrowing $\geq 50\%$ was considered significant. Additionally, glycemic indices between normoglycemic coronary artery disease (CAD) patients (n=26) and overall healthy age- and sex adjusted controls without known CV-disease history (n=19) were compared.

Results: The levels of 2-h-PG ($9,53 \pm 0,50$; $8,04 \pm 0,43$ mmol/L; resp. $p=0,03$) and HbA_{1c} ($6,24 \pm 0,25$; $5,57 \pm 0,09\%$ resp.; $p=0,01$) were significantly higher in patients with significant coronary stenosis compared to patients without significant stenosis. In contrast, FPG did not reach significant differences. Interestingly, 2-h-PG was significantly higher in normoglycemic subjects with established CAD compared to healthy controls ($6,41 \pm 0,16$ vs $5,18 \pm 0,28$ mmol/L, $p=0,0002$). In contrast, FPG and HbA_{1c} were similar in the two groups.

Conclusion: We found higher 2-h-PG in patients with significant coronary stenosis compared to subjects with non-significant stenosis. On the other hand we found the mean 2-h-PG level in patients with non-significant stenosis ($8,04$ mmol/L) was in the 2-h-hyperglycemic range. Our observation fits well with the published data regarding association between post-load hyperglycemia and the angiographically determined extent of CAD.

Ключови думи: coronary artery disease, post-load hyperglycemia, OGTT, coronary stenosis

Introduction

Two-hour post-load glycemia (2-h-PG) during the oral glucose tolerance test (OGTT) is a strong predictor for cardiovascular (CV) risk, independently of other well known risk factors, including fasting plasma glucose (FPG) and HbA_{1c}. The DECODE study demonstrates that the association between glycemia and CV-

risk starts within the normal blood glucose (BG) range and increases linearly (1,2). For each 2,1 mmol/L increase in the 2-h-PG level, the relative risk for CV-event increases with 12-42% (3). The Funagata Diabetes Study shows that impaired glucose tolerance (IGT), but not FPG is a risk factor for CV-diseases (4). There is an ongoing discussion about the most efficient test to identify coronary artery disease (CAD) patients

at additional CV-risk considering glucose metabolism disturbances (9,12). While HbA_{1c} is considered easier and more convenient to perform, the OGTT discovers more subjects at risk (9). The GAMI study defines that 2-h-hyperglycemia is prevalent in acute myocardial infarction (AMI) patients and is a risk factor for future CV-events in these already high-risk subjects. In contrast, neither FPG nor HbA_{1c} have the same predictive value (10). Therefore, post-load BG is a significantly more important risk marker compared to fasting glycemia, especially in the early abnormal glucose regulation stages when FPG and HbA_{1c} are still within normal ranges (11). Consequently, post-load glycemia measurement (OGTT) identifies subjects with increased CV-risk independently of the risk associated only with FPG and HbA_{1c} assessment (5, 6, 10).

Coronary angiography is a precise method for atherosclerosis assessment, allowing association between various risk factors and angiographically determined severity of atherosclerosis to be discovered. Strong data exist about the relationship between CAD severity and presence of diabetes. Nevertheless, very few studies are focused especially on the association between 2-h-PG levels and the presence of significant coronary atherosclerosis.

Aim: To search for differences in glycemic indices and especially in 2-h-PG levels in subjects with or without significant coronary artery stenosis.

Materials and Methods

We studied 96 patients without a history of glucose abnormalities who underwent coronary angiography (CA) due to known or suspected coronary artery disease (CAD). Glucose tolerance was defined during the OGTT performed 3-10 days after hospital discharge. The baseline characteristics of the study participants are shown in Table 1. Plasma glucose concentration was measured by the hexokinase method. Coronary atherosclerosis was diagnosed according to the presence of any coronary lumen narrowing and

coronary stenosis with lumen narrowing $\geq 50\%$ was considered significant. Additionally, glycemic indices between normoglycemic CAD patients (n=26) and overall healthy age- and sex adjusted controls without known CVD history (n=19) were compared.

Results

The levels of 2-h-PG and HbA_{1c} were significantly higher in patients with significant coronary stenosis compared to the patients without significant stenosis (9,53 \pm 0,50 mmol/L vs 8,04 \pm 0,43 mmol/L; p=0,03; 6,24 \pm 0,25% vs 5,57 \pm 0,09%; p=0,01, respectively). In contrast, FPG did not reach significant differences (Fig.1).

The two groups of patients were of similar age, with similar waist circumference (WC), body mass index (BMI) and lipid parameters (p>0,05) (Table 2).

Additionally, we compared 2-h-PG levels between two groups of subjects with normal glucose tolerance – these with angiographically established CAD and age- (51,8 \pm 7,9 years vs 56,4 \pm 8,6 years; p=0,1) and sex (p=0,5) adjusted healthy controls without a history of CVD. The first group showed significantly higher 2-h-PG (6,41 \pm 0,16 mmol/L vs 5,18 \pm 0,28 mmol/L, p=0,0002), while FPG and HbA_{1c} were similar in the two groups (Fig. 2, Fig. 3).

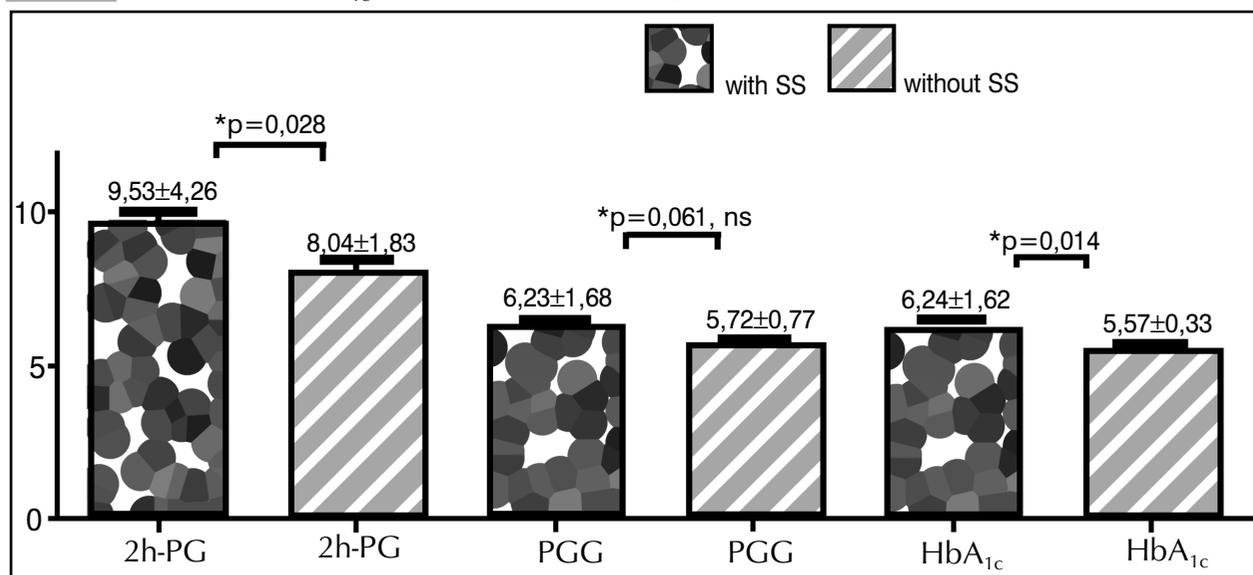
Discussion

In our study, the subjects with significant coronary stenosis ($\geq 50\%$) manifested with higher 2-h-PG and HbA_{1c} levels compared to those without significant coronary stenosis (<50%), while FPG did not reach statistical difference. Mean 2-h-PG value in the first group of patients was 9,53 mmol/L and reached the range for 2-h-hyperglycemia. Our results are in accordance with published data about the unfavorable effect of post-load glycemia (OGTT) on CVD, independent of the well-known CV-risk factors. This is a putative explanation for the higher 2-h-PG levels in patients with significant stenosis than in subjects with non-significant stenosis with other metabolic param-

Table 1. Baseline characteristics of study participants

Index	Value	Index	n (%)	Therapy	n (%)
Age (y)	58,2 \pm 8,6	significant stenosis	75 (78,1)	ACEI/ARB	81 (84,4)
Males (n,%)	78 (81,3)	non-significant stenosis	21(21,9)	statins	88 (91,7)
Females (n,%)	18 (18,7)	PCI	73 (76)	Beta-blockers	83 (86,5)
BMI kg/m ²	30,1 \pm 4,2	AMI	21 (21,9)	aspirin	75 (78,1)
WC (cm)	105,6 \pm 10,5	Previous MI	32 (33,3)	diuretics	25 (26)

Notes: **PCI** – percutaneous coronary intervention; **MI** – myocardial infarction; **ACEI/ARB** – angiotensin-converting enzyme inhibitors/ angiotensin receptor blockers

Figure 1 FPG, 2-h-PG and HbA_{1c} in subjects with or without significant stenosis

SS – significant stenosis; fasting plasma glucose in mmol/L HbA_{1c} в %

Table 2. Baseline parameters between subjects with or without significant stenosis

	Significant stenosis (n=75)	Non-significant stenosis (n=21)	p
TC	5,28 ± 1,21	5,20 ± 1,15	0,8
TG	2,157 ± 1,17	2,620 ± 3,02	0,2
HDL-C	1,18 ± 0,35	1,20 ± 0,33	0,7
LDL-C	3,08 ± 1,07	3,29 ± 1,08	0,6
Age	58,15 ± 1,06	58,11 ± 1,87	0,99
WC	105,5 ± 1,43	104,1 ± 3,44	0,7
BMI	29,25 ± 0,82	30,05 ± 1,35	0,7

TC – total cholesterol; TG – triglycerides

ters that were comparable. Saely et al. found that both newly diagnosed IGT and post-challenge diabetes during OGTT are strongly and independently associated with the presence and extent of coronary atherosclerosis assessed angiographically (7). Moreover, both forms of the newly discovered abnormal glucose tolerance are important predictors of CV-events in patients with AMI, without major differences between IGT and post-challenge diabetes (10). In contrast, HbA_{1c} even at prediabetic cut-off (5,7%) is not a significant predictor in these patients (7,13,14).

On the other hand, the patients with non-significant stenosis showed a mean 2-h-PG value of 8,04 mmol/L, which although lower also reached the threshold for 2-h- hyperglycemia after OGTT, even though the mean HbA_{1c} was 5,57% (Fig.1).

Although no significant stenosis was diagnosed among these study participants, they did not have different metabolic parameters from the patients with stenosis $\geq 50\%$ and they are probably at an earlier stage of their coronary disease. This is a possible explanation for the increased mean values of 2h-PG in these patients. Existing data define that non-significant coronary stenosis (<50%) is more frequent among subjects with IGT in comparison with euglycemic subjects (7). Interestingly, even among subjects with normal GT, the 2-h-PG value was different between patients with CAD and age- and sex-adjusted controls without CVD history (Fig. 2). Out of the three glycemic parameters examined, only 2-h-PG was significantly higher among the first group of patients, while the values of FPG and HbA_{1c} were similar (Fig. 2, Fig. 3). In 2012 data was published, showing that normoglycemic subjects with 2-h-PG not falling down to the level of FPG during the OGTT, have an increased CV-risk (8). This could be a possible explanation for the results we obtained. In our study, 2h-PG in the normoglycemic participants with diagnosed CAD after CA did not reach the level of FPG. In contrast, 2-h-PG in the healthy controls was even slightly lower than FPG.

Figure 2 Comparison of FPG and 2-h-PG between subjects with normal GT and established CAD and healthy controls

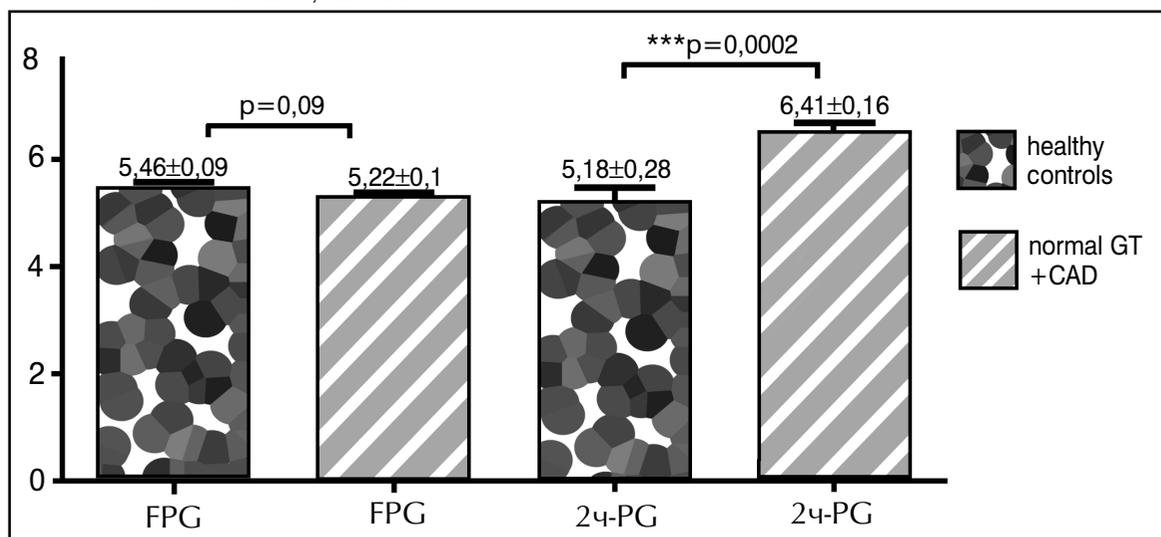
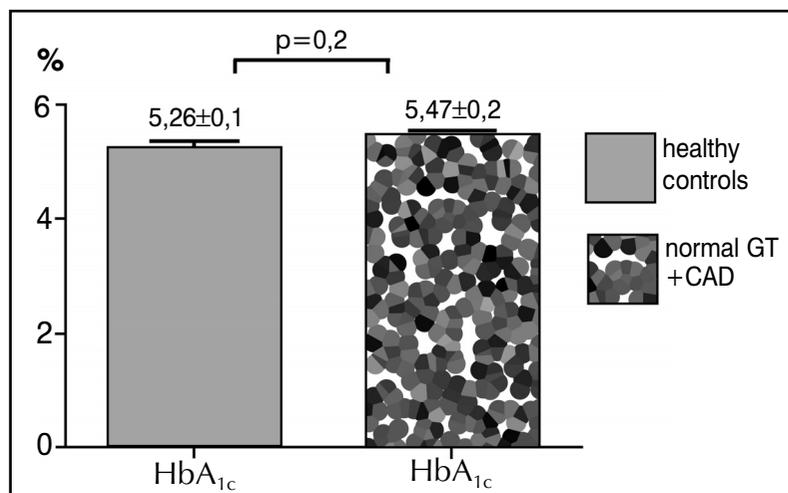


Figure 3 HbA_{1c} in subjects with normal GT and established CAD and healthy controls



Some authors state, that the progression of coronary atherosclerosis is parallel to the progressive deterioration of the glucometabolic state. Coronary atherosclerosis is common among patients with IGT, but not to such a degree as to cause a significant stenosis as it is among diabetic patients. On the other hand, the non-significant coronary atherosclerosis (<50%) is more common among subjects with IGT than among euglycemic subjects (7). Performing the OGTT in patients who underwent CA indicates a high prevalence of 2-h-hyperglycemia. Our results correspond to published data on association between the post-load hyperglycemia and the extent of CAD angiographically established.

References

KHUONH

1. The **DECODE Study Group**. Glucose tolerance and cardiovascular mortality. Comparison of fasting and 2-hour diagnostic criteria. *Arch Intern Med* 2001; 161 (3): 397-405.
2. The **DECODE Study Group**. Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. *Lancet* 1999; 354 (9179): 617- 621.
3. **Meigs JB, Nathan DM, D'Agostino RB Sr, Wilson, PW**. Fasting and postchallenge glycemia and cardiovascular disease risk: the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care* 2002; 25:1845-1850.

4. **Tominaga M, Eguchi H, Manaka H, Igarashi K, Kato T, Sekikawa A.** Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose: the Funagata Diabetes Study. *Diabetes Care* 1999; 22 (6): 920-924.
5. **Shaw JE, Hodge AM, de Courten M, Chitson P, Zimmet PZ.** Isolated post-challenge hyperglycaemia confirmed as a risk factor for mortality. *Diabetologia* 1999; 42: 1050-1054.
6. **Barrett-Connor E, Ferrara A.** Isolated postchallenge hyperglycemia and the risk of fatal cardiovascular disease in older women and men: The Rancho Bernardo Study. *Diabetes Care* 1998; 21: 1236-1239.
7. **Saely CH, Drexel H, Sourij H, Aczel S, Jahnel H, et al.** Key role of postchallenge hyperglycemia for the presence and extent of coronary atherosclerosis: an angiographic study. *Atherosclerosis* 2008; 199 (2): 317-322.
8. **Ning F, Zhang L, Dekker JM, Onat A, Stehouwer CD, Yudkin JS, et al.** DECODE Finnish and Swedish Study Investigators: Development of coronary heart disease and ischemic stroke in relation to fasting and 2-hour plasma glucose levels in the normal range. *Cardiovasc Diabetol* 2012; 11:76.
9. **De Mulder M, Oemrawsingh RM, Stam F, Boersma E, Umans VA.** Comparison of diagnostic criteria to detect undiagnosed diabetes in hyperglycaemic patients with acute coronary syndrome. *Heart* 2012; 98: 37-41.
10. **Ritsinger V, Tanoglidi E, Malmberg K, Näsman P, Rydén L, Tenerz E, Norhammar A.** Sustained prognostic implications of newly detected glucose abnormalities in patients with acute myocardial infarction: long-term follow-up of the Glucose Tolerance in Patients with Acute Myocardial Infarction cohort. *Diab Vasc Dis Res* 2015; 12(1):23-32.
11. **Ning F, Tuomilehto J, Pyorala K, Onat A, Soderberg S, Qiao Q, et al.** Cardiovascular disease mortality in Europeans in relation to fasting and 2-h plasma glucose levels within a normoglycemic range. *Diabetes Care* 2010; 33: 2211-2216.
12. **Doerr R, Hoffmann U, Otter W, Heinemann L, Hunger-Battefeld W, Kulzer B, et al.** Oral glucose tolerance test and HbA1c for diagnosis of diabetes in patients undergoing coronary angiography the Silent Diabetes Study. *Diabetologia* 2011; 54: 2923-2930.
13. **World Health Organization.** Use of glycated haemoglobin (HbA_{1c}) in the diagnosis of diabetes mellitus: abbreviated report of a WHO consultation. Geneva: WHO 2011, www.who.int/diabetes/publications/report-hba1c_2011.pdf
14. **American Diabetes Association (ADA).** Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2013; 36: S67-S74.

www.endotext.org

- ✓ Свободно достъпен сайт, предлагащ изчерпателна информация във всички области на клиничната ендокринология, предоставена от екип водещи световни специалисти ръководен от Prof. Leslie De Groot (САЩ).
- ✓ Поместваните материали, текущо актуализирани, са съобразени със съвременните международни стандарти за диагностика и лечение на ендокринните заболявания

Роля на продължителното глюкозно мониториране за откриване на асимптомни нощни хипогликемии и разграничаване етиологията на сутрешните хипергликемии

Бояджиева, Мила Б.¹, Хаджиева, Елица Г.¹, Христозов, Кирил Х.¹, Георгиева-Христова, Дарина К.²

¹ Клиника по Ендокринология, УМБАЛ „Св. Марина“, Медицински университет, Варна

² Клиника по Неврология, УМБАЛ „Св. Марина“, Варна, Медицински университет

Адрес за кореспонденция:

д-р Мила Бояджиева

Клиника по Ендокринология, УМБАЛ „Света Марина“

бул. „Христо Смирненски“1, Варна 9000

e-mail: milaboja@yahoo.com

Резюме

Често сутрешната хипергликемия създава затруднения в диагностично-лечебния план при анализиране на възможните причини – феномен на „заявяването“, ефект на Сомоджи или просто лош гликемичен контрол. За правилна оценка на тези феномени е особено полезно изследване нивата на кръвната глюкоза (КГ) няколко последователни нощи между 3 и 5 часа или приложение на продължително глюкозно мониториране (ПГМ).

Цел на проучването: да се демонстрира ролята на ПГМ в разграничаване на причините за сутрешна хипергликемия (КГ ≥ 10 ммол/л) и да се установи честота на рефлекторната хипергликемия след асимптомни нощни хипогликемии (ефект на Сомоджи) при пациенти с тип 1 захарен диабет (Т1ЗД).

Материали и методи: Изследвани са 19 амбулаторни пациенти с Т1ЗД (15 жени и 4 мъже) на средна възраст $37,32 \pm 13,17$ год., със средни стойности на HbA_{1c} $7,18 \pm 1,16\%$ и разнопосочни стойности на КГ на гладно от провежданя самоконтрол. Проведено е ретроспективно ПГМ чрез системата iPro 2 (Medtronic) в продължение на 5-7 дни. Анализирани са сутрешните стойности на измерената глюкоза от сензора (ГС) на гладно съобразно гликемията по време на нощния сън. Нощна хипогликемия се прие при ГС $< 3,9$ ммол/л.

Резултати: От наблюдаваните 121 нощи се установиха 26 нощи с асимптомни хипогликемии, при 12 от 19 пациента. В 28,93% от всички проследени нощи се регистрира сутрешна ГС на гладно ≥ 10 ммол/л, която се предшества от нощна хипогликемия (НХ) само в 11,43% от случаите. В 84,62% от наблюдаваните нощи с хипогликемии, ГС на гладно е < 10 ммол/л, а в 57,69% дори < 5 ммол/л. Средната сутрешна ГС на гладно след асимптоматична НХ се оказва значимо по-ниска от тази след нощ без хипогликемия ($5,98 \pm 4,55$ спрямо $9,29 \pm 4,22$ ммол/л съотв., $p = 0,0007$), но не показва значима асоциация с измерени глюкозни показатели през нощта (ГС в 22ч., 24ч. и 03ч.), както и с продължителността на НХ ($p > 0,05$ за всички).

Заключение: Данните от ПГМ показват, че сутрешната хипергликемия ≥ 10 ммол/л най-често отразява феномена на заявяването или просто лошия гликемичен контрол. Не установихме корелация на сутрешната ГС след НХ с глюкозните показатели през нощта, както и с продължителността на НХ. Това подкрепя ролята на ПГМ както за разкриване на НХ, така и за определяне на тяхната продължителност, т.к. сутрешната ГС не е надежден ориентир.

Ключови думи: нощна хипогликемия, сутрешна кръвна глюкоза, продължително глюкозно мониториране, ефект на Сомоджи

Увод

Феноменът на „засоряването“ се изразява в повишена глюкозна продукция и намалена периферна глюкозна утилизация в ранните сутрешни часове в резултат от физиологичен спад на ендогенната инсулинова секреция (между 3 и 5 часа сутринта), в комбинация с увеличена секреция на контраинсуларни хормони (основно растежен хормон (РХ) и кортизол) (1, 12). Това физиологично явление може да се превърне в патологично при пациенти със захарен диабет (ЗД) - сутрешна хипергликемия на гладно, една от причините за която е изчерпване ефекта на екзогенно приложени инсулин. Установено е, че приносът на този феномен към сутрешната хипергликемия при диабетици корелира обратно пропорционално с давността на диабета и право пропорционално със стойността на гликирания хемоглобин (2). Понякога се наблюдава т.нар. „удължен“ ефект на зората, когато сутрешният пик в глюкозните нива персистира и след закуската, до обедните часове. Като възможни причини се обсъждат прекомерният прием на въглехидрати сутрин или патологично удължената фаза на секреция на РХ при диабетици (3). Установено е, че концентрацията на РХ е 2-3 пъти по-висока при пациенти със ЗД в сравнение със здрави (4). Особено важно в клиничната практика е разграничаването на феномена на зората от ефекта на Сомоджи, тъй като те изискват различно терапевтично поведение.

Последният се характеризира отново със сутрешна хипергликемия, но като израз на предшестваща нощна хипогликемия. Сред защитните реакции в отговор на спадащите глюкозни нива се включват потискане на собствената инсулинова секреция (механизъм, който отпада при провеждане на заместително лечение с инсулин) и увеличено отделяне на контрарегулаторни хормони с цел стимулиране на ендогенната глюкозна продукция. За разлика от феномена на зората, рефлаторната сутрешна хипергликемия - нейното съществуване и патогенеза, е все още обект на обширни дебати. Въвеждането на системите за ПГМ разкрива нови възможности - установяване на неподозирани гликемични вариации през цялото денонощие, включително идентифициране на неразпознати нощни хипогликемии (5-7,17).

Целта на настоящото проучване е да се демонстрира ролята на ПГМ в разграничаване на причините за сутрешна хипергликемия и да се установи честота на рефлаторната хипергликемия > 10 ммол/л (ефект на Сомоджи) след асимп-

томни и недокументирани от пациента нощни хипогликемии при изследваните лица с Т1ЗД.

Пациенти и методи

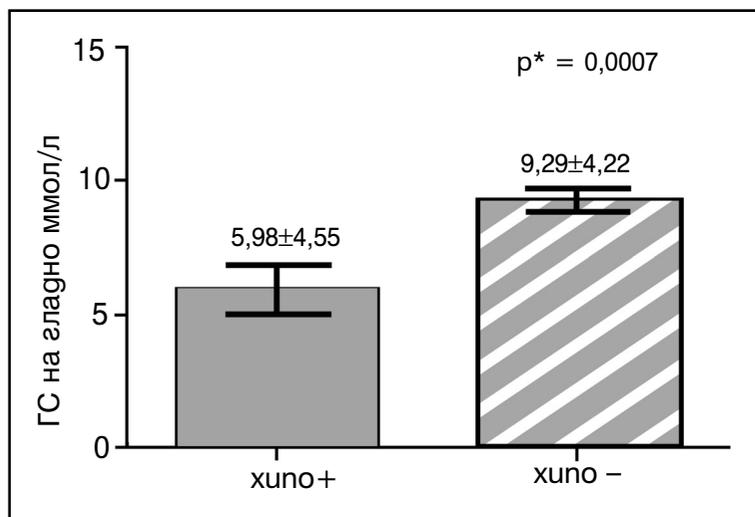
Изследвани са 19 амбулаторни пациента с Т1ЗД (15 жени и 4 мъже) на средна възраст $37,32 \pm 13,17$ год., със средна давност на диабета $15,6 \pm 9,93$ год., средни стойности на HbA_{1c} $7,18 \pm 1,16\%$ и разнородни стойности на КГ на гладно от провежданя самоконтрол; всички на базално-болусен режим с аналогови инсулини, с нормална бъбречна функция. Проведено е ретроспективно ПГМ в продължение на 5-7 дена чрез системата iPro2 и глюкозни сензори Enlite. Анализирани са стойностите на сутрешната ГС на гладно съобразно гликемията по време на нощния сън. Като нощ определяме времето между последната калибрация на сензора (измерване на КГ с глюкомер), направена от пациента вечерта преди лягане, и сутрешната калибрация (нужната информация се съдържа в задължително водения от пациента дневник). Нощна хипогликемия се прие при измерена ГС < 3,9 ммол/л.

Данните се обработиха чрез специализиран статистически пакет GraphPad Prism-версия 5. При сравняване на две групи данни се използва t-тест на Student. Приложен е корелационен коефициент r на Pearson за оценка на силата и посоката на зависимостта между две променливи. При всички сравнения $p < 0,05$ се приема за статистически достоверно.

Резултати:

При 12 от 19 пациента, проследени в продължение на общо 121 нощи, се установиха 26 нощи с асимптомни хипогликемии. Сравнявайки пациентите с и без регистрирани от сензора нощни хипогликемии не се наблюдават статистически значими разлики по отношение на заложените показатели - възраст, давност на ЗД, инсулинова доза/кг телесна маса, стойност на HbA_{1c} ($p > 0,05$ за всички). Само 4 от регистрираните 26 нощи с асимптомни хипогликемии са с продължителност по-малка от 1 час (между 15 и 50 мин.), а останалите - със средна продължителност $232,5 \pm 24,4$ мин.

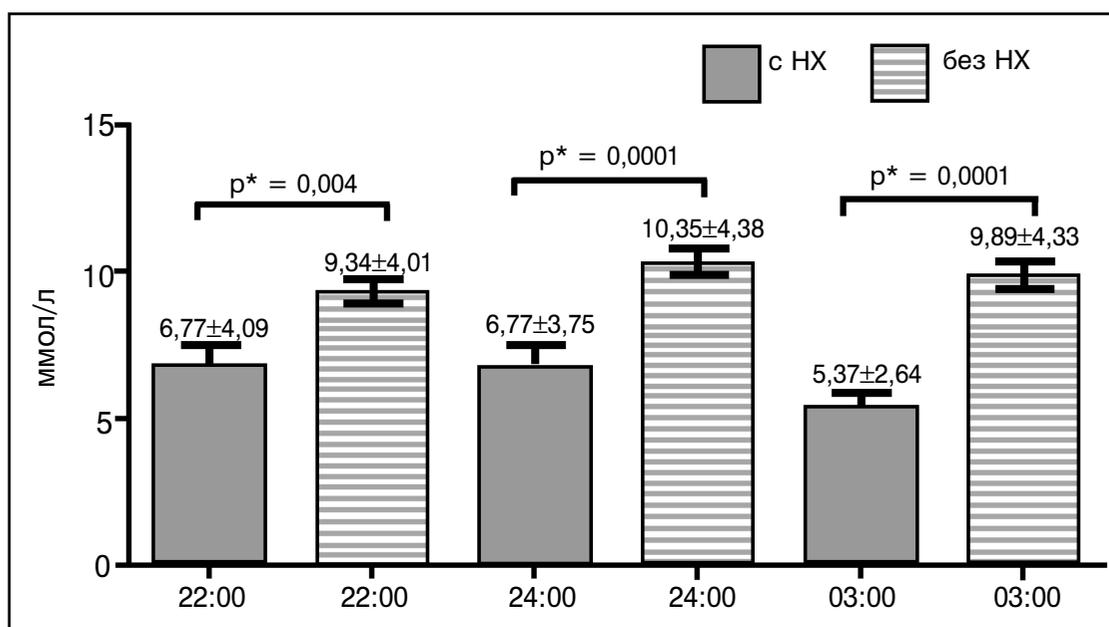
В 28,93% от проследените нощи се регистрира сутрешна ГС на гладно ≥ 10 ммол/л, която се предшества от асимптомна нощна хипогликемия в 11,43% от случаите, а от продължителна такава (> 1 час) - само в 2,86%. В 84,62% от нощите с асимптомни хипогликемии сутрешната ГС е < 10 ммол/л, а в 57,69% - дори < 5 ммол/л. От



Фигура 1

Сравнение между сутрешната ГС на гладно след нощи с хипогликемии (хипо+) и нощи без хипогликемии (хипо-)

Фигура 2 Сравняване на глюкозни показатели между нощи с и без хипогликемии;



* $p < 0,05$; НХ – нощна хипогликемия

друга страна установихме, че ГС на гладно < 5 ммол/л се предшества от нощна хипогликемия в 68,18% от случаите. Средната сутрешна ГС на гладно след асимптоматична нощна хипогликемия се оказва значимо по-ниска от тази след нощ без хипогликемия ($5,98 \pm 4,55$ ммол/л спрямо $9,29 \pm 4,22$ ммол/л, съотв., $p=0,0007$) (Фиг. 1).

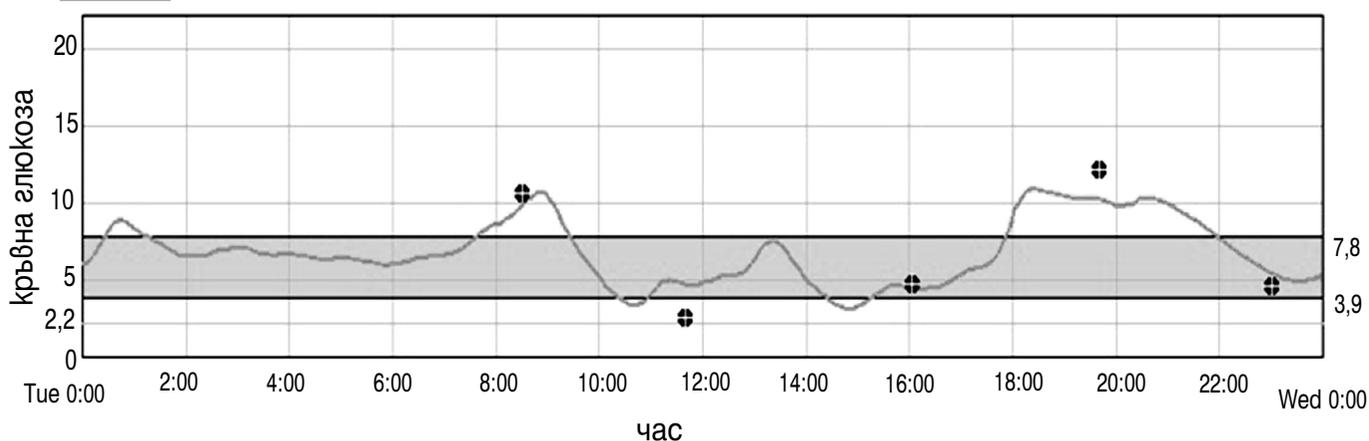
Продължителността на нощната хипогликемия показва обратна зависимост с ГС в 24 ч. ($r=-0,45$; $p=0,02$), в 03 ч. ($r=-0,76$; $p<0,0001$), както и с най-ниската измерена от сензора стойност по време на хипогликемията ($r=-0,54$; $p=0,004$), но не

и със стойността на последващата я сутрешна ГС (Табл. 1). Регистрираха се значимо по-ниски стойности на глюкозните показатели (22ч., 24ч., 03 ч.) при нощи с хипогликемии (Фиг. 2). Интересно, не се установи значима асоциация между сутрешната ГС след нощна асимптомна хипогликемия и останалите измерени глюкозни показатели (ГС в 22ч., 24ч. и 03ч.; $p>0,05$ за всички) (Табл. 1). Не намерихме и значима връзка между стойността на сутрешната ГС (след нощна хипогликемия) и най-ниската стойност на ГС по време на нощната хипогликемия (Табл. 1).

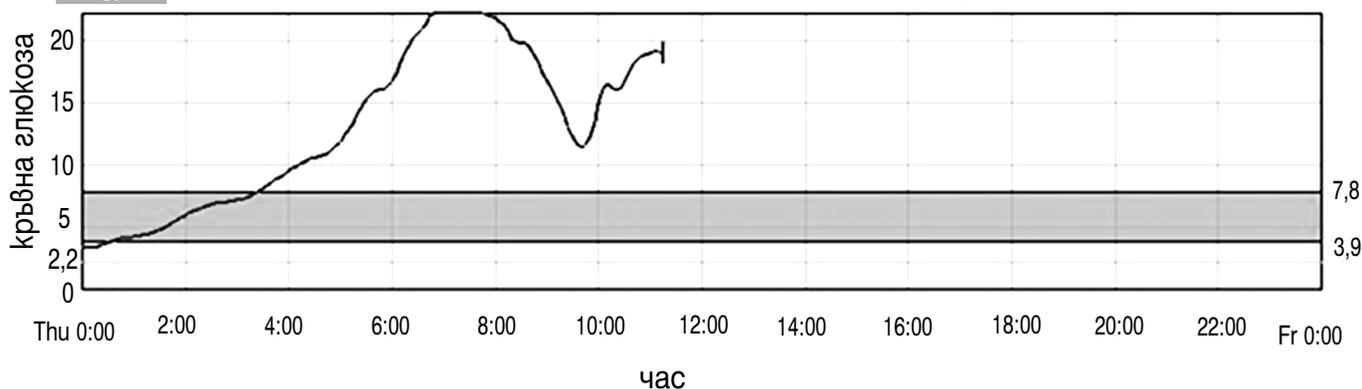
Таблица 1 Връзка между продължителност на нощната хипогликемия и сутрешната ГС с ГС в 22 ч., 24 ч., 03 ч. и най-ниската ГС през нощи с хипогликемии от ПГМ

	ГС	ГС в 24ч.	ГС в 03ч.	сутрешна ГС	най-ниска ГС
продължителност	r = 0,007; p = 0,97	r = -0,45; p = 0,02	r = -0,76 p < 0,0001	r = -0,35; p = 0,08	r = -0,54 p = 0,004
сутрешна ГС	r = -0,34 p = 0,09	r = -0,33 p = 0,1	r = 0,12 p = 0,6	–	r = 0,11 p = 0,6

Фигура 3 Сутрешна хипергликемия след нощна еугликемия – феномен на зората



Фигура 4 Сутрешна хипергликемия след нощна хипогликемия – ефект на Сомоджи



Обсъждане:

В днешно време няма достатъчно доказателства, които да подкрепят значимата честота на рефлекторната хипергликемия (ефект на Сомоджи), но има убедителни данни за това, че високите стойности на сутрешната КГ на гладно са по-скоро в резултат от феномена на зазоряването или просто лошия гликемичен кон-

трол. Оказа се, че в нашето изследване причините за над 80% (88,57%) от случаите със сутрешна хипергликемия (≥ 10 ммол/л) са съпътстващият феномен на зазоряването (Фиг. 3) или просто незадоволителният гликемичен контрол на пациентите.

Едва в 15,38% (4/26) от наблюдаваните от нас асимптоматични хипогликемии установихме ефект на Сомоджи (сутрешна ГС ≥ 10 ммол/л)

(Фиг. 4). Според Raskin и съавт. асимптомните нощни хипогликемии са чести, но те рядко се последват от рефлекторни хипергликемии, тъй като приложеният вечерен базален инсулин обикновено поддържа нощната хиперинсулинемия (8). Подобни са и наблюденията на Bolli и сътр., които намират значително високи сутрешни хипергликемии след нощен спад в нивата на КГ само в случаите, когато хипогликемията е овладяна с прием на голямо количество въглехидрати (2). Нашите данни са в съответствие и с тези на Woodward и съавт., които установяват 14 епизода на нощна хипогликемия при 25 пациента с Т1ЗД, проследени чрез ПГМ, като нито един от тях не се последва от ефект на Сомоджи (9).

Сред изследваните от нас пациенти се установи, че ГС на гладно < 5 ммол/л се предшества от нощна хипогликемия в 68,18% от случаите. Регистрирахме средна ГС на гладно след нощни хипогликемии $5,98 \pm 4,55$ ммол/л, която се оказва значимо по-ниска спрямо тази след нощи без хипогликемии (Фиг. 1). Получените резултати са сходни с наблюденията на Choudhary и сътр., които сравняват сутрешната КГ на гладно след нощи със (ГС < 3,5 ммол/л) и нощи без хипогликемии при пациенти с Т1ЗД отново чрез ПГМ (10). Подобни са и данните, получени от проучването на Noi-Hansen и сътр., които показват, че средните стойности на сутрешна КГ след нощни хипогликемии са с над 5 ммол/л по-ниски в сравнение с тези след нощи без хипогликемии, и че всъщност рискът от нощна хипогликемия прогресивно нараства с понижаване нивата на сутрешната КГ (11).

Стандартен метод в клиничната практика за разкриване на нощни хипогликемии е изследва-

не на КГ в 03 часа. В нашето проучване установихме средна стойност на измерената от сензора глюкоза в 03 часа $5,37 \pm 2,64$ ммол/л. Интересно, не наблюдавахме значима асоциация на сутрешната ГС след нощи с асимптомна хипогликемия и измерените глюкозни показатели през нощта. Предвид това, считаме, че тя не е надежден ориентир за времето на настъпване на нощната хипогликемия

Неблагоприятните влияния на нощните асимптомни хипогликемии са добре известни (13,14). В нашето изследване 84,6% от нощните хипогликемии са продължили почти 4 часа, което би могло да се обясни с потиснатия контрарегулаторен отговор към хипогликемия по време на сън (15,16), както и с липсващия прием на храна през този период на денонощието. Не намерихме обаче зависимост между продължителността на нощните хипогликемии и сутрешната ГС. Това подкрепя ролята на ПГМ както за разкриване на подобни епизоди, така и за определяне на тяхната продължителност, т.к. сутрешната ГС не е надежден ориентир.

Заклучение

В представеното от нас изследване демонстрираме ролята на системите за ретроспективно ПГМ в разкриването на неразпознати нощни хипогликемии и определяне етиологията на сутрешните хипергликемии. Прави впечатление голямата средна продължителност на повечето регистрирани асимптомни нощни хипогликемии (почти 4 часа). Независимо от малкия брой изследвани от нас пациенти, получените резултати са в съответствие с публикуваните до момента данни.

The Role of Continuous Glucose Monitoring for Detecting Asymptomatic Nocturnal Hypoglycemia and Differentiating Between Different Causes for Morning Hyperglycemia

Boyadzhieva, Mila B.¹, Hadzhieva, Elitsa G.¹, Hristozov, Kiril H.¹, Georgieva-Hristova, Darina K.²

¹ Clinic of Endocrinology, UMHAT „Sv. Marina“, Medical University, Varna

² Clinic of Neurology, UMHAT „Sv. Marina“, Medical University, Varna

Address for correspondence:

Dr Mila Boyadzhieva

Clinic of Endocrinology, „Sveta Marina“ University Hospital

1 „Hristo Smirnenki“ Bul., 9000 Varna

e-mail: milaboja@yahoo.com

Abstract

Morning hyperglycemia in diabetic patients is often an obstacle in diagnosis and treatment when analyzing the possible causes: dawn phenomenon, Somogyi effect or just poor glycemic control. Measuring blood glucose (BG) levels in several nights between 3 a.m. and 5 a.m. or using a continuous glucose monitoring system (CGM) is useful in order to correctly diagnose these phenomena.

The aim of the study is to demonstrate how useful CGM is in differentiating between different causes for morning hyperglycemia (BG \geq 10 mmol/l) and to evaluate the frequency of rebound hyperglycemia following asymptomatic nocturnal hypoglycemia (Somogyi effect) among type 1 diabetic patients.

Materials and methods: 19 outpatients with T1DM (15 women and 4 males) with mean age $37,32 \pm 13,17$ years, mean HbA_{1c} value of $7,18 \pm 1,16\%$ and divergent values of self-monitoring fasting BG were included in the study. CGM was performed for the period of 5-7 days using the retrospective iPro 2 system (Medtronic). Morning fasting sensor glucose (SG) readings have been analyzed in respect of nocturnal glycemic control. Nocturnal hypoglycemia was defined as SG $<$ 3,9 mmol/l.

Results: There are 26 nights with hypoglycemia (in 12 out of 19 patients) among the total of 121 nights observed. Fasting SG \geq 10 mmol/l is registered in 28,93% of all nights monitored, nevertheless in just 11,43% it was preceded by nocturnal hypoglycemia. In 84,62% of all nights with hypoglycemia fasting SG is $<$ 10 mmol/l, while in 57,69% it is even $<$ 5 mmol/l. A significantly lower mean fasting SG is observed after asymptomatic nocturnal hypoglycemia in comparison with that after a night without hypoglycemia ($5,98 \pm 4,55$ mmol/l vs $9,29 \pm 4,22$ mmol/l, resp., $p=0,0007$). Morning SG after asymptomatic nocturnal hypoglycemia is not associated with the other glucose values measured during the night (SG in 22:00, 0:00 and 03:00 o'clock) as well as with the hypoglycemic duration ($p>0,05$).

Conclusion: The CGM data reveal that fasting hyperglycemia \geq 10 mmol/l most often represents the dawn phenomenon or just the poor glycemic control of the patients so far observed. Morning SG after asymptomatic nocturnal hypoglycemia is not associated with the other glucose values measured during the night as well as with the hypoglycemic duration. This proves furthermore the role of CGM to detect nocturnal hypoglycemia as well as to determine their duration, because morning SG is not a reliable guide.

Ключови думи: nocturnal hypoglycemia, fasting blood glucose, continuous glucose monitoring, Somogyi effect

Introduction

The dawn phenomenon occurs early in the morning when endogenous glucose production increases and peripheral glucose uptake is diminished due to a natural decrease of insulin secretion (between 3 a.m. and 5 a.m.) together with elevation of insulin - antagonistic hormones, particularly growth hormone (GH) and cortisol (1,12). This physiological phenomenon could turn into pathology in patients with diabetes mellitus (DM) causing fasting hyperglycemia, one of the reasons being the running out action of exogenous insulin administered to the patient the previous day. The contribution of dawn phenomenon to fasting rise of BG concentrations in diabetic patients has been found to inversely correlate with diabetes duration and directly correlate with the HbA_{1c} percentage (2). Sometimes the so called „prolonged“ dawn phenomenon is observed, when morning hyperglycemia persists after breakfast, till midday. The possible reasons include high - carbohydrate breakfast or pathologically increased GH secretion in people with DM (3). GH concentrations have been found to be up to 2-3 times higher in diabetic people compared to people without the condition (4). It is of great importance for clinical practice to correctly differentiate between the dawn phenomenon and the Somogyi effect since therapeutic management differs. The latter represents morning hyperglycemia following nocturnal hypoglycemia. The defence reactions in response to decreasing BG levels include reduced secretion of endogenous insulin (a mechanism that is eliminated in insulin replacement therapy) and increased release of counterregulatory hormones in order to stimulate the own glucose production. Unlike the dawn phenomenon, the Somogyi effect - its existence and pathogenesis - is still a matter of debate. The usage of CGM systems reveals new opportunities - detection of unexpected glycemic variations throughout the day, including the diagnosis of asymptomatic nocturnal hypoglycemia (5, 6, 7, 17).

The aim of this study is to demonstrate how useful CGM is in differentiating between different causes for morning hyperglycemia and to evaluate the frequency of rebound hyperglycemia > 10 mmol/l (Somogyi effect) following asymptomatic and undocumented nocturnal hypoglycemia among type 1 diabetic patients observed.

Patients and methods

Nineteen outpatients with type 1 DM (15 women and 4 males) with mean age $37,32 \pm 13,17$ years, mean duration of diabetes $15,6 \pm 9,93$ years, mean HbA_{1c} value of $7,18 \pm 1,16\%$ and divergent values of self-monitoring fasting BG were included in the study. All of them were with normal renal function and on

basal-bolus regimen with insulin analogs. CGM was performed for a period of 5-7 days using the retrospective iPro 2 system and glucose sensors Enlite. Morning fasting SG levels have been analyzed in respect of nocturnal glycemic control. We define „night“ as the period between the last sensor calibration (BG measure with glucometer) performed by the patient in the night before bedtime, and morning calibration (all the information needed is found in the obligatory diary kept by the patient). We define nocturnal hypoglycemia as a SG measure < 3,9 mmol/l during the night.

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism-version 5. T-test of Student was used for comparison between two sets of data. Pearson correlation coefficient *r* was used to assess the strength and direction of the dependence between two variables.

Results

In 12 out of 19 patients, there are 26 nights with asymptomatic hypoglycemia among the 121 nights observed. There are no significant differences in age, diabetes duration, insulin dose/kg body weight and HbA1c between patients with or without nocturnal hypoglycemia registered by the sensor ($p > 0,05$). Only 4 of the nighttime asymptomatic hypoglycemic episodes last less than one hour (between 15 and 50 min.), while the rest have a mean duration of $232,5 \pm 24,4$ min. Fasting SG ≥ 10 mmol/l is registered in 28,93% of all nights monitored. It is preceded by any asymptomatic nocturnal hypoglycemia in 11,43%, while in only 2,86% there is a prolonged nighttime hypoglycemia (exceeding one hour in duration) followed by morning hyperglycemia. In 84,62% of all nights with asymptomatic hypoglycemia fasting SG is < 10 mmol/l, while in 57,69% it is even < 5 mmol/l. On the other hand, we discovered that fasting SG < 5 mmol/l is preceded by nocturnal hypoglycemia in 68,18% of cases. A significantly lower mean fasting SG is observed after asymptomatic nocturnal hypoglycemia in comparison with that after a night without hypoglycemia ($5,98 \pm 4,55$ mmol/l vs $9,29 \pm 4,22$ mmol/l, resp., $p = 0,0007$) (Fig. 1). The duration of nighttime hypoglycemia shows a negative correlation with midnight SG level ($r = -0,45$; $p = 0,02$), with SG in 03 a.m. ($r = -0,76$; $p < 0,0001$) and with the lowest SG reading during the hypoglycemic episode ($r = -0,54$; $p = 0,004$), but does not show any correlation with the fasting SG level in the following morning (Table 1). Significantly lower SG readings are registered in hypoglycemic nights (22:00, 0:00, 03:00 o'clock) (Fig.2). Interestingly, no significant correlation is observed between morning SG after asymptomatic nocturnal hypoglycemia and the other glucose values measured (SG in 22:00, 0:00 and 03:00 o'clock; $p > 0,05$) (Table 1).

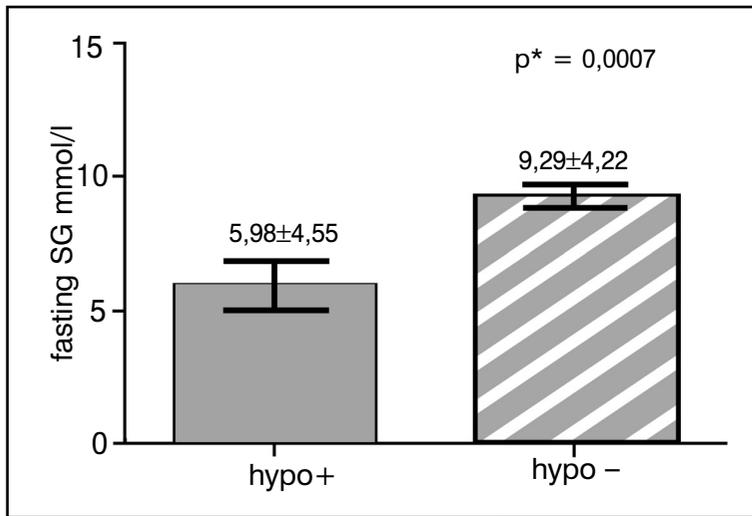
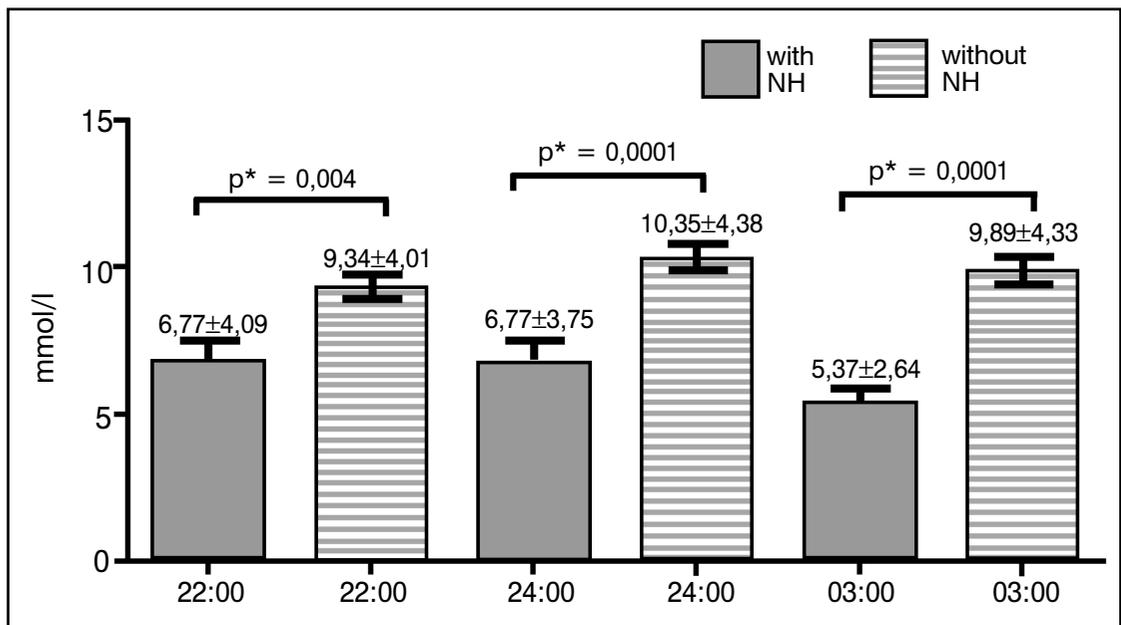


Figure 1.

Comparison between fasting morning SG after nights with hypoglycemia (hypo +) and nights without hypoglycemia (hypo -)

Figure 2

Comparison between glucose values in nights with and nights without hypoglycemia; * p < 0,05; NH - night hypoglycemia



There is also no association between the value of the morning SG (after asymptomatic nocturnal hypoglycemia) and the lowest SC value during nighttime hypoglycemia (Table 1).

Discussion

At the present time there is insufficient data to prove the significant prevalence of rebound hyperglycemia (Somogyi effect). On the other hand, a lot of information exists in favour of the dawn phenomenon

or just the poor glycemic control being the leading causes of morning fasting hyperglycemia. It turns out that in our study more than 80% (88,57%) of cases with morning hyperglycemia (≥ 10 mmol/l) are due to the dawn phenomenon (Fig. 3) or just to the poor control of diabetes.

In our study the Somogyi phenomenon (morning SG ≥ 10 mmol/l) was found in only 15,38% (4/26) of asymptomatic hypoglycemic nights (Fig. 4). According to Raskin and coauthors asymptomatic nocturnal hypoglycemia is common, but subsequent fasting hyperglycemia is rare because the basal insulin given at supertime causes overnight hyperinsulinemia (8).

Table 1 Correlation of nighttime hypoglycemia duration and morning SG with SG at 22:00, 24:00, 03:00 and the lowest SG (during the nighttime hypoglycemia) – CGM data

	SG at 22;00	SG at 24;00	SG at 03;00	morning SG	the lowest SG
duration	r = 0,007; p = 0,97	r = -0,45; p = 0,02	r = -0,76 p < 0,0001	r = -0,35; p = 0,08	r = -0,54 p = 0,004
morning SG	r = -0,34 p = 0,09	r = -0,33 p = 0,1	r = 0,12 p = 0,6	-	r = 0,11 p = 0,6

Figure 3 Morning hyperglycemia after nocturnal euglycemia – *dawn phenomenon*

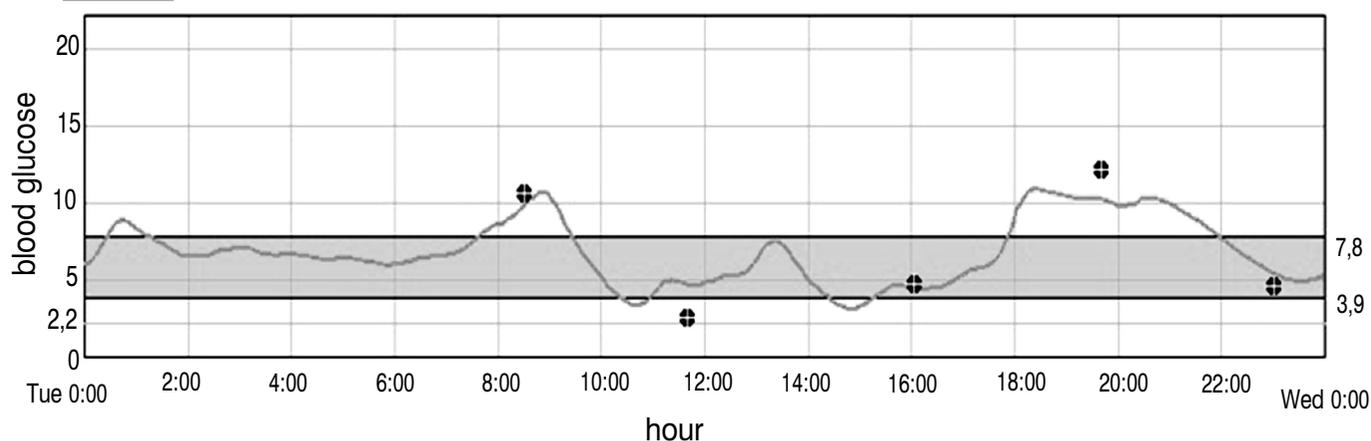
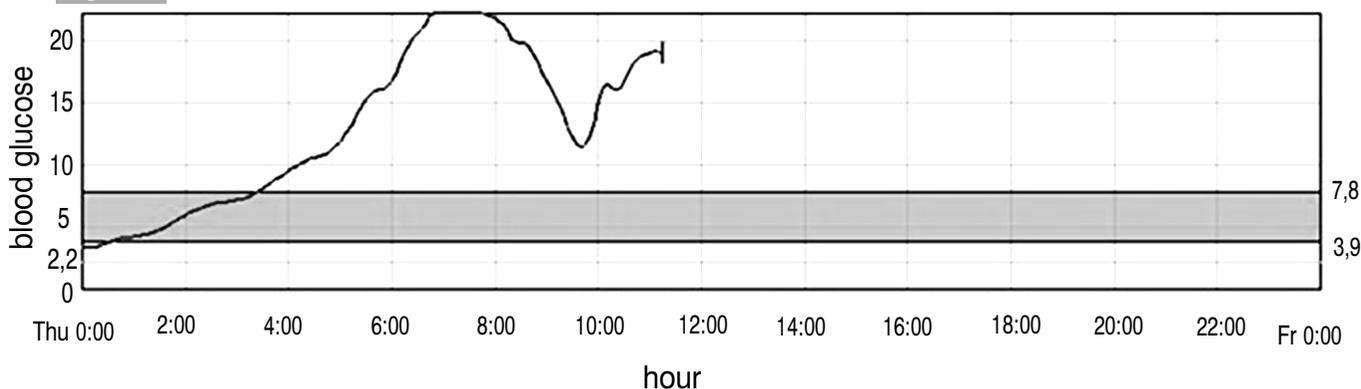


Figure 3 Morning hyperglycemia after nocturnal hypoglycemia – *Somogyi effect*



Bolli and coauthors have similar observations – excessive fasting hyperglycemia rarely follows nocturnal hypoglycemia, except when excessive glucose is ingested to correct hypoglycemia (2). The data presented is also in accordance with the study results of Woodward and coauthors – they diagnose 14 episodes of nocturnal hypoglycemia using the CGM among 25 patients with T1DM, none of which was followed by rebound morning hyperglycemia (9).

In the study we performed fasting SG < 5 mmol/l is preceded by nighttime hypoglycemia in 68,18% of cases. The mean value of fasting SG after nocturnal hypoglycemia ($5,98 \pm 4,55$ mmol/l) is found to be significantly lower than that after nights without hypoglycemia (Fig. 1). Our results are similar with these of Choudhary and coauthors, who use CGM to compare morning fasting BG after hypoglycemic (SG measure < 3,5 mmol/l) and non-hypoglycemic nights among

patients with T1DM (10). Similar data is found in the study of Hoi-Hansen and coauthors, showing that mean morning BG levels after nocturnal hypoglycemia are more than 5 mmol/l lower than these after nights without hypoglycemia. They conclude that the risk of nocturnal hypoglycaemia increases progressively as morning blood glucose values decrease (11).

Measuring BG levels at 3 a.m. is a common method in clinical practice for diagnosis of nocturnal hypoglycemia. In the study we present, the mean value of SG at 3 a.m. is $5,37 \pm 2,64$ mmol/l. This could be explained with the suppressed counterregulatory hormone response to hypoglycemia during sleep (13, 14) and with the lack of food intake at that time. Interestingly, no significant correlation is observed between morning SG after asymptomatic nocturnal hypoglycemia and the glucose values measured during the night. Given this, we think that fasting SG is not a reliable landmark for timing of nocturnal hypoglycaemia.

The adverse effects of nocturnal asymptomatic hypoglycemia are well known (13,14). In our study, 84,6% of nocturnal hypoglycemia lasted almost four

hours. This could be explained with the suppressed counterregulatory hormone response to hypoglycemia during sleep (15, 16) and with the lack of food intake at that time. However, we found no correlation between the duration of nocturnal hypoglycemia and morning SG value. This proves furthermore the role of CGM to detect such episodes as well as to determine their duration, because morning SG is not a reliable guide.

Conclusion

In the study presented, we show how useful the retrospective CGM systems are for the diagnosis of unrecognized nighttime hypoglycemia. Furthermore, we demonstrate their role in defining the etiology of morning hyperglycemia. It is noteworthy the long mean duration (almost 4 hours) of most registered asymptomatic nocturnal hypoglycemia. Despite the small number of study participants, the results we got are in accordance with literature data published so far.

References

1. Rybicka M, Krysiak R, Okopien B. The dawn phenomenon and the Somogyi effect - two phenomena of morning hyperglycaemia. *Endokrynol Pol* 2011; 62(3):276-284.
2. Bolli GB, Perriello G, Fanelli CG, De Feo P. Nocturnal plasma glucose control in type I diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1993;16 (Suppl 3):71-89.
3. Fowelin J, Attvall S, von Schenck H, Bengtsson BA, Smith U, Lager I, et al. Effect of prolonged hyperglycemia on growth hormone levels and insulin sensitivity in insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1993; 42:387-394.
4. Holt R. Growth hormone: a potential treatment option in diabetes? *Diabetes Voice* 2003; 48: 22-24.
5. Heinemann L, DeVries JH. Evidence for continuous glucose monitoring: sufficient for reimbursement? *Diabet Med* 2014; 31(2): 122-125.
6. Lane JE, Shivers JP, Zisser H. Continuous glucose monitors: current status and future developments. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2013; 20(2):106-111.
7. Scheiner G. CGM Retrospective Data Analysis. *Diabetes Technol Ther* 2016; 18 Suppl 2: S214-22.
8. Raskin P. The Somogyi phenomenon. Sacred cow or bull? *Arch Intern Med* 1984; 144: 781-787.
9. Woodward A, Weston P, Casson IF, Gill GV. Nocturnal hypoglycaemia in type 1 diabetes—frequency and predictive factors. *QJM* 2009; 102(9): 603-607.
10. Choudhary P, Davies C, Emery CJ, Heller SR. Do high fasting glucose levels suggest nocturnal hypoglycaemia? The Somogyi effect—more fiction than fact? *Diabet Med* 2013; 30(8): 914-917.
11. Hoi-Hansen T, Pedersen-Bjergaard U, Thorsteinnsson B. The Somogyi phenomenon revisited using continuous glucose monitoring in daily life. *Diabetologia* 2005; 48: 2437-2438
12. Shanik MH, Xu Y, Skrha J, Dankner R, Zick Y, Roth J. Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse? *Diabetes Care* 2008; 31 Suppl 2: S262- S268.
13. Tsujimoto T, Yamamoto-Honda R, Kajio H, Kishimoto M, Noto H. High risk of abnormal QT prolongation in the early morning in diabetic and non-diabetic patients with severe hypoglycemia. *Ann Med* 2015; 47(3): 238-244.
14. Tanenberg R, Newton C, Drake A. Confirmation of Hypoglycemia in the „Dead-in-Bed“ Syndrome, as Captured by a Retrospective Continuous Glucose Monitoring System. *Endocrine Practice* 2010; 16(2): 244-248.
15. Jones TW, Porter P, Sherwin RS, Davis EA, O'Leary P, Frazier F, et al. Decreased epinephrine responses to hypoglycemia during sleep. *N Engl J Med* 1998; 338: 1657-1662.
16. Buckingham B, Wilson DM, Lecher T, Hanas R, Kaiserman K, Cameron F. Duration of Nocturnal Hypoglycemia Before Seizures. *Diabetes Care* 2008; 31(11): 2110-2112.
17. Ruedy KJ, Tamborlane WV. The landmark JDRF continuous glucose monitoring randomized trials: a look back at the accumulated evidence. *J Cardiovasc Transl Res* 2012; 5(4): 380-387.

*Българско дружество
по ендокринология*

Национален симпозиум

*„Затлъстяване,
Метаболитен синдром,
Диабет“*



12-14 октомври 2017г. – Пловдив

Българско дружество по ендокринология *Bulgarian Society of Endocrinology*

Списание
ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ISSN 1310-8131

Journal
ENDOCRINOLOGIA ISSN 1310-8131

Адрес на редакционната колегия:

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

Editorial Board address for correspondence:

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

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

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

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

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

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

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

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

Структурата на статиите трябва да отговаря на следните изисквания:

Титулна страница

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

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

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

Резюме

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

Основен текст

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

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

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

Title page

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

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

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

Abstract

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

Main text

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

Tables and figures

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

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

Таблицы и илюстрации

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

Книгопис

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

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

References

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

Examples

Reference to a journal article:

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

If the original cited paper is in Bulgarian:

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

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

Примери:

Статия от списание:

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

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

Глава (раздел) от книга:

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

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

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

References to a book chapter:

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

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

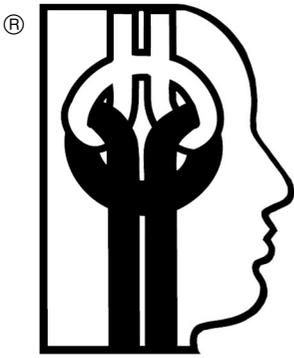
Address for sending the manuscripts and other editorial correspondence

Editorial Board Address for Correspondence:

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

Адрес на редакционната колегия:

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



ЕНДОКРИНОЛОГИЯ

ENDOCRINOLOGIA

Списание
на Българското дружество
по ендокринология
към СНМД в България

Journal
of the Bulgarian Society
of Endocrinology (BSE)

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

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

Главен редактор

Проф. г-р Мария ОРБЕЦОВА, гм

Редактор на английския текст

Джеф ТОМАС

Отговорен редактор

Румен НИНОВ

© Първа корица и графичен дизайн

Румен НИНОВ

Editor-in-chief

Prof. Maria ORBETZOVA, MD PhD

English language editor

Jeff THOMAS

Art director Rumen NINOV

© **Cover&Design** Rumen NINOV

Технически секретар

Маргарита СЛАВЧЕВА

E mail: mora4a2@abv.bg

Tehchnical secretary

Margarita SLAVCHEVA

E mail: mora4a2@abv.bg

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

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

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

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