



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

**Анелия Томова/Aneliya Tomova**

**Анна-Мария Борисова/**

**Anna-Maria Borissova**

**Атанаска Еленкова/Atanaska Elenkova**

**Владимир Христов/Vladimir Christov**

**Георги Кирилов/Georgi Kirilov**

**Драгомир Коев/Dragomir Koev**

**Живка Бонева /Zhivka Boneva**

**Жулиета Геренова/Julieta Gerenova**

**Здравко Каменов/Zdravko Kamenov**

**Иван Цинликов/Ivan Tzinlikov**

**Илиана Атанасова/Iliana Atanassova**

**Калинка Коприварова/Kalinka Koprivarova**

**Катя Тодорова/Katia Todorova**

**Кирил Христов/Kiril Hristozov**

**Лидия Коева/Lidia Koeva**

**Малина Петкова/Malina Petkova**

**Митко Митков/Mitko Mitkov**

**Михаил Боянов/Mihail Boyanov**

**Нарцис Калева/Nartsis Kaleva**

**Пламен Попиванов/Plamen Popivanov**

**Радка Савова/Radka Savova**

**Русанка Ковачева/Roussanka Kovatcheva**

**Сабина Захариева/Sabina Zacharieva**

**Филип Куманов/Philip Kumanov**

**Цветалина Танкова/Tsvetalina Tankova**

## International Scientific Board/ Международен научен съвет

**A. Vulatov (Moscow) / А. Булатов (Москва)**

**M. Coculescu (Bucharest) / М. Кокулеску (Букурещ)**

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

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

**A. Isidori (Rome) / А. Изидори (Рим)**

**B. Karanfiski (Scopie) / Б. Каранфилски (Скопие)**

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

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

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

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

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

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

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

Том XXII / Volume XXII

*Bulgarian Society of Endocrinology 2/2017*

Българско дружество по ендокринология

**Съдържание****Обзори**

- *Константинова, Мая М., Савова, Радка Хр., Аршинкова, Маргарита А.*  
Новости в технологиите за лечение и контрол на тип 1 диабет 59
- *Христова, Марияна Г.*  
Патофизиологично обяснение на сърдечно-съдовите ползи от SGLT2-инхибиторите 66

**Оригинални статии**

- *Захариева, Емануела Цв., Каменов, Здравко А., Савов, Алексей С.*  
Полиморфизмът Pro12Ala при предиабет и захарен диабет тип 2 в извадка от българската популация 72
- *Колева, Даниела Ив., Орбецова, Мария М.*  
Обменно-атерогенни показатели при жени с метаболитен синдром и метаболитно здрави жени с наднормено телесно тегло/затлъстяване 81

**Клиничен случай**

- *Ботушанова, Албена Д., Ботушанов, Николай П.*  
Сравнение на сцинтиграфски образи с различни радиофармацевтици – <sup>99m</sup>Tc MIBI и <sup>99m</sup>Tc Tetrofosmin при един и същ пациент с първичен хиперпаратиреоидизъм 93

**Указания за авторите**

106

**Journal ENDOCRINOLOGIA** volume XXII, number 2, 2017**Contents****Reviews**

- *Konstantinova, Maia M., Savova, Radka Hr., Arshinkova, Margarita A.*  
Technological News in Treatment and Control of Type 1 Diabetes 59
- *Hristova, Mariyana G.*  
Pathophysiological Explanation of Cardiovascular Benefits of the SGLT2-Inhibitors 66

**Original articles**

- *Zaharieva, Emanuela Tsv., Kamenov, Zdravko A., Savov, Alexey S.*  
The Pro12Ala Polymorphism in Prediabetes and Type 2 Diabetes in a Sample of the Bulgarian Population 76
- *Koleva, Daniela Iv., Orbetzova, Maria M.*  
Metabolic and Atherogenic Parameters in Women with Metabolic Syndrome and Metabolically Healthy Overweight/Obese Women 87

**Clinical Case**

- *Botushanova, Albena D., Botushanov, Nikolay P.*  
Comparison of Parathyroid Scintigraphy with Different Radionucleotides – <sup>99m</sup>Tc MIBI and <sup>99m</sup>Tc Tetrofosmin in one and the same Patient with Primary Hyperparathyroidism 98

**Instructions to authors**

106



## Новости в технологиите за лечение и контрол на тип 1 диабет

Константинова, Мая М., Савова, Радка Хр., Аршинкова, Маргарита А.  
Катедра по Педиатрия, Медицински Факултет, Медицински Университет, София

## Technological News in Treatment and Control of Type 1 Diabetes

Konstantinova, Maia M., Savova, Radka Hr., Arshinkova, Margarita A.  
Department of Pediatrics, Medical Faculty, Medical University, Sofia

### Резюме

Представяме кратък обзор, посветен на напредъка в технологиите, свързани с подобряване и улесняване лечението и контрола на захарния диабет. През 2016 г. НЗОК започна да заплаща консумативите за лечение с инсулинови помпи, което налага по-широко осведомяване на нашата ендокринологична общност за предимствата и особеностите при лечение с инсулинова помпа.

От друга страна, непрекъснатото проследяване на гликемичните колебания чрез глюкозен сензор навлиза все повече в практиката. Нещо повече - сега е възможно проследяването да става от разстояние чрез интернет-връзка, така че родителите могат да наблюдават и при необходимост да контролират лечението дистантно. Това е възможно благодарение на създадена интернет-базирана платформа, наречена „нощни наблюдатели“ (Nightscouts). Първоначалната идея е за предпазване от нощни хипогликемии, но в следствие системата се оказва полезна за ежедневното адаптиране на инсулиновите дози както при лечение с инсулинови помпи, така и с инсулинови инжекции.

В обзора са представени особеностите на лечението с инсулинова помпа и модификациите им, довели до създаване на връзка между помпа и глюкозен сензор, с цел превенция на хипогликемиите. Последната новост е вече регламентираната през 2016 г. от FDA Medtronic

### Abstract

This is a short review of new technologies in the treatment and control of diabetes mellitus. The Health Insurance System in Bulgaria started reimbursement of the insulin pump-consumables in 2016 and it is necessary for further information to be provided by the Bulgarian Society of Endocrinology to evaluate the advantages and disadvantages of pump treatment.

On the other hand continuous glucose monitoring (CGM) is coming into practice. The opportunity to monitor the glycemic variations from distance through the internet-based platform of Nightscouts is extremely helpful for parents. The initial idea was to prevent night hypoglycemia. Later on this platform proved to be valuable for the actual adaptation of the therapy irrespective of the insulin treatment – pump or injections.

In this review the special features of insulin pump treatment are discussed as well as the new modifications of the pumps and their connection to CGMs aimed at preventing hypoglycemia. The latest news concerns the Medtronic MiniMed 670G system approved by the FDA in 2016. This system consists of a hybrid closed loop which changes the basal insulin rate according to the actual variations of the glucose values beyond the periods of eating. The patient still has to help

MiniMed 670G system, представляваща „хибридна затворена верига“ (hybrid closed loop), чрез която базалната инсулинова доза се адаптира непрекъснато според актуалните гликемични нива, но за сега – само в периодите извън приема на храна. Пациентът трябва да подпомага решението на системата с ръчно въвеждане на количеството приети въглехидрати и потвърждение на хранителния болус. Все още се изисква и калибриране на сензора с измерена с глюкомер кръвна глюкоза. Затова системата се нарича „хибридна“ и е следващата стъпка към „изкуствения панкреас“.

### Ключови думи:

инсулинова помпа, глюкозен сензор, хибридна затворена система, найтскаутс (нощни наблюдатели)

the system with manual introduction of the amount of carbohydrates and confirmation of the eating boluses. The system then requires two calibrations daily of blood glucose measured by a glucometer. This is why the system is called „hybrid“ and is the next step to an „artificial pancreas“.

### Key words:

insulin pump, glucose sensor, hybrid closed loop, nightscouts

### Въведение

Последните няколко години ежедневната практика на диabetолога е буквално заливана от все повече технологични новини, които промениха не само възможностите за контрол на захарния диабет, но и усещането, че мечтите на лекари и пациенти започват да се сбъдват. Изглеждащият невъзможен, но така желан „изкуствен панкреас“, е на път да се осъществи. Защото вече има не само желание, но и доказани успешни проекти.

2016-та година е година на триумф за този проект. За първи път в света Medtronic MiniMed 670G system беше узаконена от институцията FDA (Food and Drug Administration). Тази система се нарича „хибридна затворена верига“ („hybrid closed loop“) и е по същество „почти“ изкуствен панкреас. Казваме „почти“, защото остава още работа, докато системата, състояща се от инсулинова помпа и глюкозен сензор, свързвани помежду чрез интернет-връзка, ще бъде в състояние да дозира напълно самостоятелно инсулиновата доза според отчетеното от глюкозния сензор глюкозно ниво. За сега това става **само за периодите между храненията – за така наречените базални нужди**. За самото хранене, пациентът трябва да подпомага решението на системата с ръчно въвеждане на количеството приети въглехидрати и потвърждение на хранителния болус. Освен това, все още се изисква калибриране на сензора чрез ръчно въвеждане ни-

вото на кръвна глюкоза, измерена с глюкомер. Затова системата се нарича „хибридна“ – т.е. смесена, а не самостоятелно действаща. Но, въпреки тези условия, **автоматизираното и променящо се подаване на базалния инсулин** изисква далеч по-малко усилия от страна на пациента, в сравнение с досегашните възможности на инсулиновата помпа и глюкозния сензор. Хибридната затворена верига се състои от няколко части:

1. Глюкозен сензор;
2. Предавател на данните за тъканната глюкоза, получени от сензора (Transmitter);
3. Инсулинова помпа, от която се подава инсулин през инжекционното място;
4. Интернет-връзка, чрез която се управлява скоростта на инсулиновото инжектиране (условно скоростта можем да наречем – „инсулинова доза“);

Въпреки че в литературата, включително българската, има съобщения за принципите, особеностите, ефекта и фармако-икономическата оценка на това лечение (1-7), считаме за необходимо да дадем пояснения в най-общи линии за това какво представляват инсулиновата помпа и глюкозният сензор, тъй като в следващото десетилетие лечението на захарния диабет най-вероятно ще се свързва с тази технология. Освен това, от средата на 2016 г. у нас НЗОК заплаща консултативите за лечение с инсулинови помпи и е добре, особено специализираната медицинската общност, да бъде по-подробно запозната с това съвременно средство за лечение на захарния диабет.

## Какво представлява инсулиновата помпа и принципи на действие

Това е средство, което използвайки механична сила, инжектира непрекъснато подкожно (през игла или мека канюла) бързодействащ инсулин, най-често – бързодействащ аналог. Лечението с инсулинова помпа се нарича още „постоянна подкожна инсулинова инфузия“ (continuous subcutaneous insulin infusion, CSII).

Първата инсулинова помпа е създадена през 1978 г., наречена е „Биостатор“ и представлява голяма преносима помпа, създадена на базата на такава за дозиране на медикаменти за химиотерапия. Следват десетилетия на усъвършенстване, докато се достигне до днешните модели на малко, леко и лесно за управление устройство за интензивно лечение с инсулин. По подобие на интензивното лечение с многократни инсулинови инжекции и тук инсулиновата доза се разделя на базален инсулин и инсулинови болуси, но има две важни разлики:

✓ при инсулиновата помпа базалният инсулин се разделя по един много по-фин и физиологичен начин за цялото денонощие и

✓ инсулиновата помпа използва само бързодействащ инсулин/аналог.

**1. Базалната доза на инсулина** (заместваща бавно-действащия инсулин) се разпределя за цялото денонощие, като се дозира на много малки части, определяни като „инсулинова скорост за час“. Инсулиновата скорост може да бъде програмирана и различна на всеки 30 минути – т.е. чрез инсулиновата помпа можем да имаме 48 различни скорости през денонощието. Обичайно, обаче, денонощието се разделя на няколко „интервала“ от по 4-8 часа, които характеризират индивидуалните нужди на пациентите според възрастта, фазата на диабета, двигателната активност и други индивидуални фактори.

**2. Инсулинови болуси** – те са два вида:

**2. 1.** За покриване на нуждите при хранене – хранителни болуси;

**2. 2.** За корекция на по-високи от желаните гликемични цели – корекционни болуси.

Важно е да се отбележи, че във всяка инсулинова помпа от настоящото поколение, има опция на „болус-калкулатор/съветник“ (bolus calculator/adviser), а някои компании го идентифицират с „магьосник“ (bolus wizard). Това е **програма**, в която се внасят **двата характеризиращи всеки отделен пациент числени показатели**, чрез които се изчисляват хранителните и/или корекционните болуси. Това са:

**А. Възгледно число (отношение) –**

представлява количеството възгледно в грамаве, които пациентът усвоява или балансира с 1Е инсулин.

**Б. Инсулинова чувствителност (корекционен фактор)** – представлява фактор, показващ с колко ммол/л се намалява глюкозата след инжектиране на 1Е инсулин.

За да могат да се направят индивидуалните изчисления за хранителния или корекционния болус в болус-съветника се внасят още:

– **Прицелни (таргетни) нива** на глюкозата – желаните стойности на глюкозата преди и след храна;

– **Продължителност на действие на инсулина** – тъй като най-често се работи с бързи инсулинови аналози, се приема обичайна продължителност от 3 часа;

**Предимства на инсулиновата помпа спрямо многократните инсулинови инжекции (базално-болусен режим)**

**1. Много по-физиологично въвеждане на базалната инсулинова доза** – както се описа по-горе, това не е възможно при използване на една или дори две инжекции с бавен инсулинов аналог. Това е особено важно за децата, които през различните периоди на растеж имат различни нужди от базален инсулин през денонощието. Например, по време на пубертетния скок нуждите прогресивно нарастват след полунощ – от 2 ч. до 8 ч., т.н. феномен на зората (Dawn phenomenon). Обратно, при малката възраст – под 6 години нуждата от базален инсулин е сравнително голяма преди полунощ. Това много фино разпределение на базалната доза дава възможност както за предпазване от хипогликемии – например намаляването на дозата по време на физическо натоварване, така и за овладяване на стресови ситуации, налагащи увеличаване на базалната доза за определен интервал от време. Тук влиза в съображение и опцията „**временен базал**“ (temporary basal), който може да се програмира за няколко часа или за цяло денонощие, според индивидуалните потребности, като процент от обичайната базална доза.

**2. Намалява се рискът от хипогликемии** (8-9) по няколко механизма:

а. Правилното разпределение на базалната доза намалява риска от свръх-инсулинизиране, за да се балансират типичните за определената възраст повишавания на кръвната глюкоза, свързани с физиологичния денонощен ритъм на хормоналната секреция;

б. Много **фино дозиране на болусите** със стъпка на промяна от 0,1Е, за разлика от възможностите и на най-прецизните инсулинови

писалки, чиято минимална стъпка е 0,5 Е;

с. Избягване на „**натрупване**“ на **инсулин** при по-чести корекции за хипергликемия. Инсулиновата помпа не разрешава подобно натрупване, защото изчислява остатъчния инсулин от предходния болус и намалява следващия или направо го отказва, ако все още има достатъчно действащ инсулин след предходния болус.

**3. Постигане на изключителна прецизност и индивидуализиране** на лечението според физиологичния генонощен ритъм на контраинсуларните хормони. Това се получава, защото освен казаното до сега, **всички индивидуални показатели за инсулинова чувствителност и възгледно число**, могат да се програмират така, че да се различават за всеки час, или поне за определени интервали от генонощето. Това означава, че изчислените болуси за едно и също количество възгледно число се различават според това, в кой час на генонощето пациентът ще се храни – закуска, обяд или вечеря. По същия начин и корекциите за една и съща хипергликемична стойност се различават според часа от генонощето, за който се прилагат. Трябва да се подчертае, че при по-ниско ниво от таргетната глюкоза преди съответния болус, болус-съветникът изчислява съответно по-малък болус.

**4. Възможност за прилагане на различни типове болуси** с удължено или променено действие, които покриват по-ефективно различните видове храни – по-бедни или по-богати на животински мазнини и белтъчини. Това са **квadratният и двойно-вълновият болус**. Те се избират от пациента съобразно приетата храна:

– **квadratен болус** – определената доза се въвежда с равномерна скорост за определения период от време, което може да трае от минути до часове;

– **двойно-вълнов болус** – определената доза се въвежда в 2 части, които се определят като процент от цялата доза за първата и втората му част, например 40-60% за 1 час. Възможни са различни модификации, според качеството на приеманата храна.

Самите пациенти, особено тези които използват едновременно и глюкозни сензори, могат да променят параметрите на болусите, покриващи различните типове храна. Въз основа на подобни наблюдения е придобил гражданственост т.н. „лица“ болус. Той е с обичайна продължителност от 3-4 часа, а двете вълни – съответно могат да са 40% и 60%. По този начин по-голямата част от болуса се въвежда по-късно, когато започват да се усвояват мазнините и белтъчините от пицата, а първоначално приложените 40% покриват възгледните, които

се усвояват по-бързо.

**5. Необходимо е да се изтъкне още едно голямо предимство на лечението с някои от използваните у нас инсулинови помпи (Медтроник) – възможността за детайлно проследяване на цялостното лечение.** Това става чрез сваляне на запааметените данни в помпата от специален софтуер. Данните се обработват статистически и на пациента, както и на лекаря, се предоставят както крайните резултати, така и много детайлно ежедневните данни по часове и минути за всяко събитие: базална доза – размер и % от общата генонощна доза; болуси – час, вид, размер, евентуални отклонения от изчислената от болус-калкулатора доза; честота на смяна на сетовете и резервоара. Очертава се цялостната картина на лечението и се търсят възможности за промяна на индивидуалните параметри, за да се получи максимално добър гликемичен контрол. Тази възможност е особено ценна, защото пациентът и лекарят анализират реалните факти, без възможност за манипулация (както се случва не рядко).

Всичко това не е възможно да се постигне чрез инсулинови инжекции, поради което лечението с инсулинови помпи става все по-желано и високо оценявано. В големия списък от публикации, потвърждаващ благоприятния ефект от лечението с инсулинови помпи, фигурира и нашият, макар и ограничен опит в този аспект (1,3,6,7). Обнадеждаващи са и нашите последни данни за значително подобрен контрол при пациентите с инсулинови помпи, чиито консумативи се реимбурсират от НЗОК. Тези данни ще бъдат обект на отделно съобщение.

### Шо е то глюкозен сензор (Continuous Glucose Monitoring - CGM)

Това е портативно устройство, измерващо и онагледяващо глюкозната концентрация почти непрекъснато – през интервали от 1-5 минути за няколко последователни дни, най-често – 7 дни. CGM сензорите се състоят от три елемента: **носител** на химически агент, **предавател** (трансмитер) и **четец**.

Обичайната технология е натопарване с определен химически агент (най-често с ензима глюкозо-оксидаза) на **носител** (подобен на иглика), който се инжектира подкожно и реагира с глюкозата в подкожната тъкан. При химическата реакция се създава електрически потенциал, чиято стойност се регистрира, преобразува се

в стойност на глюкоза и се предава чрез **трансмисивен до четеца, на който се вижда стойността на отчетената глюкоза в интерстициалната подкожна тъкан.**

**Най-новите модификации** сензори разполагат с възможност глюкозните нива да се четат на **смартфон** чрез включване на достъпно в интернет-приложение.

Простото изчисление показва, че сензорът отчита 288 стойности на глюкозата за денонощие. Спрямо обичайното **максимално** 7-10кратно изследване **на кръвната глюкоза** и при най-мотивирани пациенти със захарен диабет, предимствата на глюкозния сензор са несъмнени. Благодарение на денонощното проследяване на гликемичните колебания при различни ситуации, като допълнително заболяване, прием на различни храни или променящо се двигателно натоварване, пациентите имат много по-големи възможности за анализ гликемичните нива и съответно – за по-успешен контрол. Последните модификации на сензорите са много по-точни и показват все по-близки до **кръвната глюкоза** стойности. Въпреки това, все още промяна **в дозирането на инсулина** става само след контролно изследване на кръвната глюкоза от периферна кръв. Продължава усъвършенстването на сензорите по отношение на тяхната точност и възможност за избягване на калибрирането им с периферна кръв.

Има съобщения за използване и на други технологии за отчитане на глюкозата, напр. от повърхността на кожа или лигавица, които да са още по-безболезнени и да се надяваме точни.

В момента в нашата страна има „бум“ на закупуване на сензори от родителите на наши пациенти със захарен диабет, които са на лечение с инсулинови инжекции, а не само на инсулинови помпи. Големият обем от данни, възможностите да се видят т.н. модели на гликемичните екскурзии в денонощието, е от изключителна помощ за пациента и лекаря: избягват се тежки хипогликемии, променят се дозите така, че да отговарят на индивидуалните нужди. Ползването на глюкозен сензор е следващото още по-високо стъпало, което вече се налага като по-добър стандарт за диабетна грижа в света.

В това отношение трябва да споменем още една изключително ценна възможност, която дават глюкозните сензори – непрекъснатата информация за актуалните гликемични нива на пациентите от техни близки или медицински персонал - чрез он-лайн връзка. Тази платформа е дело на родители и близки на пациенти със захарен диабет, нарича се „**Nightscout**“ (нощни наблюдатели) и създаването ѝ е провокирано най-вече

от страха от нощни хипогликемии. В последствие, обаче, се оказва изключително ценен елемент за осъществяването на все по-добър контрол, предпазване от хипогликемии, както и корекции при нежелани хипергликемии. Въоръжени с тази специална система от глюкозен сензор и телефон (или компютър) със съответното интернет-приложение, родителите на много наши пациенти вече са по-спокойни: те са в състояние от разстояние (от другата стая или в детското заведение/ училище) да наблюдават гликемичните екскурзии при децата си. Това им дава възможност и да предприемат съответни адекватни мерки абсолютно навреме (Фиг. 1).

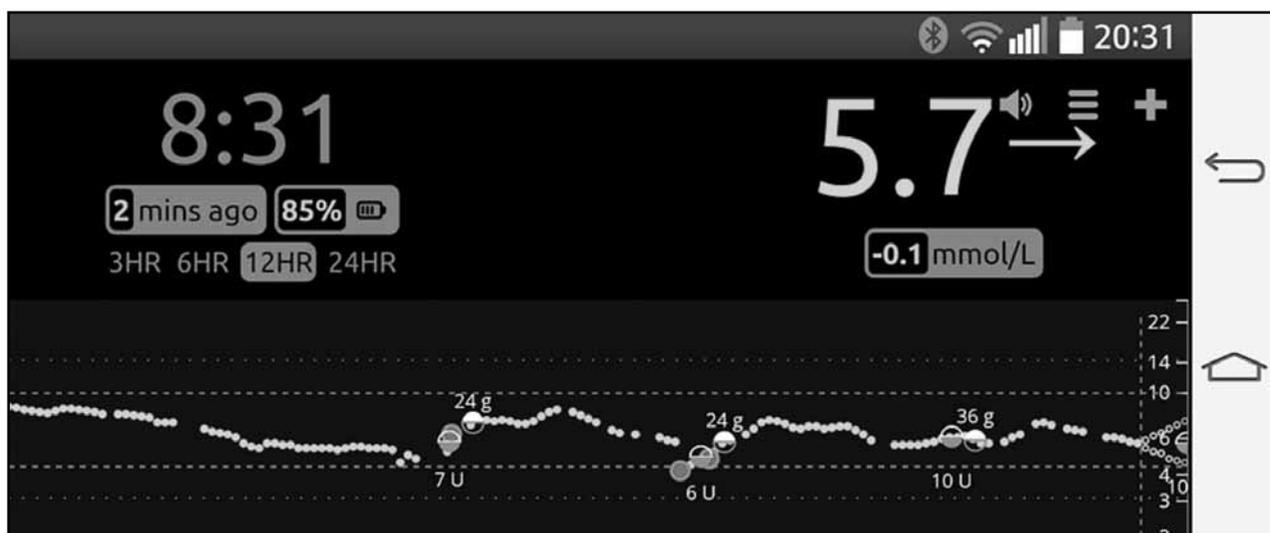
### **Връзка между инсулинова помпа и глюкозен сензор – история на развитието?**

Очакваната следващата стъпка беше да се свържат двете устройства и да се „затвори веригата“ по подобие на панкреасната  $\beta$ -клетка, която непрекъснато проследява нивото на кръвната глюкоза и съобразно с това променя скоростта на инсулиновата секреция. Това обаче стана чрез няколко постепенни усъвършенствания, на които сме свидетели:

**1. Sensor-augmented pump** (усилена, или по-скоро подобрена чрез сензор) помпа показва своите предимства. Вече не само дозирането на инсулина е много по-физиологично, но непрекъснатото наблюдение на резултатите от това лечение, възможността за съвременна реакция при застрашаваща хипогликемия, или обратно - поставяне на допълнителен корекционен болус при повишаваща се глюкоза даде нов тласък в контрола на захарния диабет. Страхът от хипогликемии се преодоля частично, а постигането на много по-малки вариации на гликемията става реалност. Но всичко това може да става само **с активното участие на пациента – той трябва да наблюдава и коригира лечението си.**

2. Появи се възможност да се премине към следващото ниво за автоматизирана връзка между двата компонента. Пробив в това отношение беше създадената връзка между **Veo-помпата** на Медтроник с глюкозния сензор Enlite (Medtronic). Четецът на сензора е в самата помпа, като на нейния екран се наблюдават вариациите на глюкозата: не само абсолютните им стойности, но и тенденциите за намаляване или повишаване, чрез насочени надолу или нагоре стрелки. При поддържане на непрекъснатата връзка между сензора и помпата, Veo-помпата има опция **да спира базалната** инсулинова инфузия

**Фигура 1.** 12-часово дистантно наблюдение чрез платформата „Nightscout“ на глюкозните екскурзии и проведеното лечение при пациентка с 4-кратен инсулинов режим (инсулинови инжекции).



**Бележка** На фигурата е представен резултат от 12-часово проследяване на глюкозните нива чрез сензор, свързан с найтскаут при пациентка на лечение с интензивен режим с инсулинови инжекции. Вижда се освен актуалната за момента интерстициална глюкоза от 5,7 ммол/л, нейната стабилност (хоризонталната стрелка), както и проследената за 12-часовия период измервана на всеки 5 минути глюкоза. През целия период глюкозата се движи в оптималните граници, заложили в сензора – между 4,4 и 10,0 ммол/л, ограничени с прекъснатите линии. Освен това се виждат и направените дози инсулин, както и количеството (и часа) на приетите въглехидрати с храната.

при ниво на глюкозата под таргета. Ето защо, този тип помпа се нарича **Low glucose suspend** (спиране при ниска глюкоза). Максималният период на спиране на базала е 2 часа, след което помпата автоматично продължава базалната инфузия, защото в противен случай пациентът може да изпадне в кетоацидоза. Ако обаче пациентът реагира своевременно и хипогликемията се преодолее, базалната инфузия не се прекратява. Тази първа действаща връзка „помпа-сензор“ предотвратява още по-добре хипогликемиите, особено по време на сън – основен приоритет за всяка новост в лечението на захарния диабет (8). Нашият опит с Veo-помпа и сензор показва отлични резултати, и то при най-малките ни пациенти на възраст под 6 години (6).

3. Следващата стъпка към още по-надежден вариант за предпазване от хипогликемия е т.н. **Predictive Low Glucose Suspend /PLGS/** – спиране на базалната инфузия при **предполагам** риск за хипогликемия. Този тип помпа, за съжаление, не е достъпна у нас и нямаме опит с нея, но литературните данни потвърждават нейната голяма ефективност (9).

Следователно, проблемът с риска и предпазването от тежки хипогликемии беше технологично разрешен.

4. Постава се следващото предизвикателство към затваряне на веригата – **контрол и на хиперглицемичните стойности**. Макар и за сега само между храненията, създаденият модел на хибридна затворена система е поредната успешна крачка. Освен цитираната в началото Medtronic MiniMed 670G system, през 2017 г. и 2018 г. се очакват групи подобни решения от други компании, като все повече опит се добива в напълно нормални за пациента – домашни условия (10, 11).

5. Не трябва да пропуснем да споменем и идеята за т.н. **бионен панкреас** – помпа с която ще се инжектира не само инсулин, но и глюкагон. Очакванията на създателите е в средата на 2017 г. да се проведе пилотен проект, а в края на 2018 г. този тип помпа да бъде одобрена официално от FDA.

В момента се провеждат експерименти и с други системи на изкуствен панкреас, за някои от които вече има публикувани данни (12,13,14).

В много близкото бъдеще се очаква да станем свидетели на дълго очакваната система, заместваща пълноценно и с минимални усилия за пациентите увредената панкреасна жлеза при захарен диабет.

1. **Konstantinova M.** Principles of treatment with insulin pump. Bulgarian experience in treatment with insulin pump. *Pediatrics* 2010; 3: 39-42. (In Bulgarian) (**Константинова М.** Принципи на лечение с инсулинова помпа. Българският опит в лечението с инсулинова помпа. *Педиатрия* 2010; 3: 39-42).
2. **Konstantinova M.** We are on the threshold of the artificial pancreas. Insulin is injected with an insulin pump in the most physiological and perfect way. *Prakticheska pediatria* 2011; 11: 3-5. (In Bulgarian) (**Константинова М.** На прага сме на изкуствения панкреас. С инсулинова помпа се инжектира инсулин по най-физиологичния и свършен начин. *Практическа педиатрия* 2011; 11: 3-5).
3. **Petkova E, Petkova V, Konstantinova M, Petrova G.** Economic evaluation of continuous subcutaneous insulin infusion for children with diabetes - part II. *Modern Economy* 2013; 4: 9-13.
4. **Petkova E, Petkova V, Konstantinova M, Petrova G.** Economic evaluation of continuous subcutaneous insulin infusion for children with diabetes - a pilot study: CSII application in children - economic evaluation. *BMC Pediatrics* 2013; 13:155-160.
5. **Petkova E, Petkova V, Dimitrova M, Petrova G, Konstantinova M.** Children with diabetes. The treatment effect of continuous insulin infusion. *Social Pharmacy* 2014. Национальный Фармацевтический Университет. Кафедра Социальной фармации. Міжнародна науково-практична интернет-конференция Социальні фармації. Харков Матеріали 2014; 73- 75.
6. **Konstantinova M, Arshinkova M, Savova R.** Insulin pump treatment in children aged 3.0 - 6.0 years in Bulgaria: Sustaining the optimal control. *Intern J Development Res* 2015; 5(2):3467-3472.
7. **Szypowska A, Schwandt A, Svensson J, Shalitin S, Cardona-Hernandez R, Forsander S, et al.** the SWEET Study Group. Insulin pump therapy in children with type 1 diabetes: analysis of data from the SWEET registry. *Pediatric Diabetes* 2016; 17 (S23): 38-45.
8. **Danne T, Kordonouri O, Holder M, Haberland H, Golembowski S, Remus S, Bl?sig S, et al.** Prevention of hypoglycemia by using low glucose suspend function in sensor-augmented pump therapy. *Diabetes Technol Ther* 2011; 13(11): 1129-1134.
9. **Buckingham B, Cobry E, Clinton P, Gage V, Caswell K, Kunselman E, et al.** Preventing hypoglycemia using predictive alarm algorithms and insulin pump suspension. *Diabetes Technol Ther* 2009; 11(2): 93-97.
10. **Kovatchev B, Cheng P, Anderson S M, Pinsker J E, Boscari F, Buckingham BA, et al.** Feasibility of Long-Term Closed-Loop Control: A Multicenter 6-Month Trial of 24/7 Automated Insulin Delivery. *Diabetes Technol Ther* 2017; 19(1): 18-24.
11. **Russel SJ, El-Khatib F, Sinha M.** Outpatient glycemic control with a bionic pancreas in type 1 diabetes. *New Engl J Med* 2014; 371-374.
12. **Weinzimer S, Steil G, Swan K.** Fully automated closed-loop insulin delivery versus emiautomated hybrid control in pediatric patients with type 1 diabetes using an artificial pancreas. *Diabetes Care* 2008; 31:934-939.
13. **Thabit H, Tauschmann M, Allen JM, Leelarathna L, Hartnell S, Wilinska ME, et al.** for the APCam consortium and ap@home consortium. Home use of an artificial beta Cell in type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2015; 373:2129-2140.
14. **Garg SK, Weinzimer SA, Tamborlane WV, Buckingham BA, Bode BW, Bailey TS, et al.** Glucose outcomes with the in-home use of a hybrid closed-loop insulin delivery system in adolescents and adults with type 1 diabetes. *Diabetes Technol Ther* 2017; 19 (3): 155-163.

*Address for correspondence:***Мая Константинова**

Категра по Педиатрия, МУ, София,  
СБАЛДБ – бул. „Академик Иван Гешов“ 11  
1606 София, България  
e-mail: maiakonstantinova@gmail.com

**Maia Konstantinova**

Department of Pediatrics, MU, Sofia,  
University Pediatric Hospital,  
11, „Acad. Ivan Geshov“ blvd.  
1606 Sofia, Bulgaria  
e-mail: maiakonstantinova@gmail.com

## Патофизиологично обяснение на сърдечно-съдовите ползи от SGLT2-инхибиторите

Христова, Марияна Г.

ЕТ АИПСМП „Д-р М. Христова, Варна“

## Pathophysiological Explanation of Cardiovascular Benefits of the SGLT2-Inhibitors

Hristova, Mariyana G.

Division of Endocrinology, Medical center of Varna,

### Резюме

През 1986 г. проф. Рита Леви Монталчини получи Нобелова награда за медицина за своето фундаментално откритие на растежния фактор за нервите – Nerve Growth Factor (NGF) и невротрофините, развито в последствие като невротрофна теория. Днес тя намира приложение в много клонове на биомедицинската наука. През последните 20 години се натрупаха много научни факти и невротрофната теория беше транслирана в клиничната практика като невротрофна теория за патогенезата на метаболитен синдром и захарен диабет тип 2.

Чрез намаляване на хипергликемията по неинсулинозависим начин SGLT2-инхибиторите редуцират инсулиновата секреция, липогенезата и така намаляват висцералната мастна тъкан. Това води до намаляване на произвежданите от нея проинфламаторни цитокини и намалява инсулиновата резистентност. Другият компонент от действието на SGLT2-инхибиторите – засилената натриуреза води до увеличаване на калия в плазмата. Това нормализира съотношението калий/калций в плазмата и така се овладява симпатикотонията. Всички тези механизми намаляват хипергликемията, телесното тегло и артериалната хипертония. Невротрофините имат структурна хомология с про-

### Abstract

In 1986, Prof. Rita Levi-Montalcini was awarded the Nobel Prize for Physiology and Medicine for her fundamental discovery of nerve growth factor (NGF) and neurotrophins that subsequently developed into neurotrophic theory which is currently used in many fields of biomedical science. In the subsequent 20 years, a large number of scientific facts were accumulated and the neurotrophic theory has been transformed into clinical practice as the neurotrophic theory of the pathogenesis of metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus.

By decreasing hyperglycemia through a non-insulin dependent mechanism, SGLT2-inhibitors also reduce insulin secretion; this reduces lipogenesis and visceral adipose tissue, plasma and tissue levels of adipocytokines. Then, insulin resistance reduction follows. The other component of SGLT2 inhibitor activity, namely the inhibition of sodium reabsorption takes part in the process of sympathetic tone reduction. Increased natriuresis is followed by reduced kaliuresis. Today, neurotrophins are known as mediators of many biological phenomena caused by their neurotrophic, metabotropic, epitheliotropic, and immunotrophic effects. Enhancing the beneficial effects of these neuro trophins can

---

инсулина. При захарен диабет тип 2 и метаболитен синдром те са понижени. Намаляването на мастната тъкан и нискостепенното хронично възпаление под действие на SGLT2-инхибиторите повишава експресията на рецепторите на невротрофините. Така се изясняват техните метаботрофно, епителотрофно, невротрофно и имунотрофно действие. Редуцира се апетитът, телесното тегло намалява, подобряват се инсулиновата секреция, възлехидратният и липидният метаболизъм. Невро-ендокрино-имунният баланс се „рестартира“ чрез нормализиране на плазмените и тъканни нива на невротрофините. Възстановява се балансът между възпалителни и антивъзпалителни адипоцитокени в мастната тъкан. Всичко това води до невропротективно, кардиопротективно и вазопротективно действие на SGLT2-инхибиторите.

#### **Ключови думи:**

захарен диабет тип 2, невротрофини, SGLT2-инхибитори, сърдечно-съдови ползи

---

be expected, i.e. reducing appetite, increasing insulin secretion, weight reduction as well as improvement of carbohydrate and lipid metabolism. Body neuro-endocrine-immune balance is „restarted“ by normalizing neurotrophins tissue and plasma levels. The balance between inflammatory and anti-inflammatory adipocytokines in adipose tissue is restored. All this leads to neuroprotective, cardio protective and vascular protective effects and to substantial cardiovascular benefits of SGLT2-inhibitors.

#### **Key words:**

Type 2 diabetes, neurotrophins, SGLT2-inhibitors, cardiovascular benefits

---

През 1986 г. проф. Рита Леви Монталчини получи Нобелова награда за медицина за своето фундаментално откритие на растежния фактор за нервите – Nerve Growth Factor (NGF) и невротрофините, развито в последствие като невротрофна теория на Рита Леви Монталчини. Днес тя намира приложение в много клонове на биомедицинската наука. През последните 20 години се натрупаха много научни факти и невротрофната теория беше транслирана в клиничната практика като невротрофна теория за патогенезата на метаболитен синдром и захарен диабет тип 2 (Тип 2 ЗД) (1,2).

Медицинската хипотеза за невротрофната теория беше разработена и доказана чрез проучванията на много изследователи в света (1). Тази хипотеза заема седмо място сред топ 25 на цитираните в Scopus публикации в сп. Medical Hypotheses между м. април и м. юни 2006 г. В Web of Science (Thomson Reuters, USA) посочената публикация на автора е единадесетата най-цитирана сред всичките 608 публикувани в това списание за 2006 г. През м. декември 2016 г. тази публикация (1), беше цитирана в Web of Science 49 пъти. Историята на

невротрофната теория за метаболитен синдром беше систематизирана от автора в монография (3).

Установено е, че при 89% от пациентите с Тип 2 ЗД и при 20% от пациентите с Тип 1 ЗД се касае за метаболитен синдром. Невротрофната теория за патогенезата на Тип 2 ЗД, висцералното затлъстяване и метаболитния синдром поставя хроничният възпалителен и/или психоемоционален дистрес като основен етиологичен фактор. Той е свързан с повишени тъканни и плазмени нива на проинфламаторните цитокини – IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ . Те водят до промени в плазмените нива на невротрофините *NGF* и произведен от мозъка невротрофен фактор – Brain-Derived Neurotrophic Factor (*BDNF*) – от компенсаторното им увеличаване в началото на заболяването до значителното им намаляване (**хипоневротрофинемия**) при пациентите с Тип 2 ЗД и метаболитен синдром (1,2). В потвърждение на невротрофната теория за ранно развитие на атеросклероза като последица от хипоневротрофинемията при Тип 2 ЗД и метаболитен синдром са данните и на други автори (2). До момента всички изследователи са единодушни

по следните тези:

**Теза 1:** Мастната тъкан е ендокринен орган. При Тип 2 ЗД и метаболитен синдром е увеличена висцералната мастна тъкан и съществува нискостепенно възпалително състояние със системно възпаление в абдоминалната мастна тъкан, която произвежда **адипоцитокени**. Това са проинфламаторни и антиинфламаторни цитокини, растежни фактори, невротрофини, хормони и други.

**Теза 2:** При Тип 2 ЗД и метаболитен синдром съществува инсулинова резистентност – основен патогенетичен фактор.

**Теза 3:** С-реактивният протеин (CRP) е характерен признак за Тип 2 ЗД и метаболитен синдром. CRP показва сигнификантна връзка с инсулиновата резистентност и кардиоваскуларните усложнения (1,2,4,5).

**Теза 4:** IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  - засилват инсулиновата резистентност и хиперинсулинемията.

**Теза 5:** При Тип 2 ЗД и метаболитен синдром съществува симпатикотония.

**Теза 6:** При Тип 2 ЗД и метаболитен синдром има хипоневротрофинемия.

**Теза 7:** При Тип 2 ЗД и метаболитен синдром е свръхактивирана оста хипоталамус-хипофиза-надбъбрек, последвано от хормонален дисбаланс:

- хиперлептинемия
- хиперинсулинемия
- хиперкортизолемия
- хипосоматотропизъм
- хипотиреоидизъм
- хипогонадизъм при мъжете и повишен тестостерон при жените.

**Теза 8:** Тип 2 ЗД и метаболитен синдром са хронични прогресиращи заболявания. С напредване на възрастта нараства и броят на компонентите (АХ, хиперурикемия, дислипидемия, нараства висцералното затлъстяване, влошава се хипергликемията). Рискът от смъртност нараства с нарастване на броя на компонентите (6,7).

**Теза 9:** При Тип 2 ЗД и метаболитен синдром има имносупресия и чести фокални инфекции.

**Теза 10:** При Тип 2 ЗД и метаболитен синдром прогресират микро и макроваскуларните увреждания, ранната атеросклероза с голям риск от кардио-васкуларни усложнения.

### Патофизиологично обяснение на сърдечно-съдовите ползи от приложение на SGLT2-инхибиторите в светлината на невротрофната теория

Направените до сега проучвания показват, че SGLT2-инхибиторите ефикасно подобряват:

- гликемичния контрол – понижават плазмената глюкоза и HbA<sub>1c</sub>
- понижават триглицеридите и повишават HDL-холестерол
- понижават артериалното кръвно налягане
- понижават хиперурикемията
- намаляват мастната тъкан и телесното тегло
- намаляване на сърдечно-съдовата смъртност (8)

Как става това? Отговор чрез невротрофната теория:

Като намаляват хипергликемията по неинсулинозависим механизъм, SGLT2-инхибиторите намаляват и секрецията на инсулин, а това намалява **липогенезата, намалява се висцералната мастна тъкан**. Това е първият ключов момент и води до намаляване на плазмените и тъканни нива на адропитокините IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ . Последва **намаляване на инсулиновата резистентност**.

**Втори ключов момент** - отговор на Тези 1, 2, 3, 4 - последва повишена чувствителност на инсулиновите рецептори и това допълнително спомага за нормализиране на плазмената глюкоза и контрола на ЗД.

Доказано е, че проинфламаторните цитокини, освен съучастие в инсулиновата резистентност водят до дисфункция и възможна деструкция на панкреасните  $\beta$ -клетки (9-11). Затова като намаляват висцералната мастна тъкан и проинфламаторните цитокини, SGLT2-инхибиторите подобряват  $\beta$ -клетъчната секреция на инсулин и на невротрофините. Известно е, че засилената инсулинова секреция се осъществява при наличие на калций. Настъпва придвижване на калциеви йони от плазмата към  $\beta$ -клетките. Там е открит калмодулин, който свързва йонизирания калций и служи като резервоар и регулатор на освобождаването на калциевите йони, необходими за инсулиновата секреция. Намаляването на висцералната мастна тъкан води до намаляване на **лептина**. Според невротрофната теория – точно хиперлептинемията, хиперинсулинемията и засилената липогенеза водят до **симпатикотония**.

Понижаването на инсулина, лептина и намалената липогенеза под въздействието на SGLT2-инхибиторите намалява **симпатиковият тонус**. Това довежда до намаляване на артериалната хипертония, намалява тахикардията, намалява вазоконстрикцията и се разширява лумена на кръвоносните съдове, подобряват се перфузията и оксидативният стрес. Намаляването на симпатикотонията води до понижаване на апетита (на ниво хипоталамус) и допълнително намаляване **на висцералната мастна тъкан**, а от там допълнително намаляване на проинфламаторните цитокини и хроничното **възпаление** – отговор на Теза 5.

Всички посочени до тук благоприятни ефекти са последица от инхибиращия ефект на SGLT2-инхибиторите върху глюкозната реабсорбция и намаляване на хиперглицемията, **независимо от ендогенната инсулинова секреция**. В намаляването на симпатикотонията, съучаства и другият компонент от инхибиторното действие на SGLT2-инхибирането, а именно инхибирането на натриевата реабсорбция. Засилената натриуреза се последва от **намалена калиуреза**, а както вече беше споменато има пренасочване на калциеви йони към  $\beta$ -клетките. Това променя съотношението калий/калций в плазмата, като го изтегля в посока на нарастване на калия. Известно е, че тонусът на вегетативната нервна система се определя от съотношението калий/калций, което нормално е между 1,9-2,06. Когато това съотношение е под 1,9 съществува симпатикотония. **Ликвидирането на симпатикотонията** е третият ключов момент в действието на SGLT2-инхибиторите.

### Как SGLT2-инхибиторите повлияват хипоневротрофинемията?

Невротрофините са познати днес като медиатори на много биологични феномени, предизвикани от техните невротрофни, метаболитни, епителотрофни и имунотрофни ефекти. Тези ефекти са изключително важни за поддържане на кардиометаболичната хомеостаза (глюкозен и липиден метаболизъм, енергиен баланс, кардиопротекция, нефропротекция, невропротекция, ренопротекция).

NGF и BDNF са сигнали молекули за нервната, ендокринната и имунната системи и поддържат баланса между тях. Нервните, ендокринните и имунните клетки експресират рецептори за NGF и BDNF и ги секретират: (1, 2, 4). NGF и BDNF като метаболитни:

- NGF има структурна хомология с проинсулин.

- NGF/BDNF се продуцират от панкреасните  $\beta$ -клетки и имат инсулинотропен ефект.

- NGF/BDNF са трофични фактори за панкреасните  $\beta$ -клетки, а също така те подпомагат  $\beta$ -клетъчната трансплантация.

- NGF повишава експресията на LDL-рецептор-свързващия протеин.

- NGF подобрява антиоксидантната хомеостаза.

- NGF/BDNF намаляват приема на храна.

- NGF подобрява диабетната еректилна дисфункция.

- Здравословният начин на живот повишава мозъчните и/или циркулиращите нива на NGF/BDNF.

- Атерогенните рискови фактори (богата на мазнини диета) намаляват NGF/BDNF.

- Плазмените нива на NGF са намалени при диабетна невропатия и при метаболитен синдром.

Известно е, че NGF има структурна хомология с проинсулин. Затова логично е да се предположи, че по подобие на инсулиновите рецептори, настъпва понижена експресия („down“ - **регулация**) **на рецепторите** за NGF и BDNF заедно с хипоневротрофинемията при условията на повишени проинфламаторни цитокини и повишен кортизол при пациенти с Тип 2 ЗД и метаболитен синдром.

Намалението на хроничното възпаление и IL1, IL-6, TNF- $\alpha$ , а в последствие и на кортизола под действие на SGLT2-инхибиторите би довело до „up“-**регулация на рецепторите за NGF и рецепторите за BDNF**. NGF има централен регулаторен и метаболитен ефект, въздействайки повишаващо на имунореактивността на главния орексигенен невротрансмитер невропептид тирозин (NPY) и на CRH (12). Така може да се очаква засилване на благоприятните ефекти на тези невротрофини - намаляване на апетита и приема на храна, засилване на  $\beta$ -клетъчната инсулинова секреция и благотворно действие върху въгледигрантната и липидната обмяна и редуция на теглото. Увеличеното секретиране на NGF, BDNF от панкреасните  $\beta$ -клетки, от слюнчените жлези, от мастоцитите, а чрез тях и от микроглиалните клетки на хипоталамуса, ще засили епителотропното действие на NGF/BDNF върху епитела на кръвоносните съдове. Това подобрява ендотелната дисфункция и намалява микроалбуминурията. По паракринен път увеличеният брой на мастоцитите и секретираният от тях NGF и хистамин ще намалят тромбообразуването, коагулаци-

онната активност. Локално секретирани в стената на кръвоносните съдове NGF/BDNF подобряват трофиката на съдовете и намаляват образуването на атерогенните плаки, подобрява се перфузията на кислорода (13) – **Отговор на Теза 6.**

Намаляването на висцералната мастна тъкан след приложение на SGLT2-инхибиторите води до намаляване и на хормоналния дисбаланс – **Теза 7.** Известно е, че част от висцералната мастна тъкан е разположена около органите – сърце, бъбреци надбъбреци, около кръвоносните съдове, яйчници, простата, лимфни възли. Тази органо-асоциирана мастна тъкан регулира функциите на съответните органи авто и паракринно чрез адипоцитокините, които секретират. Мастната тъкан е ендокринен орган, комуникиращ и с мозъка (чрез лептина, NGF, BDNF) и с периферните тъкани (1, 2, 4).

Увеличената висцерална мастна тъкан около надбъбреците, чрез адипоцитокините по паракринен път засилва продукцията на кортизол, алдостерон, катехоламини, полови стереоидни хормони от надбъбреците. Повишената продукция на ангиотензиноген от мастната тъкан активира ренин-ангиотензин-алдостероновата система. Всичко това, заедно със симпатикотонията води до артериална хипертония при Тип 2 ЗД. Това обяснява връзката между хипергликемия и хипертония. SGLT2-инхибиторите като намаляват мастната тъкан намаляват проинфламаторните цитокини, намаляват симпатикотонията, намаляват хиперактивацията на оста хипоталамус-хипофиза-надбъбрек и подобряват баланса на хормоните – **четвърти ключов момент.**

- намалява лептинът
- намалява кортизолът
- намалява алдостеронът
- намаляват катехоламините

Адреналните хормони участват в регулацията на NGF и неговия рецептор. Продължителният хиперкортизолизъм действа контра-регулаторно и намалява секрецията на NGF на централно ниво, а също и от слюнчените жлези. Най-важният таргетен орган за NGF е надбъбрекът (12, 14).

Известно е, че високите плазмени нива на кортизола са причина за лептинова резистентност. При намаляване на плазмения кортизол се увеличава секрецията на NGF, BDNF и се възстановява feed-back механизмът за регулация на ниво хипоталамус. В резултат на това се потиска апетитът и приемът на хра-

на. Високите кортизолови нива при метаболически синдром и Тип 2 ЗД са причина за имносупресия (намаляват мастоцитите, намалява NGF) и чести възпалителни заболявания при тези пациенти. Намаляването на хормоналния дисбаланс и повишаване на NGF овладява имносупресията и честите възпаления – **отговор на Теза 9.**

Благоприятното повлияване на невротрофините е пети ключов момент. С това се намаляват сърдечно-съдовите рискови фактори, забавя се атеросклерозата (13) и настъпват сърдечно-съдовите ползи от приложение на SGLT2 – **отговор на Теза 8 и Теза 10.**

### В заключение

Чрез нормализиране на тъканните и плазмени нива на NGF и BDNF се „рестартира“ невро-ендокрино-имунният баланс в организма. Възстановява се балансът между инфламаторни и анти-инфламаторни адипоцитокини в мастната тъкан. Всичко това води до невропротективно, кардиопротективно, нефропротективно и съдовопротективно действие и до сърдечно-съдови ползи от SGLT2-инхибиторите. Бъдещи проучвания на кардиоваскуларните ползи от лечението със SGLT2-инхибитори, включващи изследване на проинфламаторни цитокини, невротрофини, хормонални изследвания и други, биха дали отговор на неясните до момента въпроси.

### Благодарности

*Изразявам дълбока благодарност към проф. Луиджи Алое и д-р Марко Фиоре от Института по Невробиология и молекулярна медицина в Рим, Италия, към проф. Георги Чалдъков и доц. Петър Генов от Медицински университет - Варна, за оказаната ми помощ и подкрепа при изследването на невротрофините и мастоцитите.*

1. **Hristova MG, Aloe L.** Metabolic syndrome - neurotrophic hypothesis. *Med Hypotheses* 2006; 66: 545-549.
2. **Geroldi D, Minoretta P, Emanuele E.** Brain-derived neurotrophic factor and the metabolic syndrome: more than just a hypothesis. *Med Hypotheses* 2006; 67: 195-196.
3. **Hristova M.** Metabolic syndrome - History of neurotrophic theory. *Monography, LAMBERT -Academic publishing*, 2014.
4. **Hristova MG.** Metabolic syndrome - from the neurotrophic hypothesis to a theory. *Med Hypotheses* 2013; 81:627-634.
5. **Hristova M.** Metabolic syndrome and neurotrophins: Effects of metformin and non-steroidal anti-inflammatory drug treatment. *Eur J Med* 2011; 43:141-145.
6. **Ford E, Li C, Zhao G.** Prevalence and correlates of metabolic syndrome based on harmonious definition among adults in the US. *J Diabetes* 2010; 2: 180-193.
7. **Thomas G, Phillips A, Carroll D, Gale C, Batty G.** The metabolic syndrome adds utility to the prediction of mortality over its components. The Vietnam Experience study. *Atherosclerosis* 2009; 210: 256-261.
8. **Inzucchi S, Zinman B, Wanner C, Ferrari R, Fitchett D, Hantel S, et al.** SGLT-2 inhibitors and cardiovascular risk: proposed pathways and review of ongoing outcome trials. *Diabetes Vasc Disease Res* 2015; 12(2) 90-100.
9. **Hiriart M, Velasco M, Garcia C, Larqu C, Albarado A, Soto C, et al.** Pancreatic  $\beta$ -cells in metabolic syndrome. *Research Gate* 2015; 817-844.
10. **Ruscitti P.** Efficacy of inhibition of IL-1 in patients with rheumatoid arthritis and type 2 diabetes: two case reports and review of the literature. *J Med Case Rep* 2015; 9:123.
11. **Donath MY.** Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start. *Nat Rev Drug Discov* 2014; 13:465-76.
12. **Alleva E, Aloe L.** NGF effects on neurobehavioral regulations of mice and humans. *Riv Psichiatr* 1998; 33: 67-73.
13. **Chaldakov G, Fiore M, Hristova M, Genev P, Tonchev A, Aloe L, et al.** Neurotrophin presence in human coronary atherosclerosis and metabolic syndrome: a role for NGF and BDNF in cardiovascular disease? *Prog in Brain Res* 2004; 146; 279-289.
14. **Aloe L, Levi-Montalchini R.** NGF and autoimmune diseases. *Autoimmunity* 1994; 19: 141-150.

### Address for correspondence:

**Д-р Марияна Христова, гм**

ЕТ „АИПСМП“, Медицински център  
9003 Варна  
ул. „Св. Св. Кирил и Методий“ 53,  
e-mail: drhristova@abv.bg

**Mariyana Hristova, MD, PhD**

Division of Endocrinology,  
Medical center of Varna,  
53 „Sv. Sv. Kiril i Metodi“, 9003 Varna,  
e-mail: drhristova@abv.bg

## Полиморфизмът Pro12Ala при предиабет и захарен диабет тип 2 в извадка от българската популация

Захариева, Емануела Цв.<sup>1</sup>, Каменов, Здравко А.<sup>1</sup>, Савов, Алексей С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> УМБАЛ „Александровска“, Клиника по Ендокринология, МУ, София

<sup>2</sup> УАГБ „Майчин дом“, Национална генетична лаборатория, МУ, София

### Адрес за кореспонденция:

г-р Емануела Захариева

УМБАЛ „Александровска“, Клиника по ендокринология,

бул. Г. Софийски №1, гр. София ПК1431

e-mail: zaharieva\_e@abv.bg

### Резюме

**Въведение:** Полиморфизмът Pro12Ala в гена PPARC2, кодиращ пероксизомен пролифератор активиран рецептор гама, се свързва с намален риск от развитие на захарен диабет тип 2 (ЗД2) и по-добра инсулинова чувствителност.

**Цел** на настоящото проучване е търсене на асоциация между полиморфизма и честотата на ЗД2 и предиабет в извадка от българска популация.

**Пациенти и методи:** Проектът включва 114 пациента със ЗД2, 29 души с предиабет и 27 здрави контроли. Генетичният анализ се извърши с полимеразна верижна реакция и последващ рестрикционен анализ.

**Резултати:** Не установихме значима разлика в честота на хетерозиготния генотип при лицата със ЗД2 и предиабет спрямо контролите, но той е по-често срещан при предиабетно състояние, отколкото при ЗД2 (34,5% срещу 17,5%,  $p=0,045$ ). В двете групи хетерозиготният генотип не е свързан със сигнификантна разлика в антропометричните и метаболитни показатели.

**Заключение:** В настоящото проучване полиморфизмът Pro12Ala не се асоциира с риск от ЗД2 и предиабет, но може да има протективна роля в еволюцията на предиабетното състояние.

**Ключови думи:** полиморфизъм Pro12Ala, Захарен диабет тип 2, предиабет

### Въведение

Пероксизомен пролифератор активиран рецептор гама (PPAR $\gamma$ ) е лиганд-зависим транскрипционен фактор, принадлежащ към суперфамилията на нуклеарните рецептори. Негова ключова роля е участието му в диференциацията на адипоцитите. Той има отношение към определянето на инсулиновата чувствителност и повлиява обмяната на липидите и въглехидратите (1). PPAR $\gamma$  има и съществена място като имуномодулятор, инхибирайки действието на транскрипционни фактори като AP-1, STAT, NF- $\kappa$ B и потискайки експресията на про-инфламаторни цитокини (2).

В клиничната практика PPAR $\gamma$  агонистите подобряват инсулиновата чувствителност и гликемичния контрол при пациентите със захарен диабет тип 2 (ЗД2). Те имат и съществен принос в овладяването на хроничното субкли-

нично възпаление, присъщо за инсулиновата резистентност (3).

Кодиращият ген PPARC е локализиран в хромозома 3p25. Той се експресира в две изоформи - резултат от алтернативен сплайсинг - PPARC1, експресирана от много соматични клетки, и PPARC2 - установявана предимно в адипоцитите (4). Полиморфизмът Pro12Ala (rs1801282) в PPARC2 е един от най-изследваните в епидемиологични проучвания (5). Спрямо дивия алел (A) промяната в нуклеотидната последователност (алел G) води до замяна на аминокиселината пролин с аланин на 12-то място от кодираната пептидна верига, което променя свързващия афинитет на рецептора и транскрипцията на зависимите от него гени (6). Изследванията показват носителството на алел G сред 1,7 до 21,6% от здрави лица от европеидната раса (7). През 90-те години на миналия век той за първи път се

асоцира с намален риск от развитие на ЗД2. Следват проучвания и мета-анализи, които потвърждават протективната му роля. (7)

Алел G е свързан и с по-добра инсулинова чувствителност, докато данните за асоциация с индекса на телесна маса (ИТМ) са противоречиви (6,8-11). Мястото на полиморфизма Pro12Ala при развитие на предиабетно състояние е слабо проучено (12).

**Целта** на проучването е да бъде оценена честотата на алел G в полиморфизма Pro12Ala при пациенти със ЗД2 и предиабет и сравняване с честотата им при здрави контроли сред извадка от българската популация и да се потвърси асоциация между генотипа и метаболитния фенотип на включените участници.

### Пациенти и методи

В настоящото срезово проучване са включени 114 пациента със ЗД2 (65 жени и 49 мъже), 29 лица с предиабетно състояние (25 жени и 4 мъже) и 27 души здрави контроли (13 жени и 14 мъже). Проучването е проведено в университетската Клиника по Ендокринология III ниво на УМБАЛ „Александровска“ и е одобрено от Комисията по етика за научни изследвания при Медицински Университет, София. Всички участници са дали писмено информирано съгласие за участие.

Критериите за включване в проучването са ЗД2 и предиабетно състояние, диагностицирани съгласно критериите на Американската Диабетна Асоциация (АДА) (13). Изборът на по-нисък диагностичен праг за нарушена гликемия на гладно позволява обхващането на по-голям брой пациенти в риск от развитие на захарен диабет тип 2. Изключващи критерии са захарен диабет тип 1, придружаващи клинично изяви остри или хронични възпалителни заболявания, СУЕ > 30 мм/ч, хронично бъбречно заболяване с изчислена гломерулна филтрация < 30мл/мин/1,73кв.м, трансаминози, надвишаващи два пъти горната референтна граница, психични заболявания, неоплазми. Контролната група включва клинично здрави доброволци с ИТМ под 30 кг/кв.м.

При всички пациенти е снета анамнеза и проведен физикален преглед. На гладно е взета кръв чрез венепункция за определяне на плазмена глюкоза на гладно (ПГГ), при диабетици и постпрандиална (ПППГ) – два часа след обедното хранене, липиден профил. Орален глюкозо-толерансен тест (ОГТТ) е провеждан според изискванията на АДА. (13) При лицата с предиабет е изследван и имунореактивен инсулин (ИРИ) на гладно. Инсулиновата чувствителност беше оценена по хомеостазен модел за оценка на инсулинова резистентност (НОМА-IR) чрез формулата  $\text{НОМА index} = (\text{ПГГ, mmol/l}) \times (\text{ИРИ, mU/l}) / 22,5$  при лица в предиа-

бетно състояние (14). Изследвания са проведени по стандартни лабораторни техники в Централна клинична лаборатория към УМБАЛ „Александровска“, която е референтна за страната.

### Генотипиране

Изследванията са проведени в Националната генетична лаборатория, СБАЛАГ „Майчин Дом“. Чрез венепункция е взета кръв в епруветки с К3-ЕДТА за ензимна амплификация и рестрикционен анализ. Полимеразната верижна реакция (polymerase chain reaction – PCR) е проведена в 15  $\mu\text{l}$  реакционна смес, съдържаща 10X PCR буферен разтвор, 200 $\mu\text{M}$  от всеки дезоксирибонуклеотидтрифосфат (dНТФ), 2,0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 15 pmol от всеки праймер, 1,25 U Tag-полимераза и 100 ng геномна матрична ДНК. PCR започва с първоначална продължителна денатурация на 94 °C за 5 минути. Следва цикъл, който се повтаря 30 пъти: термична денатурация на 95 °C за 30 секунди, хибридизация за 30 секунди на 57 °C и синтез на 72 °C за 1 минута. Процедурата завършва с окончателен синтез за 5 минути на 72 °C.

За размножаване на участъка съдържащ изследвания полиморфизъм са използвани праймери: F – 5'GCCAATCAAGCCCAGTC3'/ R – 5'GATATGTTTGCAGACAGTGTATCAGTGAAGGAATCGCTTCCG3'.

Полученият PCR продукт е с дължина 270 нуклеотидни двойки. Проведе се рестрикционен анализ с рестриктаза BSTU I разпознава палиндромната последователност 5' CGCG 3' на 60 °C с разделяне на фрагментите на 2,5% агарозен гел. Замяната на нуклеотид А с G води до разрушаване на място, разпознавано от рестриктазата. Очаква се получаването на 270 нулеотидни двойки за хомозиготи за див тип (AA), 270, 227 и 43 нуклеотидни двойки за хетерозиготен генотип (AG), 227 и 43 за хомозиготи за рецесивен алел (GG).

### Статистически анализ

Данните бяха въведени и обработени със статистическия пакет IBM SPSS 19 Statistics Package (Chicago, Illinois). За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза бе избрано  $p < 0,05$ . Използвахме точен тест на Фишер и тест  $\chi^2$  - за проверка на хипотези за наличие на връзка между категориични променливи. Проверка на хипотези за различие между две независими извадки беше осъществена с Т-тест на Student или непараметричен тест на Mann-Whitney.

### Резултати

Основните характеристики на включените участници са описани в Таблица 1. Разпределението между половете не е от статистическа разлика при диабетната и контролна група ( $p =$

0,405). В рамките на предиабетната извадка лицата от мъжки пол са по-малко от представителите на женския спрямо диабетната (13,8% срещу 43%,  $p=0,004$ ) и спрямо контролната (13,8% срещу 51,9%,  $p=0,002$ ) група.

Генотипното разпределение е сравнимо с очакваното според закона на Харди-Вайнберг – ЗД2 -  $p=0,305$ , предиабет -  $p=0,262$  и контроли -  $p=0,678$ ). Генотипното и аелно честотно разпределение при пациентите със ЗД2 и тези с предиабет не се различават значително спрямо тези при контролите. Констатирахме, обаче, по-висока честота на хетерозиготния генотип (AG) сред лица с предиабетно състояние спрямо тези със ЗД2. Сред лицата с предиабет честотата на генотип AG между случаите на нарушена гликемия на гладно и нарушен въглехидратен толеранс не се различаваше значително (съответно 35,7% срещу 33,3%,  $p=1,0$ ). В нито една от групите не се установи хомозиготен за рецесивния аел генотип (GG) (Табл. 2).

Антропометричните показатели в диабетна и предиабетната група не се различаваха значително ( $p>0,05$ ) при хомозиготен за дивия аел (AA) и хетерозиготен (AG) генотип (ИТМ =  $32,84\pm 7,27$  кг/кв.м срещу  $30,73\pm 5,00$  кг/кв.м при ЗД2 и  $35,53\pm 7,86$  кг/кв.м срещу  $34,84\pm 5,20$  кг/кв.м за предиабет; обиколка на талията =  $104,01\pm 15,88$  см срещу  $98,30\pm 12,03$  см за ЗД2 и  $103,63\pm 14,87$  см срещу  $101,80\pm 12,72$  см за предиабет). Присъствието на аел G не се свързва с разлика във възрастта на поставяне на диагнозата ЗД2 ( $48,57\pm 7,62$  г. срещу  $50,57\pm 8,96$  г.,  $p>0,05$ ). Пациентите с двата генотипа имаха сравним гликемичен контрол ( $HbA_{1c}$  =  $8,15\pm 1,92\%$  срещу  $7,88\pm 1,76\%$ ; ППГ =  $8,33\pm 3,04$  mmol/l срещу  $6,93\pm 2,51$  mmol/l, ПППГ =  $8,20\pm 3,38$  mmol/l срещу  $7,79\pm 3,38$  mmol/l,  $p>0,05$ ). Не се констатира и разлика в инсулиновата чувствителност при лицата с предиабет в зависимост от генотипа (НОМА индекс =  $4,82\pm 2,71$  срещу  $3,79\pm 1,97$ ,  $p>0,05$ ).

### Обсъждане

Мащабите на заболяемостта от ЗД2 нарастват с всяка изминала година. По данни на Международната Диабетна Федерация, към 2015 г. 415 милиона души имат диабет, от които 91% са тип 2, а до 2040 г. се очаква броят им да надмине 640 милиона. Почти при 200 милиона души се счита, че заболяването все още не е разпознато (15). Стратегиите в борбата със захарния диабет започват с неговото активно търсене. Установяването на повишен риск от заболяване, особено с хроничен ход и социална значимост, предполага мотивиране на пациента и лекуващия лекар за редовна клинична и лабораторна оценка, промяна в стила на живот, своевременно

диагностициране и включване на терапия.

Настоящото проучване не установи асоциация между полиморфизма Pro12Ala и развитието на ЗД2 в изследваната извадка от българската популация. Честотата на хетерозиготния генотип (AG) не се различава и при лицата с предиабет спрямо контролната група. Установена по-висока честота на аел G сред лица с предиабет спрямо ЗД2 поставя въпроса за генетичното влияние върху риска от прогресия на предиабетното състояние в диабет. Годишно между 5 и 10% от лицата с нарушена гликемия на гладно или нарушен въглехидратен толеранс развиват ЗД2, при комбинацията им – до 19% и рискът това да се случи зависи от физическата активност, културата на хранене, разпределението на мастната тъкан, възрастта, фамилната обремененост, етническа принадлежност и др. Счита се, че до 70% от лицата с предиабет в крайна сметка развиват и ЗД2 (16, 17). Генетичният фактор в развитието на нарушената гликемия на гладно и нарушения въглехидратен толеранс е търсен в множество полиморфизми, за които е описан модифициращ предразположеността към ЗД2 ефект, включително и в Pro12Ala или rs1801282 в PPARG2. (18) Както показаха и нашите резултати, той няма такава роля и в това отношение отстъпва място на други полиморфизми като rs972283 в KLF14 (Krueppel-like factor 14), rs5945326 в DUSP9 (dual specificity phosphatase 9), rs13266634 в SLC30A8 (solute carrier family 30 (zinc transporter), member 8) (18). Въпреки това се търси протективна стойност на аел G при Pro12Ala в еволюцията на предиабета към ЗД2, което потвърждаваме и с настоящето проучване (19, 20).

Носителството на аел G на Pro12Ala не дава отражение върху възрастта на появата на ЗД2 и не е свързано със значителни разлики в контрола над телното и гликемията при ЗД2 и лица с предиабет, въпреки литературните данни за наличие на асоциация между полиморфизма и ИТМ, когато стойностите на последния показват затлъстяване (11). При статистически сравними антропометрични показатели не констатирахме разлика в инсулиновата чувствителност при лицата с предиабет.

Настоящото проучване има няколко лимитиращи фактора. На първо място това е малкият брой пациенти. От не по-малко значение е неправилното разпределение между половите при предиабетната спрямо диабетната и контролната група. Влиянието на полиморфизма Pro12Ala върху риска от ЗД2, оценено като Odd Ratio, варира в литературата между едва 0,79 и 0,86 (7) и размерът на настоящата извадка може да бъде причина за липсата на потвърждение

на протективната роля. Изследвания по проблема в по-голям мащаб биха допринесли за изясняването на модифициращата роля на полиморфизма Pro12Ala в прогресията на предиабет в ЗД2, но и в развитието на всяко едно от тях по отделно.

### Заклучение

Не се наблюдава асоциация между полиморфизма Pro12Ala и заболяемостта от ЗД2 и

предиабет в изследваната извадка от българската популация, но той може да има отношение към еволюцията на предиабетното състояние в диабетно. В това проучване генотипът нямаше отражение върху метаболитния контрол.

### Признателност

Проектът е финансиран от Медицински Университет - София, проект 32-Д/2013г.

Таблица 1. Основни характеристики на включените участници.

|                           | ЗД2<br>(n=114) | Предиабет<br>(n=29) | Контроли<br>(n=26) | P*    | P**   |
|---------------------------|----------------|---------------------|--------------------|-------|-------|
| Възраст (z)               | 53,19±7,30     | 50,90±8,76          | 52,33±3,72         | NS    | NS    |
| ИТМ (kg/m <sup>2</sup> )  | 32,47±6,96     | 35,29±6,96          | 24,13±3,42         | 0,000 | 0,000 |
| Обиколка талия (cm)       | 102,98±15,37   | 103,00±13,96        | 88,56±14,82        | 0,000 | 0,000 |
| САН (mmHg)                | 133,64±20,17   | 134,66±20,35        | 118,33±15,50       | 0,000 | 0,001 |
| ДАН (mmHg)                | 82,85±10,02    | 84,48±9,85          | 75,19±8,93         | 0,000 | 0,001 |
| HbA <sub>1c</sub> (%)     | 8,10±1,89      | -                   | -                  | -     | -     |
| ПГГ (mmol/l)              | 8,08±2,99      | 5,47±0,76           | 5,28±0,53          | 0,000 | NS    |
| ПППГ (mmol/l)             | 8,13±3,36      | -                   | -                  | -     | -     |
| ПГ на 120-та мин. от ОГТТ | -              | 7,51±1,70           | -                  | -     | -     |
| Общ холестерол (mmol/l)   | 5,25±1,18      | 5,41±1,49           | 5,26±1,01          | NS    | NS    |
| HDL (mmol/l)              | 1,33±0,41      | 1,26±0,41           | 1,23±0,46          | NS    | NS    |
| LDL (mmol/l)              | 3,01±1,05      | 3,31±1,04           | 3,32±1,05          | NS    | NS    |
| VLDL (mmol/l)             | 0,79±0,36      | 0,88±0,41           | 0,73±0,50          | NS    | NS    |
| Триглицериди (mmol/l)     | 1,83±0,98      | 1,77±0,83           | 1,46±1,26          | 0,003 | 0,014 |

Резултатите са представени като Средна ± Стандартно отклонение, САН – систолно артериално налягане, ДАН – диастолно артериално налягане, \* p – ЗД2 спрямо контролна група; \*\*p – Предиабет спрямо контролна група. NS – non-significant (незначима)

Таблица 2. Генотипно и алелно честотно разпределение на полиморфизма Pro12Ala на гена PPARG2.

|         |      | ЗД2, n(%)  | Предиабет, n(%) | Контроли, n(%) | P*  | P**   | P***  |
|---------|------|------------|-----------------|----------------|-----|-------|-------|
| Генотип | AA   | 94 (82,5)  | 19 (62,5)       | 23 (85,2)      | 1,0 | 0,089 | 0,045 |
|         | AG   | 20 (17,5)  | 10 (34,5)       | 4 (14,8)       |     |       |       |
|         | GG   | 0          | 0               | 0              |     |       |       |
|         | общо | 114 (100)  | 29 (100)        | 27 (100)       |     |       |       |
| Алел    | A    | 208 (91,2) | 48 (82,8)       | 50 (92,6)      | 1,0 | 0,116 | 0,060 |
|         | G    | 20 (8,8)   | 10 (17,2)       | 4 (7,4)        |     |       |       |
|         | общо | 228 (100)  | 58 (100)        | 54 (100)       |     |       |       |

p\* – ЗД2 и контроли, p\*\* – предиабет и контроли, p\*\*\* – ЗД2 и предиабет

# The Pro12Ala Polymorphism in Prediabetes and Type 2 Diabetes in a Sample of the Bulgarian Population

Zaharieva, Emanuela Tsv.<sup>1</sup>, Kamenov, Zdravko A.<sup>1</sup>, Savov, Alexey S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Alexandrovska University Hospital, Clinic of Endocrinology, Medical University, Sofia

<sup>2</sup> University Hospital of Obstetrics and Gynecology „Maichin Dom“, National Genetic Laboratory, Medical University, Sofia

---

**Address for correspondence:**

Dr Emanuela Zaharieva

Alexandrovska University Hospital, Clinic of Endocrinology,

1 Georgy Sofiiski Str, Sofia 1431

e-mail: zaharieva\_e@abv.bg

## Abstract

**Background:** The Pro12Ala polymorphism of the *PPARG2* gene, encoding peroxisome proliferator-activated receptor gamma, is related to a reduced risk of type 2 diabetes (T2D) and better insulin sensitivity. The aim of the current study was to estimate the association between the polymorphism and the prevalence of T2D and prediabetes in a sample of the Bulgarian population.

**Subjects and methods:** The project included 114 patients with T2D, 29 people with prediabetes and 27 control subjects. Genetic analysis was performed with polymerase chain reaction and restriction analysis.

**Results:** The prevalence of heterozygote genotype among T2D patients and prediabetic subjects did not differ significantly compared to controls but it was more frequently observed in prediabetes than in T2D (34,5% versus 17,5%,  $p=0,045$ ). In neither group did the heterozygote genotype associate with a significant difference in anthropometric and metabolic parameters.

**Conclusion:** In the current study Pro12Ala polymorphism was not associated with risk of T2D or prediabetes but it may be protective in the evolution of the prediabetic state.

---

**Key words:** Pro12Ala polymorphism, Type 2 diabetes, Prediabetes

## Introduction

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) is a ligand-dependent transcription factor that belongs to the nuclear receptor superfamily. It takes part in the control of adipocyte differentiation, contributes to insulin sensitivity and impacts lipid and carbohydrate metabolism (1). PPAR $\gamma$  has a substantial

immunomodulatory role by inhibiting (the effect of other transcription factors) other transcription factors' effect (AP-1, STAT, NF $\kappa$ B) and suppressing pro-inflammatory cytokine expression (2).

In clinical practice the PPAR $\gamma$  agonists improve insulin sensitivity and glycemic control in type 2 diabetes (T2D). They contribute to overcoming chronic insulin resistance-associated low-grade inflammation (3).

The *PPARG* gene is located on chromosome 3p25. Through alternative splicing it is expressed in two isoforms - *PPARG1*, expressed in a number of somatic cells, and *PPARG2* – observed dominantly in adipocytes (4). The Pro12Ala polymorphism (rs 1801282) in *PPARG2* is one of the most researched areas in epidemiologic studies (5).

The altered nucleotide sequence (allele G) in contrast to the wild one (allele A) leads to an exchange of the peptide's twelfth amino acid Proline to Alanine. This interferes with the binding affinity of the receptor and transcription of dependent genes (6). It has been shown that 1,7 to 21,6% of healthy Caucasians carry the G allele.(7). The Pro12Ala polymorphism was associated with a reduced risk of developing T2D for the first time in the 1990s. Thereafter studies and meta-analyses have confirmed its protective role (7).

The G allele has been associated with a better insulin sensitivity, while data about the relationship to the Body Mass Index (BMI) is controversial (6, 8-11). The Pro12Ala polymorphism's role in predisposition to prediabetes is scarcely researched (12).

The aim of the current study was an assessment of the allele and genotype frequency of the Pro12Ala polymorphism in subjects with T2D, prediabetes and healthy controls in a sample of the Bulgarian population as well as the evaluation of the relationship between the genotype and metabolic phenotype of the enrolled participants.

## Subjects and Methods

One hundred and fourteen patients with T2D (65 women and 49 men), 29 with prediabetes (25 women and 4 men), and 27 healthy control subjects (13 women and 14 men) were enrolled in the current cross-sectional study. It was performed in the University Clinic of Endocrinology III level in „Alexandrovska“ University Hospital. It was approved by the ethics committee of the Medical University-Sofia and all the participants signed an informed consent.

The criteria for enrollment included T2D and prediabetic state, diagnosed according to the criteria of the American Diabetes Association (ADA) (13). A lower cut off for impaired fasting glucose (IFG) would encompass more people at risk of developing type 2 diabetes. Exclusion criteria were type 1 diabetes, concomitant acute or chronic inflammatory diseases, estimated sedimentation rate exceeding 30mm/h, chronic kidney disease with estimated glomerular filtration rate less than 30 ml/min/1,73m<sup>2</sup>, transaminase enzymes over twice the upper reference range and malignant diseases. The control group consisted of clinically healthy volunteers with BMI<30kg/m<sup>2</sup>.

A full medical history was taken and a physical

examination of all participants was performed. The lipid profile, fasting plasma glucose (FPG) and post-prandial one (PPPG) – two hours post lunch meal, were analyzed. An oral glucose tolerance test (OGTT) was performed according to ADA's guidelines (13). Prediabetic subjects were analyzed for immunoreactive Insulin (IRI). Insulin resistance was assessed through homeostatic model assessment (HOMA-IR) by the formula  $HOMA\ index = (PGG, \text{ mmol/l}) \times (IRI, \text{ mU/l}) / 22,5$  for participants with prediabetic state (14). Analyses were performed through standard techniques in the Central Laboratory of „Alexandrovska“ University Hospital, which is the referent for the country.

## Genotyping

Genotyping was performed at the National Genetic Laboratory, University Hospital of Obstetrics and Gynecology „Maichin Dom“. Blood was taken in K3-EDTA test tubes for enzyme amplification and restriction analysis. A polymerase chain reaction (PCR) was performed in a 15 µl reaction mixture, containing 10X PCR buffer solution, 200µM of every deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 pmol of every primer, 1.25 U Tag-polymerase and 100 ng matrix DNA. The PCR was initiated with preliminary continued denaturation at 94 °C for 5 minutes. The next cycle was repeated 30 times: thermal denaturation at 95 °C for 30 seconds, annealing for 30 seconds at 57 °C and extension at 72 °C for 1 minute. The procedure was terminated with a final elongation for 5 minutes at 72 °C. The following primers were used for the analyzed polymorphic region amplification:

F – 5'GCCAATTCAAGCCCAGTC3'/

R–5'GATATGTTTGCAGACAGTGTATCAGT-GAAGGAATCGCTTCCG3'.

The final PCR product consisted of 270 base pairs. The restriction analysis was performed with endonuclease *Bst* I that recognized the 5' CGCG 3" palindromic sequence at 60 °C and fragment separation in 2,5% agarose gel. The change of nucleotide A with G lead to the loss of the sequence recognized by the restriction enzyme. We observed 270 base pairs for homozygous for the wild allele (AA) 270, 227 and 43 base pairs for the heterozygous genotype (AG), 227 and 43 for homozygous for the recessive allele (GG).

## Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the SPSS 19 Statistics Package (Chicago, Illinois). The level of significance was set at p<0.05. A Chi square test or Fisher's exact test were used for assessing the difference between frequencies. A hypothesis assessment for difference between independent samples was performed

by a Student's T test or a nonparametric Mann Whitney U test.

## Results

The basic characteristics of the enrolled participants are presented in Table 1. Gender distribution was not of statistical significance between the diabetic and the control group ( $p = 0,405$ ). The percentage of men in the prediabetic group was less than among both diabetic (13,8% versus 43%,  $p = 0,004$ ) and control (13,8% versus 51,9%,  $p = 0,002$ ) groups.

The genotype frequencies in the analyzed samples were similar to expected from the Hardy-Weinberg model (T2D,  $p = 0,305$ , prediabetes –  $p = 0,262$  and controls –  $p = 0,678$ ). The genotype and allele frequency among participants with T2D and prediabetes did not differ significantly compared to those of the control subjects. However, the heterozygous genotype (AG) within the prediabetes groups was more prevalent than in T2D. The frequency of the AG genotype was similar between subjects with impaired fasting glycemia and impaired glucose tolerance (35,7% versus 33,3%, respectively,  $p = 1,0$ ). A homozygous genotype for the recessive allele (GG) was not observed in either of the three groups (Table 2).

The anthropometric data of diabetic and prediabetic subjects did not differ significantly depending on the presence of homozygous (AA) and heterozygous (AG) genotype (BMI =  $32,84 \pm 7,27$  kg/m<sup>2</sup> versus  $30,73 \pm 5,00$  kg/m<sup>2</sup> for T2D and  $35,53 \pm 7,86$  kg/m<sup>2</sup> versus  $34,84 \pm 5,20$  kg/m<sup>2</sup> for prediabetes; waist circumference =  $104,01 \pm 15,88$  cm versus  $98,30 \pm 12,03$  cm for T2D and  $103,63 \pm 14,87$  cm versus  $101,80 \pm 12,72$  cm for prediabetes, respectively for each genotype,  $p > 0,05$ ). The presence of the allele G was not associated with a difference in age at diagnosis of T2D ( $48,57 \pm 7,62$  years for AA versus  $50,57 \pm 8,96$  years for AG genotype,  $p > 0,05$ ). Subjects with T2D with both genotypes had similar glycemic control (HbA<sub>1c</sub> =  $8,15 \pm 1,92\%$  versus  $7,88 \pm 1,76\%$ ; FPG =  $8,33 \pm 3,04$  mmol/l versus  $6,93 \pm 2,51$  mmol/l, PPG =  $8,20 \pm 3,38$  mmol/l versus  $7,79 \pm 3,38$  mmol/l respectively for AA and AG genotype,  $p > 0,05$ ). No difference was established in insulin sensitivity among participants with prediabetes depending on genotype (HOMA index =  $4,82 \pm 2,71$  versus  $3,79 \pm 1,97$  respectively for AA and AG genotype,  $p > 0,05$ ).

## Discussion

The prevalence of T2D is growing every year. According to the International Diabetes Federation 415 million people are diagnosed with diabetes mellitus in 2015, 91% with T2D. It is expected that this

number will exceed 640 million by 2040. It is estimated that almost 200 million are still undiagnosed (15). The strategies for treating diabetes begin with an active screening for the disease. Finding an increased risk for a chronic disease of social significance means motivated patients and physicians for regular clinical and laboratory assessment, lifestyle modifications, timely diagnosis and treatment.

The current study did not establish an association between the Pro12Ala polymorphism and development of T2D in the analyzed sample. The frequency of the heterozygous genotype (AG) in the prediabetes group did not differ from that of the control population. The higher frequency of allele G in subjects with prediabetes compared to T2D draws attention to the polymorphism's contribution to the risk of progression of prediabetes to T2D. Between 5 and 10% of people with impaired fasting glycemia or impaired glucose tolerance develop T2D annually – up to 19% if combined (16). It depends on physical activity, diet, fat mass distribution, age, family history, ethnicity, etc. It is estimated that 70% of subjects with prediabetes will eventually have T2D (17).

The genetic factor in impaired fasting glycemia and impaired glucose tolerance is analyzed in a number of polymorphisms, known to be related to a T2D predisposition, including Pro12Ala or rs1801282 in *PPARG2*. (18) As our results showed, the latter does not have a predisposing role for prediabetes but has been observed for polymorphisms like rs972283 in *KLF14* (Kruppel-like factor 14), rs5945326 in *DUSP9* (dual specificity phosphatase 9), rs13266634 in *SLC30A8* (solute carrier family 30 (zinc transporter), member 8) (18). Despite that, a protective role of the G allele in Pro12Ala polymorphism has been sought concerning the evolution of prediabetes in T2D, as we confirmed (19, 20).

The current study showed that carriage of the G allele was not associated with the age at diagnosis of T2D and was not related to weight and glycemic control, despite published data for an association between the polymorphism and BMI when the latter indicates obesity. (11) Insulin sensitivity in the prediabetes state was also unaffected given that anthropometric parameters were comparable.

The study has some limitation factors. The number of patients was low. The difference in the gender distribution in the prediabetes group compared to the other two was also a disadvantage. The Pro12Ala polymorphisms' influence on the risk of T2D, evaluated as Odds Ratio, varies between 0,79 and 0,86 (7) and the small size of the current sample may be a reason for not confirming the protective role. Analysis over a larger population would clarify the role of Pro12Ala polymorphism in the evolution of prediabetes to T2D, but also development of each of them alone.

## Conclusion

The Pro12Ala polymorphism was not associated with T2D and prediabetes in the analyzed sample of the Bulgarian population, but may contribute to progress from the prediabetic state to the diabetic state. The study did not establish a relationship between the genotype and metabolic control.

## Acknowledgements

*The project was financially supported by Medical University, Sofia, project 32-D/2013.*

**Table 1.** Baseline characteristics of participants.

|   | <b>T2D<br/>(n=114)</b> | <b>Prediabetes<br/>(n=29)</b> | <b>Controls<br/>(n=26)</b> | <b>P*</b> | <b>P**</b> |
|---|------------------------|-------------------------------|----------------------------|-----------|------------|
| <b>Age (y)</b>                            | 53,19±7,30             | 50,90±8,76                    | 52,33±3,72                 | NS        | NS         |
| <b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>             | 32,47±6,96             | 35,29±6,96                    | 24,13±3,42                 | 0,000     | 0,000      |
| <b>Waist circumference (cm)</b>           | 102,98±15,37           | 103,00±13,96                  | 88,56±14,82                | 0,000     | 0,000      |
| <b>SBP (mmHg)</b>                         | 133,64±20,17           | 134,66±20,35                  | 118,33±15,50               | 0,000     | 0,001      |
| <b>DBP (mmHg)</b>                         | 82,85±10,02            | 84,48±9,85                    | 75,19±8,93                 | 0,000     | 0,001      |
| <b>HbA<sub>1c</sub> (%)</b>               | 8,10±1,89              | -                             | -                          | -         | -          |
| <b>FPG (mmol/l)</b>                       | 8,08±2,99              | 5,47±0,76                     | 5,28±0,53                  | 0,000     | NS         |
| <b>PPPG (mmol/l)</b>                      | 8,13±3,36              | -                             | -                          | -         | -          |
| <b>PG on 120<sup>th</sup> min of OGTT</b> | -                      | 7,51±1,70                     | -                          | -         | -          |
| <b>Total cholesterol (mmol/l)</b>         | 5,25±1,18              | 5,41±1,49                     | 5,26±1,01                  | NS        | NS         |
| <b>HDL (mmol/l)</b>                       | 1,33±0,41              | 1,26±0,41                     | 1,23±0,46                  | NS        | NS         |
| <b>LDL (mmol/l)</b>                       | 3,01±1,05              | 3,31±1,04                     | 3,32±1,05                  | NS        | NS         |
| <b>VLDL (mmol/l)</b>                      | 0,79±0,36              | 0,88±0,41                     | 0,73±0,50                  | NS        | NS         |
| <b>Triglycerides (mmol/l)</b>             | 1,83±0,98              | 1,77±0,83                     | 1,46±1,26                  | 0,003     | 0,014      |

Results are expressed as Mean ± Standard Deviation, SBP – systolic blood pressure, DBP – diastolic blood pressure, \* p – T2D versus controls; \*\* p – prediabetes versus controls. NS – non-significant

**Table 2.** Genotype and allele frequency of the Pro12Ala polymorphism of PPARG2 gene.

|                 |              | <b>T2D, n(%)</b> | <b>Prediabetes, n(%)</b> | <b>Controls, n(%)</b> | <b>P*</b> | <b>P**</b> | <b>P***</b> |
|-----------------|--------------|------------------|--------------------------|-----------------------|-----------|------------|-------------|
| <b>Genotype</b> | AA           | 94 (82,5)        | 19 (62,5)                | 23 (85,2)             | 1,0       | 0,089      | 0,045       |
|                 | AG           | 20 (17,5)        | 10 (34,5)                | 4 (14,8)              |           |            |             |
|                 | GG           | 0                | 0                        | 0                     |           |            |             |
|                 | <b>total</b> | 114 (100)        | 29 (100)                 | 27 (100)              |           |            |             |
| <b>Allele</b>   | A            | 208 (91,2)       | 48 (82,8)                | 50 (92,6)             | 1,0       | 0,116      | 0,060       |
|                 | G            | 20 (8,8)         | 10 (17,2)                | 4 (7,4)               |           |            |             |
|                 | <b>total</b> | 228 (100)        | 58 (100)                 | 54 (100)              |           |            |             |

p\* – T2D versus controls, p\*\* – prediabetes versus controls, p\*\*\* – T2D versus prediabetes

1. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev* 2006; 58(4):726-741.
2. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998; 391(6662):79-82.
3. Staels B, Fruchart JC. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes* 2005; 54(8):2460-2470.
4. Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem* 1997; 272(30):18779-18789.
5. Yen CJ, Beamer BA, Negri C, Silver K, Brown KA, Yarnall DP, et al. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241(2):270-274.
6. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamäki J, Mykkänen L, Kuusisto J, et al. A Pro12Ala substitution in PPARγ2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet*. 1998; 20(3):284-287.
7. Gouda HN, Sagoo GS, Harding AH, Yates J, Sandhu MS, Higgins JP. The association between the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (PPARG2) Pro12Ala gene variant and type 2 diabetes mellitus: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2010; 171(6):645-655.
8. Ek J, Andersen G, Urhammer SA, Hansen L, Carstensen B, Borch-Johnsen K, et al. Studies of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-γ2 (PPAR-γ2) gene in relation to insulin sensitivity among glucose tolerant Caucasians. *Diabetologia* 2001, 44(9):1170-1176.
9. Mattevi VS, Zembruski VM, Hutz MH. Effects of a PPARG gene variant on obesity characteristics in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2007, 40(7):927-932.
10. Chistiakov DA, Potapov VA, Khodirev DS, Shamkhalova MS, Shestakova MV, Nosikov VV. The PPARgamma Pro12Ala variant is associated with insulin sensitivity in Russian normoglycaemic and type 2 diabetic subjects. *Diab Vasc Dis Res* 2010; 7(1):56-62.
11. Masud S, Ye S. Effect of the peroxisome proliferator activated receptor-γ gene Pro12Ala variant on body mass index: a meta-analysis. *J Med Genet* 2003; 40(10):773-780.
12. Linder K, Wagner R, Hatzigelaki E, Ketterer C, Heni M, Machicao F, et al. Allele summation of diabetes risk genes predicts impaired glucose tolerance in female and obese individuals. *PLoS One* 2012; 7(6):e38224.
13. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2013; 36 Suppl 1:S67-S74.
14. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28 (7): 412-419.
15. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 7th ed. Brussels, Belgium: *International Diabetes Federation*, 2015.
16. Tabák AG, Herder C, Rathmann W, Brunner EJ, Kivimäki M. Prediabetes: A high-risk state for developing diabetes. *Lancet*. 2012; 379(9833): 2279-2290.
17. Nathan DM, Davidson MB, DeFronzo RA, Heine RJ, Henry RR, Pratley R, et al. Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: implications for care. *Diabetes Care* 2007; 30(3):753-759.
18. Zyriax BC, Salazar R, Hoepfner W, Vettorazzi E, Herder C, Windler E. The association of genetic markers for type 2 diabetes with prediabetic status - cross-sectional data of a diabetes prevention trial. *PLoS One* 2013; 8(9):e75807.
19. Andrulionytė L, Zacharova J, Chiasson JL, Laakso M; STOP-NIDDM Study Group. Common polymorphisms of the PPAR-gamma2 (Pro12Ala) and PGC-1alpha (Gly482Ser) genes are associated with the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes in the STOP-NIDDM trial. *Diabetologia* 2004; 47(12):2176-2184.
20. Andrulionytė L, Peltola P, Chiasson JL, Laakso M; STOP-NIDDM Study Group. Single nucleotide polymorphisms of PPARG in combination with the Gly482Ser substitution of PGC-1A and the Pro12Ala substitution of PPARG2 predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the STOP-NIDDM trial. *Diabetes* 2006; 55(7):2148-2152.

## Обменно-атерогенни показатели при жени с метаболитен синдром и метаболитно здрави жени с наднормено телесно тегло/затлъстяване

Колева, Даниела Ив.<sup>1</sup>, Орбецова, Мария М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Клиника/Секция по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Св. Георги“, Медицински Факултет, Медицински Университет, Пловдив

### Адрес за кореспонденция:

д-р Даниела Колева, гм,  
Клиника по Ендокринология и болести на обмяната,  
УМБАЛ „Св. Георги“, Пловдив, МУ, Пловдив  
Пловдив 4000, бул. Васил Априлов 15А  
e-mail: nelka\_medicine@abv.bg

### Резюме

При пациенти с метаболитен синдром (МС) сърдечно-съдовият риск е повишен поради наличието на рискови фактори: висцерален тип обезитет, различни по степен нарушения във въглехидратния толеранс, атерогенна дислипидемия и артериална хипертония. Понастоящем честотата на пациентите с МС расте главоломно, а паралелно с това се увеличава и популационният риск за развитие на сърдечно-съдови заболявания (ССЗ).

**Цел на проучването:** оценка на рискови фактори за развитие на захарен диабет тип 2 (ЗД 2) и ССЗ на базата на сравнителен анализ на показатели от въглехидратна и липидна обмяна и изчислени атерогенни индекси/съотношения при жени с установен МС и метаболитно здрави жени с наднормено телесно тегло/затлъстяване (metabolically healthy obese, МНО).

**Материали и методи:** Проучването обхваща 52 жени с доказан МС (ср. възраст – 37,75±11,38 г., ср. ИТМ – 34,64±4,81 кг/м<sup>2</sup>) и 22 съпоставими по възраст и ИТМ метаболитно здрави жени с наднормено телесно тегло/затлъстяване (ср. възраст – 35,27±9,09 г., ср. ИТМ – 0,35,09±3,23 кг/м<sup>2</sup>). При всички жени се извършиха следните клинични измервания и лабораторни изследвания: тегло, ръст, обиколка на талия (Т), обиколка на ханш (Х), кръвна захар (КЗ) и инсулин (ИРИ) – изходни и в хода на орален глюкозо-толерансен тест (оГТТ), общ холестерол (ОХ), ХДЛ-хол, триглицериди (ТГ). Стойностите на ЛДЛ-хол се определяха по формулата на Friedewald {ОХ - (ХДЛ-хол+ТГ/2,2)}. Изчислени бяха следните индекси и съотношения: ИТМ=тегло(кг)/ръст(м)<sup>2</sup>, съотношение Т/Х, хомеостазен модел на инсулинова резистентност (НОМА-IR) = (КЗ0' x ИРИ0')/22,5), рискови индекси на Castelli I (ОХ/ХДЛ-хол) и Castelli II (ЛДЛ-хол/ХДЛ-хол), съотношение ТГ/ХДЛ-хол и плазмен атерогенен индекс (AIP) = {(logТГ)/ХДЛ-хол}.

**Резултати:** Не се намериха значими разлики по отношение възраст и антропометрични параметри при двете изследвани групи жени. Регистрираха се сигнификантно по-високи стойности на КЗ и ИРИ - изходни и в хода на оГТТ и НОМА-IR при МС в сравнение с тези при МНО. Установиха се значимо по-високи серумни нива на ТГ и стойности на ОХ/ХДЛ-хол, ТГ/ХДЛ-хол и AIP при жените с МС спрямо МНО. Серумните концентрации на ХДЛ-хол се намериха сигнификантно по-ниски при носителките на МС.

**Заклучение:** Установените по-високи базални и стимулирани стойности на КЗ и ИРИ, НОМА-IR и атерогенни индекси/съотношения показват носителство на по-висок риск от развитие на ЗД 2 и ССЗ при жените с метаболитен синдром в сравнение с метаболитно здравите жени с наднормено тегло/затлъстяване.

**Ключови думи:** метаболитен синдром, метаболитно здраво затлъстяване, кръвна захар, инсулин - атерогенни индекси/съотношения

## Въведение

В световен мащаб метаболитен синдром (МС) се открива при около 30% от хората между 20- и 70-годишна възраст като честотата му продължава да расте главоломно. Счита се, че в близко бъдеще МС ще измести тютюнопушенето от челната позиция като водещ рисков фактор за сърдечно-съдови заболявания (ССЗ) (1).

Значението на оценката на атерогенния риск при жени с инсулинова резистентност произтича от факта, че отделните компоненти на МС си взаимодействат по синергичен, а не по обикновен адитивен начин. Така, носителите на разгърнат МС са изложени на комбинираното въздействие на рисковите фактори: повишено абдоминално отлагане на мастна тъкан (МТ) с неблагоприятно съотношение на атерогенни и антиатерогенни адипоцитокени, поява на въглехидратни, липидни, проинфламаторни и протромботични отклонения, повишаване на стойностите на артериално налягане (АН) с нарушаване на циркадния му ритъм, които създават предпоставки за ранна и бързопрогресираща ендотелна увреда, респ. повишена сърдечно-съдова заболяемост и смъртност (2, 3).

През последните години значителни нараства интересът към т.нар. метаболитно здраво затлъстяване (metabolically healthy obesity) - състояние, характеризиращо се с липса на типичните за метаболитния синдром компоненти, а именно - различни по степен нарушения във въглехидратната обмяна, атерогенна дислипидемия, артериална хипертония (4). Статусът на метаболитно здравите лица със затлъстяване (МНО) се свързва с по-малко количество натрупана висцерална мастна тъкан и значително потиснат процес на хронично нискорективно възпаление с намалено/липсващо производство на проинфламаторни цитокини (5).

Счита се, че МНО индивидите принадлежат към фенотипа с благоприятен метаболитен и сърдечно-съдов профил. Установено е, че честотата на лицата с метаболитно здраво затлъстяване при общата популация варира в доста широки граници, а именно от 6 до 40% (6). През 2010 г. се изнасят данни от епидемиологично проучване, показващи, че дялът на метабо-

литно здравите индивиди сред изследвания контингент със затлъстяване е между 10 и 25% (7). Основна цел на настоящото проучване беше да се извърши оценка на рисковите фактори за развитие на захарен диабет тип 2 (ЗД 2) и ССЗ на базата на сравнителен анализ по отношение на показатели от въглехидратна и липидна обмяна и изчислени атерогенни индекси/съотношения при жени с установен МС и метаболитно здрави жени с наднормено телесно тегло/затлъстяване (metabolically healthy obese, МНО).

## Материали и методи

Настоящото проучване се проведе в Клиника по Ендокринология и болести на обмяната при УМБАЛ „Св. Георги“, Пловдив. В него взеха участие 52 жени с доказан МС (ср. възраст=37,75±11,38 г. и ср. ИТМ=34,64±4,81 кг/м<sup>2</sup>) и 22 съпоставими по възраст и ИТМ метаболитно здрави жени с наднормено телесно тегло/затлъстяване (ср. възраст=35,27±9,09г. и ср. ИТМ=35,09±3,23 кг/м<sup>2</sup>).

Диагнозата МС се поставяше съгласно критериите на Международната Диабетна Федерация (IDF), съгласувани с тези на АНА/NHLBI през 2009 г. (8) по отношение на жени от Европейската раса, а именно - наличие на задължителен компонент централно затлъстяване (обиколка на талията ≥ 80 см в съчетание с 2 от следните нарушения:

1. повишени триглицериди > 1,7 ммол/л;
2. Понижен ХДЛ-хол < 1,3 ммол/л или специфично лечение;
3. Повишено артериално налягане > 130/85 mmHg или лечение на диагностицирана артериална хипертония;
4. Повишена плазмена глюкоза на гладно > 5,6 ммол/л или диагностициран захарен диабет тип 2 (ЗД 2)/нарушен глюкозен толеранс (НГТ).

За метаболитно здрави жени с наднормено телесно тегло/затлъстяване се приемаха лица с ИТМ=25,0-39,9 кг/м<sup>2</sup> без налични други компоненти, типични за МС (4).

За целите на проучването на всички жени се извършиха следните клинични измервания и лабораторни изследвания: тегло, ръст, обиколка на талия (Т), обиколка на ханш (Х), орален глюкозо-толерансен тест (оГТТ) с венозно измерване

на КЗ и ИРИ на 0-ва, 60-та и 120-та минута след перорален прием на 75 г глюкоза, серумни нива на общ холестерол (ОХ), ХДЛ-хол, триглицериди (ТГ). Използваха се стойности на ЛДЛ-хол, определени с помощта на формулата на Friedewald =  $\{ОХ - (ХДЛ-хол + ТГ/2,2)\}$ . Изчисляваха се следните индекси и съотношения: ИТМ=тегло(кг)/ръст(м)<sup>2</sup>, съотношение Т/Х, хомеостазен модел на инсулинова резистентност (НОМА-IR) =  $(КЗ \cdot 0' \cdot ИРИ \cdot 0')/22,5$ , рисков индекс на Castelli I =  $ОХ/ХДЛ-хол$ , рисков индекс на Castelli II =  $ЛДЛ-хол/ХДЛ-хол$ , съотношение ТГ/ХДЛ-хол и плазмен атерогенен индекс (AIP) =  $\{(\log ТГ)/ХДЛ-хол\}$ .

Обиколката на талията се определяше в хоризонталната равнина по средата между долния ръб на 12-то ребро и горния ръб на илиачните гребени. Обиколката на ханша се измерваше по хоризонталната равнина около най-широката част на седилиците мускули.

Венозната кръв за лабораторните изследвания се вземаше при стандартни условия - сутрин рано, след 12-часов период на нощно гладуване, след подписание на информирано съгласие от всяка участничка. Венозните проби за определяне на КЗ, ИРИ и параметрите от липидния профил се изпращаха в Централна Клинична Лаборатория при УМБАЛ „Св. Георги“, Пловдив.

Инсулинът се изследваше чрез комерсиален кит за количествено определяне на имунореактивен инсулин на базата на микрочастичен имуноензимен анализ (MEIA) с помощта на AxSYM system (ABBOTT, USA) със следните характеристики: sensitivity, 0,8 mIU/ml; невъзпроизводимост във време (inter assay variation), CV% < 2,9; невъзпроизводимост в серия (intra assay variation), CV% < 5,3. Серумните нива на кръвната захар се измерваха с помощта на стандартен ензимно-колориметричен (GOD-POD) метод с характеристики: линейност (dilution recovery) – до 20 ммол/л; inter assay variation, CV от 2,40 до 2,94%, intra assay variation, CV% < 1,2. Серумните нива на ОХ и ТГ се

определяха с помощта на ензимен (Триндер) метод, а тези на ХДЛ-хол – чрез директен ензимно-колориметричен метод.

Проведоха се редица хормонални изследвания (гонадотропни хормони, естрадиол, андрогени, пролактин, ТСХ, ФТ4, серумен кортизол в 8 ч. и 22 ч. и др. по индивидуална преценка) с цел изключване на налична друга ендокринна патология: синдром на Cushing, вродена надбъбречно-корова хиперплазия (ВНКХ), пролактином, хипопитуитаризъм, хипо-/хипертиреозидизъм, хипогонадизъм, андрогенсекретиращи тумори, и пр., бременност.

Статистическият анализ на резултатите беше извършен с помощта на SPSS, версия 21,0, за Windows. Извършен беше сравнителен анализ на клинични и метаболитни показатели при изследваните две групи жени. Резултатите са представени като средна аритметична  $\pm$  стандартно отклонение. За всички сравнения е избрано ниво на значимост  $P < 0,05$ .

## Резултати

Не се наблюдават значими разлики по отношение възраст и антропометрични параметри при двете изследвани групи жени, което е и основна цел на дизайна на проучването (Табл. 1).

Откриваме по-високи стойности на КЗ и ИРИ, както в базални условия, така и в хода на oГТТ при жените с МС в сравнение с тези при жените с МНО (Фиг. 1 и 2). Съответно, НОМА-IR е сигнификантно по-висок при жените с МС в сравнение с метаболитно здравите жени с нормално тегло/затлъстяване ( $3,45 \pm 1,70$  спрямо  $1,54 \pm 0,57$ ,  $P < 0,001$ ) (Фиг. 3).

Установяваме значимо по-високи серумни нива на ТГ и стойности на атерогенни индекси ОХ/ХДЛ-хол, ТГ/ХДЛ-хол и AIP при жените с МС в сравнение с МНО. Серумните концентрации на ХДЛ-хол са сигнификантно по-ниски при носителките на МС (Табл. 2).

Таблица 1.

Възраст и антропометрични показатели при изследваните групи жени

| Параметри                | Групи жени         |                       |
|--------------------------|--------------------|-----------------------|
|                          | МС (n=52)          | МНО (n=22)            |
| Възраст (години)         | 37,75 $\pm$ 11,38  | 35,27 $\pm$ 9,09 NS   |
| Ръст (м)                 | 1,65 $\pm$ 0,06    | 1,66 $\pm$ 0,06 NS    |
| Тегло (кг)               | 99,19 $\pm$ 18,73  | 95,87 $\pm$ 16,48 NS  |
| ИТМ (кг/м <sup>2</sup> ) | 34,64 $\pm$ 4,81   | 35,09 $\pm$ 3,23 NS   |
| Обиколка на талия (см)   | 106,04 $\pm$ 12,52 | 100,55 $\pm$ 8,56 NS  |
| Обиколка на ханш (см)    | 119,26 $\pm$ 13,02 | 116,05 $\pm$ 10,58 NS |
| Т/Х                      | 0,89 $\pm$ 0,06    | 0,87 $\pm$ 0,06 NS    |

NS – липсва статистически значима разлика,  $P > 0,05$

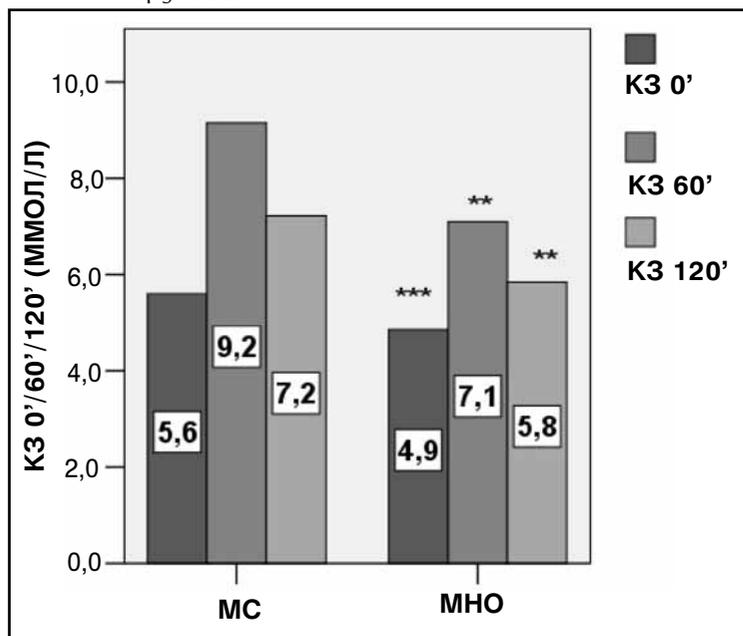
Таблица 2.

Показатели на липидна обмяна и атерогенни индекси/съотношения при изследваните групи жени

| Параметри        | Групи жени |                |
|------------------|------------|----------------|
|                  | МС (n=52)  | МНО (n=22)     |
| ОХ (ммол/л)      | 5,08±1,00  | 5,11±0,56 NS   |
| ХДЛ-ХОЛ (ммол/л) | 1,09±0,27  | 1,27±0,27 **   |
| ЛДЛ-ХОЛ (ммол/л) | 3,18±0,87  | 3,37±0,54 NS   |
| ТГ (ммол/л)      | 1,77±0,96  | 1,02±0,38 ***  |
| ОХ/ХДЛ-ХОЛ       | 4,90±1,38  | 4,21±1,11 *    |
| ЛДЛ-ХОЛ/ХДЛ-ХОЛ  | 3,10±1,11  | 2,83±1,00 NS   |
| ТГ/ХДЛ-ХОЛ       | 1,75±1,11  | 0,83±0,36 ***  |
| AIP              | 0,19±0,25  | - 0,02±0,13*** |

NS – липса на статистически значима разлика, P>0,05  
 \* – наличие на статистически значима разлика, P<0,05  
 \*\* – наличие на статистически значима разлика, P<0,01  
 \*\*\* – наличие на статистически значима разлика, P<0,001

Фигура 1. Стойности на КЗ 0', 60' и 120' при изследваните групи жени



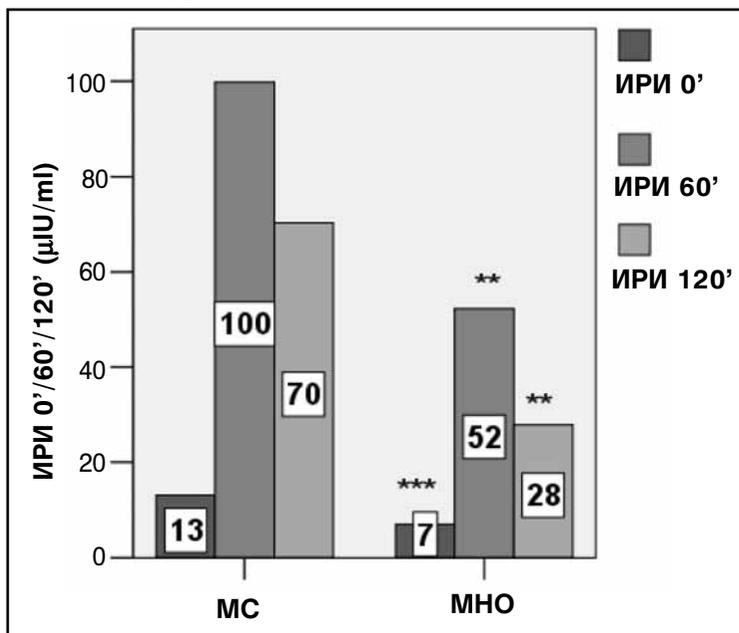
\*\* - наличие на статистически значима разлика, P<0,01  
 \*\*\* - наличие на статистически значима разлика, P<0,001

### Обсъждане

Метаболитно здравите лица със затлъстяване (МНО) принадлежат към фенотипа с благоприятен метаболитен профил. В тази насока Guu-Magino Hippoioho и сътр. изследват връзката между наличието на МНО фенотипа и риска от поява на ССЗ и ЗД 2. В проучването се извършва оценка на ИТМ и метаболитен статус при 7122 индивиди (69,7%

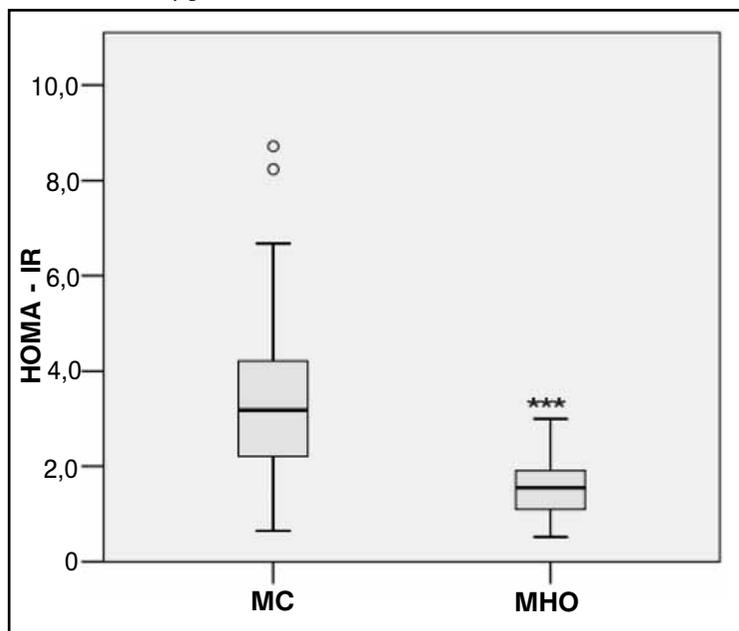
мъже) на възраст от 39 до 63 години, включени в периода 1991-1993 г. Появата на ССЗ (коронарна болест на сърцето или мозъчен инсулт) и ЗД 2 се установява чрез провеждането на скрининг (на всеки 5 години) и чрез наличните болнични данни, събирани до 2009 г. Общо 657 индивиди (9,2% от кохортата) се причисляват към групата със затлъстяване като 42,5% от тях се класифицират като МНО. В рамките на проследяването (17,4 години) при общия изследван контингент се регистрират 828 случаи на поява на ССЗ и съотв. – 798 случаи на поява на ЗД 2. Лицата с МНО се оказват с повишен риск от ССЗ (HR 1/4 1,97, 95% CI: 1,38-2,80) и ЗД 2 (3,25, 95% CI: 2,32-4,54), сравнени с метаболитно здравите индивиди с нормално телесно тегло. Повисок е рискът от развитие на ЗД 2 при метаболитно нездравите лица със затлъстяване (МС) в сравнение с МНО (1,8, 95% CI: 1,39-2,83), като рискът от развитие на ССЗ остава съпоставим при двете групи (1,23, 95% CI: 0,81-1,87). Изводите от проучването са, че МНО фенотипът се свързва с по-нисък риск от развитие на ЗД 2 в сравнение с метаболитно нездравите затлъстели лица, като рискът от

**Фигура 2.** Стойности на ИРИ 0', 60' и 120' при изследваните групи жени



\*\* – наличие на статистически значима разлика,  $P < 0,01$   
 \*\*\* – наличие на статистически значима разлика,  $P < 0,001$

**Фигура 3.** Стойности на HOMA-IR при изследваните групи жени



\*\*\* – наличие на статистически значима разлика,  $P < 0,001$

поява на ССЗ е висок и при двата фенотипа със затлъстяване (9).

Установено е, че инсулиновата резистентност, основна характеристика на МС, представлява ключов рисков фактор в етиологията на ЗД 2, артериална хипертония, дислипидемия, атеросклеротична васкуларна болест и коронарна болест на сърцето. Това показва важноста да се търси и открива ИР още преди изъавата на самото заболяване, когато терапевтичната намеса би била по-успешна в сравнение – приложена при вече манифестно заболяване (10, 11).

Коронарната болест на сърцето с основната патогенетична единица – атерогенна дислипидемия, се възприема за епидемия на съвременната цивилизация. Световната здравна организация (СЗО) предполага, че до 2020 г. в световен мащаб ще има общо 11,1 случаи на смърт, предизвикана от коронарни инциденти. Изследването на липидния профил представлява рутинен биохимичен метод за оценка на атерогенния статус при индивиди с риск от ССЗ. То включва определянето на серумните нива на ТГ, ОХ и неговите субфракции – ХДЛ-хол и ЛДЛ-хол. Framingham heart study доказва, че промените (повишаването) на нивата на ЛДЛ-хол играят първостепенна роля в прогресията на коронарната атеросклеротична болест. Затова серумните нива на ЛДЛ-хол се използват за таргет, както при инициране, така и при провеждане на липидопонижаващо лечение (12).

Изчисляването на редица съотношения, включващи гореизброените липидни параметри, може да подобри скрининга на рисковите индивиди – особено при тези, които имат референтни стойности на ЛДЛ-хол.

Според Grover двете съотношения – ЛДЛ-хол/ХДЛ-хол и ТГ/ХДЛ-хол представляват силни предиктивни фактори за поява на бъдещи СС събития (13). Логаритмично трансформираното съотношение от измерените ТГ и ХДЛ-хол или т. нар. плазмен атерогенен индекс (AIP) корелира тясно с големината на ЛДЛ-частиците и може да служи за индикатор на атерогенния

липопротеинов фенотип. Клиничните проучвания показват, че AIP е предиктор за риска от ССЗ, представлява лесен, достъпен сърдечно-съдов маркер и полезна мярка за отговора от проведено лечение (14).

Пациентите със ЗД 2 са с повишен риск от сърдечно-съдова заболеваемост и смъртност. Сигнификантното увеличаване на нивата на ТГ, стойностите на ТГ/ХДЛ-хол, AIP, артериално налягане и ИТМ при пациентите със ЗД 2 и МС в сравнение с тези със ЗД 2 без МС, предполага по-голям риск за развитие на ССЗ. Това е в конкорданс с факта, че инсулиновата резистентност индуцира редица метаболитни промени като хипергликемия, дислипидемия и най-вероятно в по-малка степен – артериална хипертония, като всички те потенцират процеса на атерогенеза (15).

По-високи се оказват стойностите на AIP при МС, сравнени с тези при МНО ( $P < 0,001$ ). Резултатите потвърждават факта, че инсулиновата резистентност е многообразно състояние, водещо до развитие както на ЗД 2, така и на липидни нарушения, артериална хипертония и ССЗ.

Индексите на Castelli (CRI) се базират на три важни параметри от липидния профил, а именно – ОХ, ЛДЛ-хол и ХДЛ-хол. Регистрират се по-високи стойности на CRI-I при жените с МС в сравнение с тези при контролите. The Canadian working group избира съотношението ОХ/ХДЛ-хол като фактор, който трябва да се следи при провеждане на липидопонижаваща терапия. Този индекс се характеризира с по-висока чувствителност и специфичност при определяне на ССЗ риск в сравнение с отделните стойности на ОХ, особено при индивиди със стойности на ТГ  $> 3,39$  ммол/л (16). Има убедителни доказателства за връзката на ОХ/ХДЛ-хол с формирането на коронарните плаки (17). В проучването PROCAM се потвърждава факта, че индивиди с изчислено съотношение ЛДЛ-хол/ХДЛ-хол  $> 5$  имат 6 пъти по-висок риск от развитие на коронарни инци-

денти в сравнение с контролните лица (18).

Fadwa Essiagh и сътр. (19) изследват влиянието на затлъстяването и МС върху липопротеиновите профили и ССЗ риск чрез изчисляване на липидни съотношения и AIP при жени от Мароко. Проучването включва 240 жени, разделени в 3 групи: контроли (Група 1), жени със затлъстяване, но без МС (Група 2) и жени със затлъстяване и МС (Група 3). Извършена е оценка на антропометрични и липидни показатели, изчислени са редица атерогенни съотношения, включително и AIP. Група 1 и Група 2 се представят със съпоставими липопротеинови профили. При Група 3 се откриват по-високи нива на ТГ в сравнение с тези при Група 1, което от своя страна повишава стойностите на AIP. Дислипидемията при Група 3 се демонстрира с по-високи нива на ТГ, по-ниски нива на ХДЛ-хол и по-високи стойности на изчислените атерогенни индекси/съотношения в сравнение с тези при Група 2. Счита се, че описаните нарушения са отговорни за повишаването на риска от ССЗ. Оказа се, че атерогенните съотношения корелират по-силно със сърдечно-съдов риск в сравнение с взетите по отделно липидни показатели. Авторите потвърждават факта, че наличието на МС несъмнено води до промени в серумния липопротеинов профил на жените със затлъстяване. По повод установената висока предиктивна стойност, атерогенните индекси/съотношения и AIP се възприемат като полезни средства за диагностика и прогноза на ССЗ (19).

### **Заклучение**

Установените по-високи базални и стимулирани стойности на КЗ и ИРИ, НОМА-IR и атерогенни индекси/съотношения показват носителство на по-висок риск от развитие на ЗД 2 и ССЗ при жените с метаболитен синдром в сравнение с метаболитно здравите жени с наднормено тегло/затлъстяване.

# Metabolic and Atherogenic Parameters in Women with Metabolic Syndrome and Metabolically Healthy Overweight/Obese Women

Koleva, Daniela Iv.<sup>1</sup>, Orbetzova, Maria M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Clinic/Department of Endocrinology and metabolic diseases, „Sv. Georgy“ University Hospital, Medical Faculty, Medical University, Plovdiv

## Address for correspondence:

Daniela Koleva, MD, PhD

Clinic of Endocrinology and metabolic diseases,

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

Plovdiv 4000, 15A „Vassil Aprilov“ Blvd

e-mail: nelka\_medicine@abv.bg

## Abstract

Patients with metabolic syndrome (MS) are characterized by an increased risk of cardiovascular disease (CVD) development due to the presence of a cluster of risk factors such as visceral adiposity, different degrees of glucose tolerance impairment, atherogenic dyslipidemia and arterial hypertension. There has been a great increase in MS prevalence in the last few decades leading to a parallel growth of general population risk of CVD occurrence.

**The aim** of the study was to assess the risk factors for the development of type 2 diabetes mellitus (T2DM) and CVD based on a comparative analysis of glucose and lipid metabolism parameters as well as calculated atherogenic indices/ratios in women with established MS and metabolically healthy overweight/obese women (MHO).

**Materials and methods:** The study comprised of 52 women with MS (mean age of 37,75±11,38 years and with mean BMI – 34,64±4,81 kg/m<sup>2</sup>) and 22 age and BMI matched metabolically healthy overweight/obese women (mean age of 35,27±9,09 years and with mean BMI – 35,09±3,23 kg/m<sup>2</sup>). The following measurements and laboratory tests were conducted in all the participants: weight, height, waist and hip circumferences, oral glucose tolerance test (OGTT) with blood samples for glucose (GLU) and insulin (IRI) measurements obtained 0, 60 and 120 minutes after oral 75 g glucose administration, serum levels of total cholesterol (TC), HDL-C, triglycerides (TG). LDL-C values were determined using the Friedewald equation = {TC - (HDL-C+TG/2,2)}. Body mass index (BMI)=weight(kg)/height(m)<sup>2</sup>, waist-hip-ratio (WHR), homeostasis model assessment insulin resistance index (HOMA-IR)=(GLU<sup>0</sup> × IRI<sup>0</sup>)/22,5), Castelli risk indices I (TC/HDL-C) and II (LDL-C/HDL-C), TG/HDL-C and atherogenic index of plasma (AIP) = {(logTG)/HDL-C} were calculated.

**Results:** Comparable values of age and anthropometric parameters were determined in the two investigated groups of women. Significantly higher levels of fasting and stimulated GLU and IRI as well as HOMA-IR values were evaluated in MS women compared to those in MHO women. We found significantly higher serum levels of TG and values of TC/HDL-C, TG/HDL-C and AIP in women with MS compared to MHO women. Serum HDL-C levels were established to be significantly lower in MS participants.

**Conclusion:** Higher levels of basal and stimulated GLU and IRI, values of HOMA-IR and atherogenic indices/ratios showed a higher risk of T2DM and CVD development in women with metabolic syndrome compared to metabolically healthy overweight/obese women.

**Key words:** metabolically healthy obesity, blood glucose, insulin, atherogenic indices/ratios

## Introduction

Metabolic syndrome (MS) is considered to affect approximately 30% of adults worldwide between the ages of 20 and 70. Its incidence continues to grow tremendously and for this reason we suggest that MS will soon replace smoking as a leading risk factor for developing cardiovascular disease (CVD) (1).

The importance of assessing the risk of atherosclerosis in women with insulin resistance derives from the fact that the separate components of MS interact in a synergistic rather than in a simple additive way. Thus, the carriers of expanded MS are exposed to the combined effect of the following risk factors: a stimulated abdominal fat deposition with increased atherogenic/ antiatherogenic adipocytokines ratio; an occurrence of glucose tolerance, lipid, proinflammatory and prothrombotic disturbances; a rise of blood pressure (AN) values with a change of its circadian rhythm – all leading to an early and rapid progression of endothelial damage and increased cardiovascular morbidity and mortality respectively (2, 3).

Recently, scientific interest in so called „metabolically healthy obesity“ has increased greatly. It is a condition associated with the lack of typical metabolic syndrome components, namely glucose intolerance/T2DM, atherogenic dyslipidemia and arterial hypertension (4). It is known that MHO individuals display less visceral adipose tissue and a reduced inflammatory profile showing lower levels of circulating proinflammatory cytokines compared to those in metabolically unhealthy obese individuals (5).

It is believed that MHO individuals belong to the phenotype characterized by a favourable metabolic and cardiovascular profile. The prevalence of MHO has been estimated to vary from 6 to 40% (6). Moreover, in 2010 another epidemiological study showed data describing an incidence of MHO between 10 and 25% among the investigated population (7).

The aim of the present study was to assess the risk factors for the development of type 2 diabetes mellitus (T2DM) and CVD presenting a comparative analysis of glucose and lipid metabolism parameters as well as calculated atherogenic indices/ratios in women with established MS and metabolically healthy overweight /obese women (MHO)

## Materials and methods:

The present study was conducted in the Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases at „Sv. Georgy“ University Hospital, Plovdiv. It comprised of 52 women with MS (mean age of 37,75±11,38 years and with mean BMI – 34,64±4,81 kg/m<sup>2</sup>) and 22 age-

and BMI-matched metabolically healthy overweight/obese women (mean age of 35,27±9,09 years and with mean BMI – 35,09±3,23 kg/m<sup>2</sup>).

The diagnosis of MS was made according to the criteria of the International Diabetes Federation (IDF), harmonized with those of AHA/NHLBI in 2009 (8) when central obesity as a mandatory component was present (waist circumference ≥ 80 cm for women Caucasians) in combination with two of the following abnormalities: elevated triglycerides >1,7 mmol/L; low HDL-C<1,29 mmol/L for women or specific treatment; high blood pressure ≥ 130/85 mmHg or treatment of diagnosed hypertension; increased fasting plasma glucose ≥ 5,6 mmol/L or diagnosed type 2 DM/IFG.

Metabolically healthy overweight/obese women were defined as individuals with BMI ranging from 25,0 to 39,9 kg/m<sup>2</sup>, lacking the aforementioned components of MS (4).

The following measurements and laboratory tests were conducted in all the participants: weight, height, waist and hip circumferences, oral glucose tolerance test (OGTT) with blood samples for glucose (GLU) and insulin (IRI) measurements obtained 0,60 and 120 minutes after oral 75 g glucose administration, serum levels of total cholesterol (TC), HDL-C, triglycerides (TG). LDL-C values were determined using the Friedewald equation – {TC - (HDL-C+TG/2,2)}. Body mass index (BMI)= =weight(kg)/height(m)<sup>2</sup>, waist-hip-ratio (WHR), homeostasis model assessment insulin resistance index (HOMA-IR)=(GLU<sup>0</sup> × IRI<sup>0</sup>)/22,5), Castelli risk indices I (TC/HDL-C) and II (LDL-C/HDL-C), TG/HDL-C and atherogenic index of plasma (AIP) = {(logTG)/HDL-C} were calculated.

Waist circumference was determined using a standard method – after the act of expiration measuring the area between the bottom edges of the ribs and the iliac crests. The measurement of hip circumference was performed at the level of the greater trochanters. Blood samples for the laboratory tests were taken early in the morning after an overnight 12-hour fast when an informed consent was signed. Venous blood samples for determination of GLU, IRI and lipid parameters were taken to the Central Clinic Laboratory, Sv. Georgy University Hospital.

Insulin was tested using a commercial kit for quantitative determination of immunoreactive insulin on the basis of microparticle immunoassay analysis (MEIA) on an AxSYM system (ABBOTT, USA) with the following characteristics: sensitivity ≤ 0,8 mIU/ml; inter-assay variation, CV% < 2,9; intra-assay variation CV% < 5,3. Serum glucose levels were determined by a standard enzymatic colorimetric (GOD-POD) method with the following characteristics: dilution recovery – ≤ 20 mmol/L; inter assay variation, CV from 2,40 to 2,94%, intra assay variation, CV% < 1,2.

Serum levels of TC and TG were established using the enzymatic (Trinder) method and those of HDL-C - by a direct enzymatic colorimetric method, respectively. A comprehensive set of hormonal tests was done in all study participants (gonadotropins, estradiol, androgens, prolactin, TSH, free T4, serum cortisol at 8 h and 22 h) in order to exclude pregnancy and/or other endocrine pathology: Cushing's syndrome, inherited adrenal hyperplasia, prolactinoma, hypo/hyperthyroidism, hypopituitarism, hypogonadism, androgen secreting tumors etc.

The statistical analysis was performed by SPSS version 21.0 for Windows. A comparative analysis of clinical and metabolic parameters was performed among the studied groups of women. The results are presented as mean±SD. Statistical significance was taken at level of  $P < 0,05$ .

## Results

No significant difference of age and anthropometric parameters was determined between the two investigated groups of women (Tabl. 1).

Significantly higher levels of fasting and stimulated GLU and IRI values were evaluated in the MS women compared to those in the MHO women (Figures 1 and 2) Furthermore, the MS group showed higher values of HOMA-IR compared to the MHO group ( $3,45 \pm 1,70$  vs  $1,54 \pm 0,57$ ,  $P < 0,001$ ) (Fig. 3).

We found significantly higher serum levels of TG and values of TC/HDL-C, TG/HDL-C and AIP in women with MS compared to MHO women. Serum HDL-C levels were established to be significantly lower in MS participants (Tabl. 2).

## Discussion

The metabolically healthy obese (MHO) phenotype refers to obese individuals with a favourable metabolic profile. Guy-Marino Hinnouho et al. examined the association of MHO phenotype with incident cardiovascular disease (CVD) and type 2 diabetes. Body mass index and metabolic condition were assessed among 7122 participants (69,7% men), aged 39-63 years in 1991-1993. Incident CVD (coronary heart disease or stroke) and T2DM were ascertained from medical screenings (every 5 years), hospital data, and registry linkage until 2009. A total of 657 individuals (9,2% of the cohort) were obese and 42,5% of these were classified as MHO in 1991-1993. Over the median follow-up of 17.4 years, there were 828 incident cases of CVD and 798 incident cases of type 2 diabetes. Compared with metabolically healthy normal weight individuals, MHO subjects were at increased risk for CVD (HR 1.4, 95% CI: 1,38-2,80) and type 2 diabetes (3,25, 95% CI: 2,32-4,54). There was

excess risk in metabolically unhealthy obese compared with MHO for type 2 diabetes MHO (1,98, 95% CI: 1,39-2,83) but not CVD (1,23, 95% CI: 0,81-1,87). The authors concluded that for T2DM, the MHO phenotype is associated with lower risk than the metabolically unhealthy obese, but for CVD the risk is as elevated in both obesity phenotypes (9).

Insulin resistance, a main feature of MS, has been accepted to be a major risk factor in the etiology of T2DM, hypertension, dyslipidemia, atherosclerotic vascular disease and coronary heart disease. Therefore, it is important to recognize IR in the predisease stage when therapeutic intervention is likely to be more successful than in manifest disease (10, 11).

Coronary heart disease is the epidemic of modern civilization in which dyslipidemia contributes significantly to its pathogenesis. WHO predicts 11.1 million deaths globally and 71% deaths in developing countries due to CAD by 2020 A.D.

Lipid profile refers to some routinely done biochemical tests to assess the atherogenic status of individuals at risk of coronary artery disease. It includes serum TG, serum TC and its subfractions like HDL-C and LDL-C. The Framingham heart study over a number of years has established the role of deranged lipid profile in the progression of coronary artery disease and deranged LDL-C levels are the primary target for treatment (12).

Calculating certain ratios using these parameters, especially in situations where LDL-C levels are below target range, may increase the identification of at-risk individuals.

According to Grover, either the ratio of LDL-C/HDL-C or TG/HDL-C is the best related predictor of future cardiovascular events (13). The logarithmically transformed ratio of plasma TG to HDL-C correlates closely with the LDL particle size and can serve as an indicator of the atherogenic lipoprotein phenotype. Clinical studies have shown that AIP predicts cardiovascular risk and that it is an easily available cardiovascular risk marker as well as a useful measure of the response to treatment (14).

Patients with T2DM are at increased risk of cardiovascular morbidity and mortality. The significant increase in TG, the TG/HDL-C ratio, AIP, BP and the BMI of diabetic patients with MS when compared to the type 2 diabetic patients without MS, predicts that patients with T2DM with MS are at a higher risk level for CVD. This is in concordance with the fact that insulin resistance induces several metabolic changes such as hyperglycaemia, dyslipidaemia and perhaps to a lesser extent, hypertension, which all contribute to the development of atherosclerosis (15).

We found significantly higher values of AIP in women with MS compared to MHO individuals ( $P < 0,001$ ). Undoubtedly, these results confirm the fact

Table 1.

Age and anthropometric parameters in the studied groups of women

| Parameters               | Groups of women |                 |
|--------------------------|-----------------|-----------------|
|                          | MC (n=52)       | MHO (n=22)      |
| Age (years)              | 37,75±11,38     | 35,27±9,09 NS   |
| Height (m)               | 1,65±0,06       | 1,66±0,06 NS    |
| Weight (kg)              | 99,19±18,73     | 95,87±16,48 NS  |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> ) | 34,64±4,81      | 35,09±3,23 NS   |
| Waist circumference (cm) | 106,04±12,52    | 100,55±8,56 NS  |
| Hip circumference (cm)   | 119,26±13,02    | 116,05±10,58 NS |
| WHR                      | 0,89±0,06       | 0,87±0,06 NS    |

NS – lack of significant difference, P>0,05

that insulin resistance is a multiple condition leading to the development of T2DM, lipid disorders, arterial hypertension and CVD.

Castelli's Risk indices (CRI) are based on three important lipid profile parameters i.e. TC, LDL-C and HDL-C. Higher values of CRI were determined in the women with MS compared to those in MHO participants. The Canadian working group had chosen the TC/HDL-C ratio as a secondary goal of therapy considering it to be a more sensitive and specific index of cardiovascular risk than TC, particularly in individuals with TG>3,39 mmol/l (16). Some studies have shown an association of TC/HDL-C ratio with coronary plaques formation (17). In the PROCAM study, it was observed that subjects with LDL-C/HDL-C >5 had a 6 times higher rate of coronary events (18).

Essiarab et al. (19) studied the impact of obesity and MS on lipoprotein profiles and cardiovascular risk through lipid ratios and AIP in Moroccan women. Their study included 240 Moroccan women divided into 3 groups: controls (Group 1), obese women without MS (Group 2) and obese women with MS (Group 3). Anthropometric and lipid measurements were

taken and specific lipid ratios assessed, as well as non-HDL cholesterol (Non-HDL-C) and AIP. Group 2 presented similar lipoprotein profiles compared with Group 1. Group 3 had higher TG levels than Group 1, which, in turn, increased HDL and AIP values. Dyslipidemia in Group 3 was demonstrated by higher TG levels, lipid ratios and AIP and lower HDL-C levels compared with Group 2. All of these abnormalities are responsible for elevation of CVD risk. Closer associations were found between cardiovascular risk and lipid ratios and AIP than lipids alone. The study confirmed that MS affects the serum lipoprotein profile of obese women. Lipid ratios, non-HDL-C and AIP remained useful tools for the diagnosis and prognosis of CVD by their associations with lipid parameters and their high predictive values (19).

### Conclusion:

Higher levels of basal and stimulated GLU and IRI, values of HOMA-IR and atherogenic indices/ratios showed a higher risk of T2DM and CVD development in women with metabolic syndrome compared to metabolically healthy overweight/obese women.

Table 2.

Parameters of lipid metabolism and atherogenic indices/ratios in the studied groups of women

| Parameters     | Groups of women |                |
|----------------|-----------------|----------------|
|                | MC (n=52)       | MHO (n=22)     |
| TC (mmol/L)    | 5,08±1,00       | 5,11±0,56 NS   |
| HDL-C (mmol/L) | 1,09±0,27       | 1,27±0,27 **   |
| LDL-C (mmol/L) | 3,18±0,87       | 3,37±0,54 NS   |
| TG (mmol/L)    | 1,77±0,96       | 1,02±0,38 ***  |
| TC/HDL-C       | 4,90±1,38       | 4,21±1,11 *    |
| LDL-C/HDL-C    | 3,10±1,11       | 2,83±1,00 NS   |
| TG/HDL-C       | 1,75±1,11       | 0,83±0,36 ***  |
| AIP            | 0,19±0,25       | - 0,02±0,13*** |

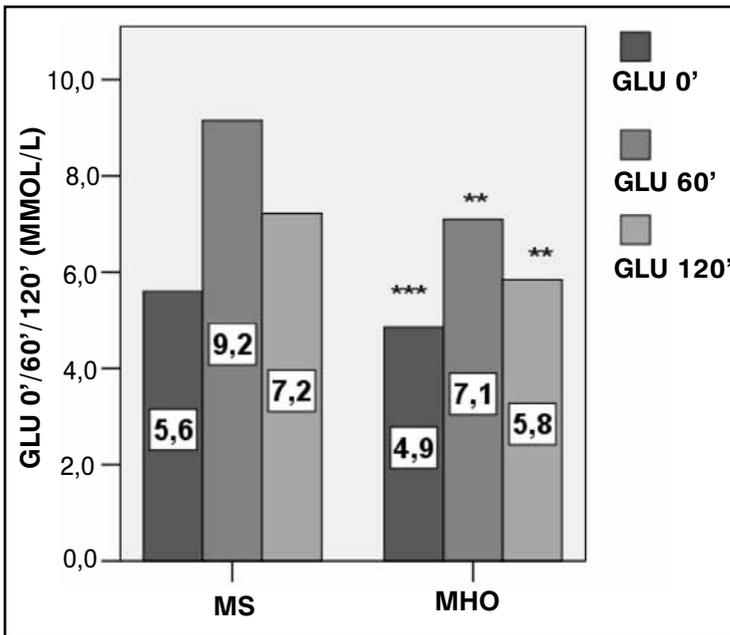
NS – lack of significant difference, P>0,05

\* – a presence of significant difference, P<0,05

\*\* – a presence of significant difference, P<0,01

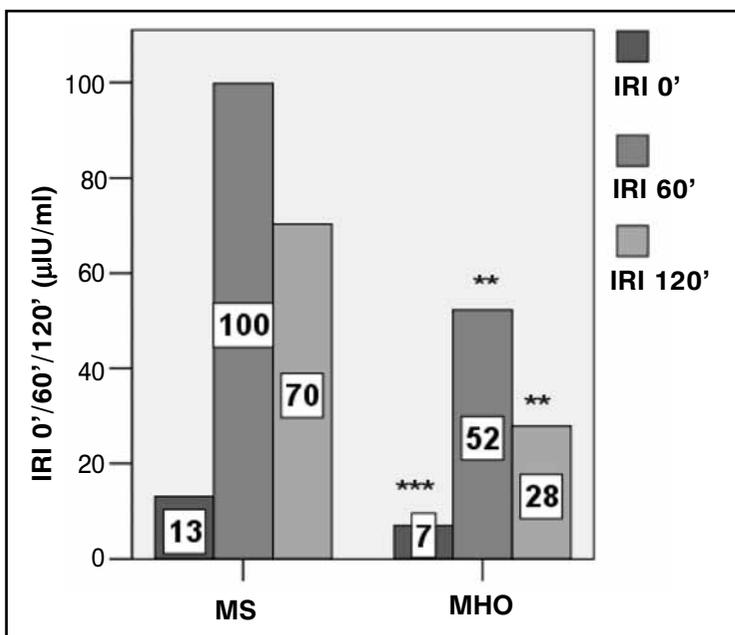
\*\*\* – a presence of significant difference, P<0,001

**Figure 1.** Values of GLU 0', 60' and 120' in the studied groups of women



\*\* – a presence of significant difference, P<0,01  
 \*\*\* – a presence of significant difference, P<0,001

**Figure 2.** Values of IRI 0', 60' and 120' in the studied groups of women

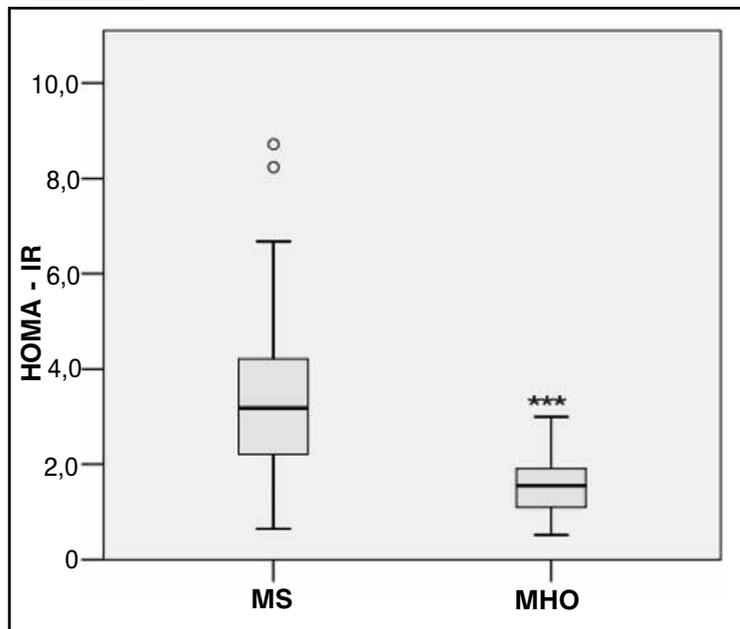


\*\* – a presence of significant difference, P<0,01  
 \*\*\* – a presence of significant difference, P<0,001

## References

1. Gogia A, Agarwal PK. Metabolic syndrome. *Indian Med Sci* 2006; 69: 72-81.
2. Nesto RW. The relation of insulin resistance syndromes to risk of cardiovascular disease. *Rev Cardiovasc Med* 2003; 4(6): 511-518.
3. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*, 2001; 24(4): 683-689.
4. Puri R. Is it Finally Time to Dispel the Concept of Metabolically-Healthy Obesity? *J Am Coll Cardiol* 2014; 63(24): 2687-2688.
5. Denis GV, Obin MS. Metabolically healthy obesity: origins and implications. *Molec Asp of Med* 2013; 34(1): 59-70.
6. Rey-Lopez JP, de Rezende LF, Pastor-Valero M, Tess BH. The prevalence of metabolically healthy obesity: a systemic review and critical evaluation of the definitions used. *Obes Rev* 2014; 15(10) - 781-790.
7. Bluher M. The distinction of metabolically „healthy“ from „unhealthy“ obese individuals. *Curr Opin Lipidol* 2010; 21(1): 38-43.
8. Alberti K, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome. A Joint Interim Statement of the IDF Task Force on Epidemiology and Prevention; NHLBI, AHA, WHF, International Atherosclerosis Society and International Association for Study of Obesity. *Circulation* 2009; 120:1640-1645.
9. Hinnouho GM, Czernichow S, Dugravot A, Nabi H, Brunner EJ, Kivimaki M, et al. Metabolically healthy obesity and the risk of cardiovascular disease and type 2 diabetes: the Whitehall II cohort study. *Eur Heart J Advance Access* 2014, 1-9.
10. Boden G. Pathogenesis of type 2 diabetes. Insulin Resistance. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001; 30(4): 801-815
11. Bray G. Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(6):2583-2589.
12. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002; 106:3143-3421.
13. Grover SA, Levington C, Panquet S. Identifying adults at low risk for significant hyperlipidemia: a validated clinical index. *J Clin Epidemiol* 1999; 52:49-55.
14. Frohlich J, Dobišová M. Fractional esterification rate of cholesterol and ratio of triglycerides to HDL-cholesterol are powerful predictors of positive findings on coronary angiography. *Clin Chem* 2003; 49:1873-1880.

**Figure 3.** Values of HOMA-IR in the studied groups of women



\*\*\* – a presence of significant difference,  $P < 0$ ,

15. Kalidhas P, Kanniyappan D, Gandhi K, Aruna RM. Coronary Artery Disease Risk Factors in Type 2 Diabetes Mellitus with Metabolic Syndrome in the Urban South Indian Population. *J Clin Diag Res* 2011; 5(3):51651-8.

16. Genest J, Frohlich J, Fodor G, McPherson R. The Working Group on Hypercholesterolemia and Other Dyslipidemias. Recommendations for the management of dyslipidemia and the prevention of cardiovascular disease: 2003 update. *CMAJ* 2003; 169:921-924.

17. Nair D, Carrigan TP, Curtin RJ, Popovic ZB, Kuzmiak S, Schoenhagen P, et al. Association of total cholesterol/ high-density lipoprotein cholesterol ratio with proximal coronary atherosclerosis detected by multislice computed tomography. *Prev Cardiol* 2009; 12(1):19-26.

18. Assmann G, Cullen P, Schulte H. The Munster Heart Study (PROCAM). Results of follow-up at 8 years. *Eur Heart J* 1998; 19 (Suppl A): A2-A11.

19. Essiarab F, Taki H, Lebrazi H, Sabri M, Saile R. Usefulness of lipid ratios and atherogenic index of plasma in obese Moroccan women with or without metabolic syndrome. *Ethn Dis* 2014; 24(2):207-212.

# 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

## Сравнение на сцинтиграфски образи с различни радиофармацевтици - $^{99m}\text{Tc}$ MIBI и $^{99m}\text{Tc}$ Tetrofosmin при един и същ пациент с първичен хиперпаратиреоидизъм

Ботушанова, Албена Д.<sup>1</sup>, Ботушанов, Николай П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Катедра Клинична Онкология, Секция Нуклеарна медицина - МУ Пловдив

<sup>2</sup> Втора катедра по Вътрешни болести, Секция Ендокринология и болести на обмяната - МУ Пловдив

### Резюме

Представяме случай на жена на 56 годишна възраст с установени параклинични и клинични данни за първичен хиперпаратиреоидизъм и неуспешно предшестващо оперативно лечение. Поради високи стойности на калций 2,71 mmol/l, ПТХ 273,6 pg/ml, долнограничен фосфор 0,78 mmol/l и липсата на УЗД и МРТ данни за наличие на патологично променени паращитовидни жлези, при пациентката се проведе едноизотопна двуфазова сцинтиграфия на паращитовидни жлези с  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmin, съчетан с ранна SPECT техника. Липсваха сцинтиграфски данни за зона на остатъчна активност в областта на шията и медуларна активност, които да се свържат с хиперфункциониращ паращитовиден аденем.

Пет месеца по-късно пациентката беше изпратена повторно за сцинтиграфия на паращитовидни жлези поради покачване на стойностите на серумния калций – 2,92 mmol/l и на ПТХ - 334,6 pg/ml и засилване на клиничните оплаквания.

На проведената едноизотопна двуфазова сцинтиграфия с  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI съчетана с ранна SPECT техника се визуализира фокус натрупващ радиомаркера, разположен в гясно на шията на ранните SPECT образи и на късните планарни образи, суспектен за паращитовиден аденем. При последвалата оперативна интервенция е отстранен аденем на долна паращитовидна жлеза в гясно, доказан хистологично и съвпадащ със сцинтиграфската находка.

Този случай дава възможност да се сравнят два скена с различни радиофармацевтици в хода на развитие на ПХПТ при един и същи пациент. Различни фактори могат да обяснят конверсията от първоначално негативен в позитивен скен. При сцинтиграфията с  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI и  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmin са налице редица фактори от биологично и техническо естество, които повлияват тяхното натрупване от паращитовидните аденеми и потенциално могат да повлияят чувствителността и специфичността на метода.

**Key words:** първичен хиперпаратиреоидизъм, сцинтиграфия,  $^{99m}\text{Tc}$  - sestamibi,  $^{99m}\text{Tc}$ -tetrofosmin

**Въведение:** Първичният хиперпаратиреоидизъм (ПХПТ) се дължи на автономна свръхпродукция на паратиреоиден хормон (ПТХ) от една или повече абнормно променени паращитовидни жлези. Доскоро считан за рядко заболяване, в последните години с навлизане в клиничната практика на рутинно изследване на нивата на серумния калций се установи, че неговата честота е приблизително 42 на 100 000 души. В преобладаващата част от случаите протича безсимптомно. Среща се 2 до 3 пъти по-често при жени. Честотата му нараства с възрастта и достига до 4 на 1000 при жени над 60 годишна възраст. При повечето от пациентите с ПХПТ липсват клинични симптоми и заболяването се диагностицира по регистрираните промени в серумните нива на калций, фосфор и ПТХ (1, 2). При 85-90% от пациентите причината за ПХПТ е наличие на солитарен паращитовиден аденем, а в останалите 10-15% се дължи на първична хиперплазия на паращитовидните жлези (3). В близкото минало стандартното хирургично лечение при ПХПТ е било билатералната шийна експлорация. Понеже при повечето от пациентите е засегната само една жлеза, извършването на билатерална шийна експлорация при всички пациенти с хиперпаратиреоидизъм не винаги е необходимо. За да се намалят продължителността на операцията и рискът от постоперативни усложнения в последните години

в клиничната практика широко навлезе унилатералната шийна експлорация с отстраняване на предварително установения и топично локализиран агеном (4). Като се вземат в предвид възможните вариации в броя и разположението на абнормно променените паращитовидни жлези, от голямо значение са специфичността и чувствителността на използваните за предоперативната им локализация методи за образна диагностика. В тази връзка, въпреки някои свои ограничения и вариабилност в точността, предоперативната сцинтиграфия на паращитовидните жлези с  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI или  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmin в комбинация с ехографското изследване имат точно установена роля в протоколите за предоперативно изследване при пациенти с ПХПТ (5, 6), особено в случаите при атипична локализация на хиперфункциониращите паращитовидни агеноми и при рецидив на заболяването.

Представяме случай на пациентка с доказан ПХПТ, при която първично негативната сцинтиграфия извършена с  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmin, въпреки съпътстващите биохимични промени характерни за заболяването, се трансформира в позитивен скен при повторното провеждане на сцинтиграфското изследване с друг радиофармацевтик –  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI, 5 месеца по-късно.

### Клиничен случай - описание

Жена на 56 годишна възраст с установени през месец януари 2013 г. по повод на астеноадинамия, болки по костите и рецидивираща двустранна нефролитиаза, високи стойности на: общ калций 2,71 mmol/l (2,1-2,6 mmol/l 2), ПТХ 273,6 pg/ml (15-65 pg/ml) и долнограничен фосфор 0,78 mmol/l (0,77-1,36 mmol/l). В тази връзка са извършени редица други параклинични и образни изследвания, които показват долнограничен 25(OH) витамин D3 – 32,5 ng/ml (30-50 ng/ml) и понижена костноминерална плътност (КМП) на лумбалните прешлени (T-score – 3,1). При направеното ултразвуково изследване на шийната област е регистриран суспектен за паращитовиден агеном хипоехогенен възел с размери 8,4/6,4/9 mm, под долния полюс на десния лоб на щитовидната жлеза с хиперехогенно хало и повишено кръвоснабдяване. През м. март 2013 г. е извършена тотална тиреоидектомия, като макроскопски интраоперативно не е потвърдено наличие на паращитовиден агеном. Хистологичният резултат е показал нодозна колоидна струма. Постоперативно е регистрирано задържане на високите стойности на серумния калций и ПТХ, без съпътстващи УЗД и МРТ данни за наличие на патологично променени паращитовидни жлези, поради което пациентката е насочена за извършване на сцинтиграфско изследване. През м. май 2014 г. се проведе едноизотопна двуфазова сцинтиграфия на паращитовидни жлези с  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmin (Фиг. 1) съчетана с ранна SPECT техника (Фиг. 2), при която липсваха сцинтиграфски данни за зона на остатъчна активност в областта на шията и медиастинума, които да се свържат с агеном на паращитовидни жлези.

През м. ноември 2014 г., поради покачване стойностите на серумния калций 2,92 mmol/l (2,1-2,62 mmol/l), ПТХ 334,6 pg/ml (15-65 pg/ml), засилване на клиничните оплаквания и липса на катеори-

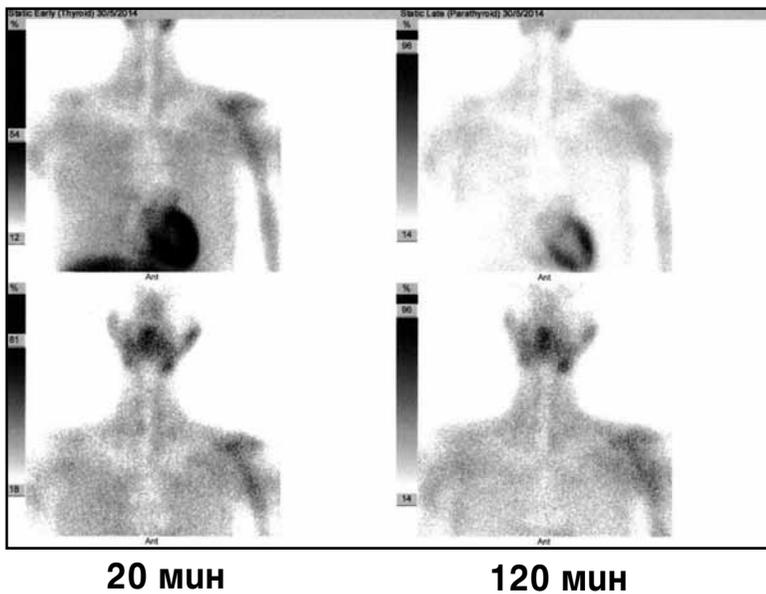
чни УЗД данни за наличен паращитовиден агеном, пациентката беше изпратена повторно за извършване на сцинтиграфско изследване на паращитовидните жлези. Проведе се едноизотопна двуфазова сцинтиграфия, като беше използван друг радиофармацевтик –  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI (Фиг. 3), съчетана с ранна SPECT техника (Фиг. 4).

При проведената едноизотопна двуфазова сцинтиграфия на паращитовидни жлези с  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI, съчетана с ранна SPECT техника при пациентката се изобрази зона на остатъчна активност в областта на шията в дясно, суспектна за агеном на паращитовидна жлеза. Въпреки липсата на УЗД и МРТ данни, подкрепящи сцинтиграфските резултати, пациентката претърпя оперативна интервенция, при която бе отстранен агеном, ангажиращ долна дясна паращитовидна жлеза, потвърден хистологично и съвпадащ със сцинтиграфската находка. Постоперативно нивата на серумния калций и ПТХ се нормализираха.

### Обсъждане

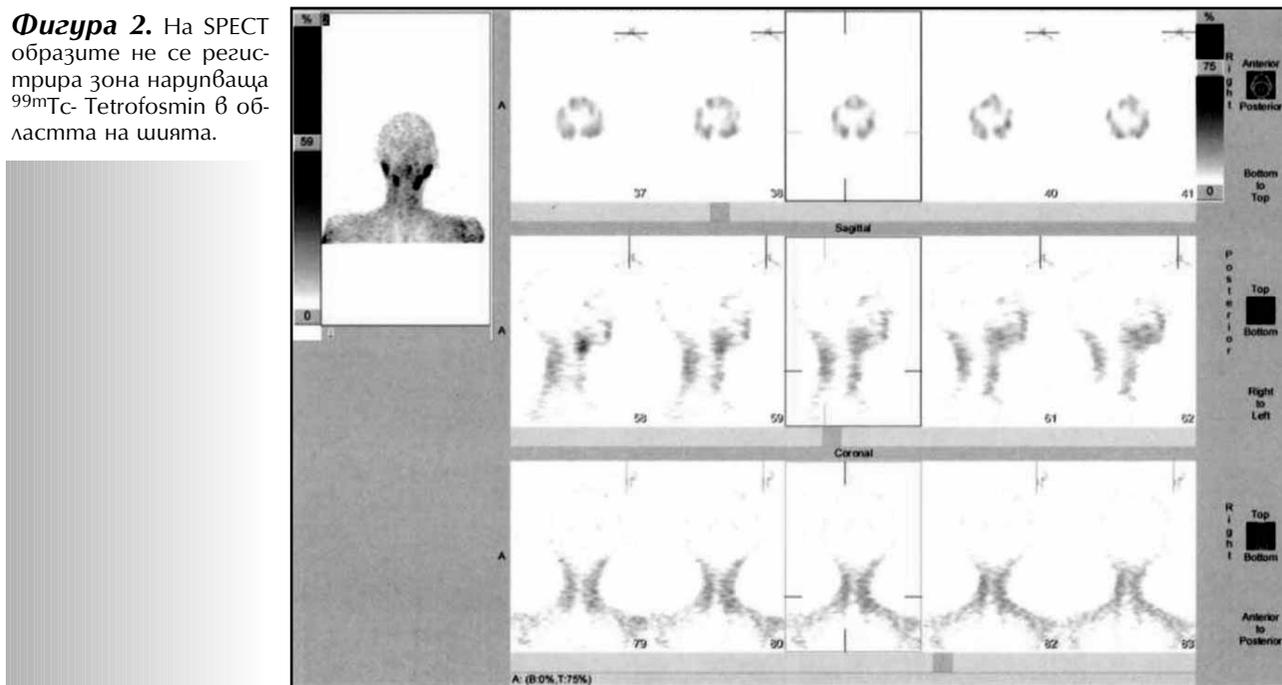
Този случай дава възможност да се сравнят две сцинтиграфски изследвания, проведени с различни радиофармацевтици в хода на развитие на ПХПТ при един и същи пациент. Различни фактори могат да обяснят конверсията от първоначално негативен в позитивен скен. При сцинтиграфията с  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI и  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmin са налице редица фактори от биологично и техническо естество, които повлияват тяхното натрупване в паращитовидните агеноми и потенциално могат да повлияят чувствителността и специфичността на метода.

$^{99m}\text{Tc}$ -MIBI и  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmin са моновалентни липофилни катиони, които чрез пасивна дифузия по електрохимичен градиент преминават през клетъчната мембрана и се натрупват предимно в митохондриите ( $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI) и в цитозола ( $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmin) на паращитовидните клетки.



**Фигура 1.** На ранните планарни образи (20 мин.) не се регистрира натрупване на  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmin в областта на щитовидната жлеза (състояние след оперативна интервенция на щит. жлеза). На късните планарни образи (120 мин.) не се визуализира фокус на остатъчна активност натрупващ радиомаркера.

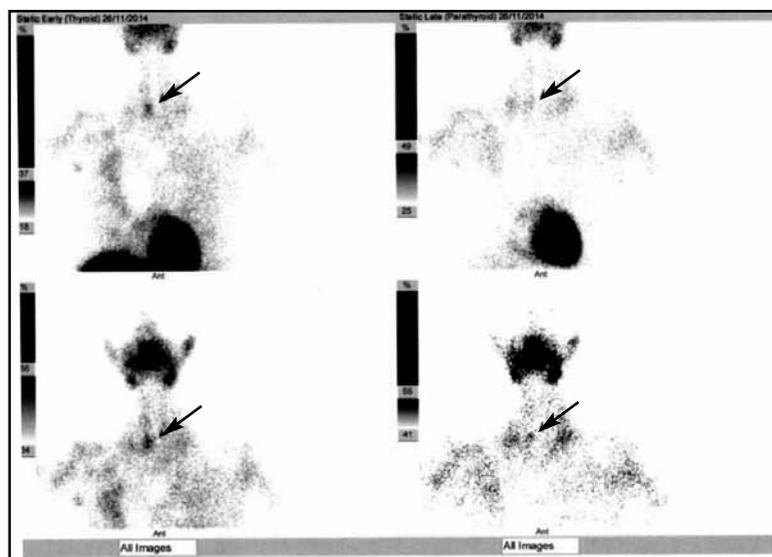
**Фигура 2.** На SPECT образите не се регистрира зона нарушваща  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmin в областта на шията.



Нормалните паращитовидни жлези не поемат  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI или  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmin. Точният механизъм за селективното натрупване в абнормните хиперфункциониращи паращитовидни жлези остава дискусабилен, като високата митохондриална активност регистрирана при пациентите с ПХПТ, се счита като основен определящ фактор.

Върху резултатите от сцинтиграфското изследване влияние могат да оказват предоперативните нива на серумния калций, ПТХ и 25 (ОН)

витамин D3. Едно проучване при 102 пациента с доказан ПХПТ, показва, че при тези от тях, при които изходните стойности на серумния калций са били по-високи от 2,82 mmol/l, положителни скенове са били получени при повече от 95% от пациентите, докато при тези с понисък серумен калций, положителни резултати са получени само при 60% (7). Същата корелация е установена за нивата на ПТХ. Серумни нива на ПТХ по-високи от 160 pg/ml корелират с позитивни скенове при 93% от пациентите, в срав-

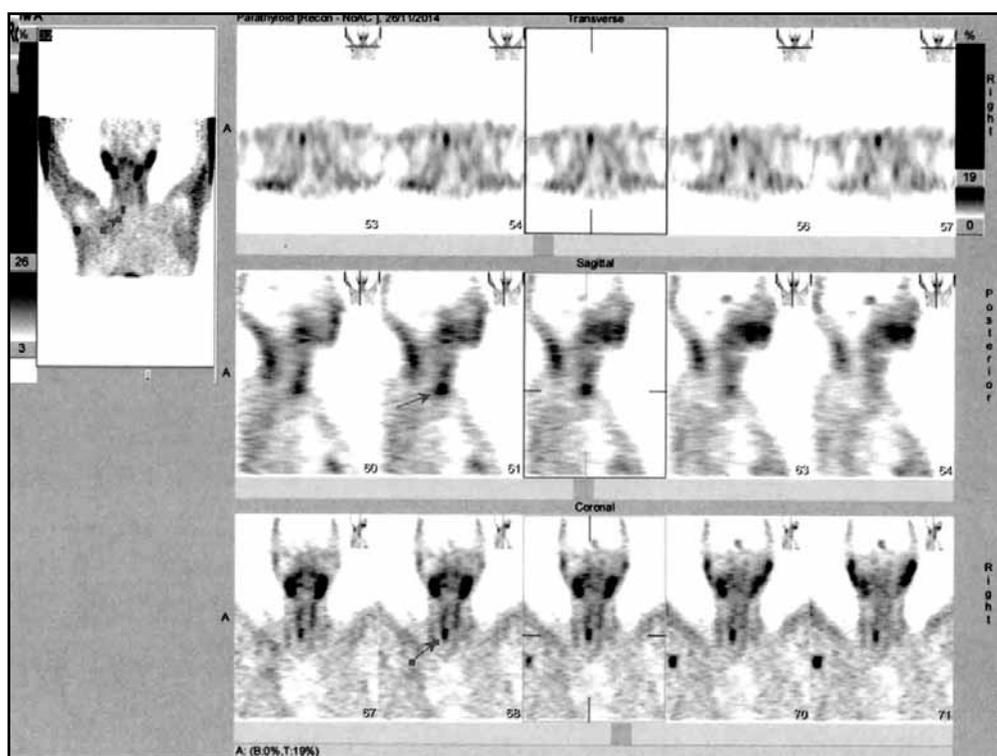


20 МИН

120 МИН

**Фигура 3.** На ранните планарни образи (20 мин.) не се регистрира натрупване на радиомакера в областта на щитовидната жлеза (състояние след оперативна интервенция на щит.жл). Визуализира се фокус натрупващ <sup>99m</sup>Tc-MIBI разположен в дясно на шията. На късните планарни образи (120 мин.) се регистрира фокус на остатъчна активност в дясно на шията (виж стрелките).

**Фигура 4.** На ранните SPECT образи с <sup>99m</sup>Tc - MIBI се визуализира хиперфиксираща зона в областта на шията в дясно.



нение с наблюдаваните 57% положителни скенове при тези с по-ниски нива на хормона (7). Обратно на това, установена е отрицателна корелация между серумните стойности на 25(OH) витD3 и натрупването на радиофармацевтиците в паращитовидните клетки. В едно проучване при 421 пациента с ПХПТ показва, че при тези, при които 25 (OH) вит D3 е бил под 25ng/ml, са отчетени по-високи нива на ПТХ и по-големи

размери на паращитовидни аденони в сравнение с тези с нормални стойности (>25 ng/ml), като и вероятността за позитивен скен при тях е била 8 пъти по-голяма (OR 7,86, 95%CI, 4,78-12,93, P<0,001) (8). Ниските нива на 25(OH) вит D3 могат да стимулират растежа на паращитовидните аденони по механизъм, който не е свързан със съпътстващите хипокалцемиа и дефицит на 1,25(OH)2 вит D3, като редуцират периферния

ефекторен калциемичен отговор към действието на ПТХ по-такъв начин, че да са необходими по-високи нива на ПТХ и повече парацитовидни клетки, за да се поддържа повишения „сет-пойнт“, характерен за заболяването (9).

Съпътстващият прием на някои медикаменти също би могъл да окаже влияние върху резултатите от сцинтиграфското изследване. Използването на блокери на калциевите канали може да повлияе „ъптейка“ на  $^{99m}\text{Tc-MIBI}$  от парацитовидните клетки и да намали чувствителността на метода. Friedman et al. установяват, че вероятността за негативен скен е два пъти по-висока при пациенти, приемащи калциеви антагонисти, в сравнение с тези, които не приемат подобни медикаменти (OR 2,88, 95% CI, 1,03-8,10,  $P=0,045$ ) (10).

Редица биологични фактори, свързани с размера и клетъчния състав на парацитовидните аеноми оказват влияние върху получените сцинтиграфски резултати. Въпреки, своята важна роля, размерът не е единственият определящ фактор. Клетъчното съдържание на парацитовидния аеном е от съществено значение, тъй като оксифилните клетки имат по-високо митохондриално съдържание и натрупват в по-висока степен технециевите изотопи. Наличието на по-голям брой оксифилни клетки в парацитовидните аеноми корелира с по-висок процент положителни скенове с  $^{99m}\text{Tc-MIBI}$  (11). В едно съобщение се посочва, че при аеноми с тегло над 600 mg и съдържание на оксифилни клетки над 20%, броят на получените положителни скенове нараства съответно с 10 и 4 пъти (12). При наличието на повече от един парацитовиден аеном ролята на сцинтиграфското изследване за тяхното адекватно визуализиране и правилно локализиране е ограничена. Siperstein et al. установяват, че точността на  $^{99m}\text{Tc-MIBI}$  скена е била 49% при полигландуларно ангажиране (5). Подобно на това, точността на  $^{99m}\text{Tc-MIBI}$  е била само 30% в една група от 21 пациента с двоици аеноми (13). Възможното обяснение на този факт включва преференциалното натрупване на радиофармацевтиците от една от променените парацитовидни жлези, което затруднява изобразява-

нето на останалите жлези.

Не на последно място, натрупването на  $^{99m}\text{Tc-MIBI}$  и  $^{99m}\text{Tc-Tetrofosmin}$  в клетките на парацитовидните аеноми зависи и от активността на вътреклетъчния P glycoprotein, кодиран от MDR гена. Той функционира като АТФ-зависима ефлуксна помпа, предпазваща от натрупване на липофилни катионни радиофармацевтици, включително  $^{99m}\text{Tc-MIBI}$  и  $^{99m}\text{Tc-Tetrofosmin}$  (9). Експресията на P glycoprotein в парацитовидните аеноми е важен фактор, определящ „ъптейка“ на радиофармацевтиците. В едно проучване 71% (10 от 14) от аеномите с изразена P glycoprotein-мембранна активност за са показали негативен скен, като в същото време 70% от тях (45 от 64) с негативна P glycoprotein-мембранна експресия ( $P=0,006$ ) са имали позитивен скен (14).

Редица фактори от техническо естество също оказват влияние върху качеството на нуклеарномедицинските методи – усъвършенстване на сцинтиграфското изследване чрез въвеждане на нови специфични радиофармацевтици, нови техники и методи на изследване, като и хибридни апарати SPECT/CT, PET/CT.

## Заклучение

Редица фактори могат да окажат ефект върху резултатите от сцинтиграфското изследване и да обяснят превръщането на един първоначално негативен скен в позитивен. Използваните в нуклеарномедицинската практика различни радиофармацевтици и методи на изследване имат своите предимства и недостатъци, като в нашия случай използването на  $^{99m}\text{Tc-MIBI}$  се оказва с по-висока чувствителност и специфичност в сравнение с  $^{99m}\text{Tc-Tetrofosmin}$ . При наличието на параклинични данни за ПХПТ и невъзможността за точна локализация на патологично променените парацитовидни жлези чрез другите методи за образна диагностика, сцинтиграфското изследване с  $^{99m}\text{Tc-MIBI}$  се явява метод на избор, особено в случаите при атипична локализация на хиперфункциониращите парацитовидни аеноми и при рецидив на заболяването.

## Comparison of Parathyroid Scintigraphy with Different Radionuclotides - $^{99m}\text{Tc}$ MIBI and $^{99m}\text{Tc}$ Tetrafosmin in one and the same Patient with Primary Hyperparathyroidism

Botushanova, Albena D<sup>1</sup>., Botushanov, Nikolay P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Oncology, Section Nuclear Medicine; Medical University, Plovdiv

<sup>2</sup> Second Department of Internal Diseases, Section/Clinic of Endocrinology; Medical University, Plovdiv

### Abstract

We present the case of a 56-year old woman with laboratory and clinical data for primary hyperparathyroidism following unsuccessful surgical treatment. Due to the persistently high levels of calcium - 2,71 mmol/l, PTH – 273,6 pg/ml and low phosphorus - 0,78 mmol/l and the lack of CT and MRI data for pathologically changed parathyroid glands, we performed a single-isotope dual-phase parathyroid scintigraphy with  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrafosmin combined with SPECT, which showed no definite areas of abnormal parathyroid tissue in the areas of the neck or mediastinum. Five months later, the patient was referred again for parathyroid scintigraphy because of the continuously rising levels of calcium – 2,92 mmol/l and PTH – 334,6 pg/ml, and worsening of her complaints. This time we performed a single-isotope dual-phase parathyroid

scintigraphy with  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI combined with SPECT, which revealed a focus of radionuclide accumulation in the right lower neck on the early SPECT images and also visible on the late planar images being highly suspicious for parathyroid adenoma. She underwent successful removal of a right lower parathyroid adenoma. This case gives us an opportunity to compare two scans with different radionuclotides obtained during the course of development of primary hyperparathyroidism in one and the same patient. Several reasons can explain the conversion of the initially negative scan into a positive one. Different factors of biological and technical origin can influence the accumulation of  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI and  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrafosmin into the parathyroid adenomas and affect sensitivity and specificity of the imaging method and finally the outcome of the scan.

**Key words:** primary hyperparathyroidism, scintigraphy,  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi,  $^{99m}\text{Tc}$ -tetrafosmin

**Introduction:** The primary hyperparathyroidism (PHPT) is due to excessive production of parathyroid hormone (PTH) from one or more abnormal parathyroid glands. Considered a rare disease in the past, the incidence of PHPT has changed dramatically with the introduction of routine calcium measurements and is now found in approximately 42 per 100 000 persons. Women are affected 2 to 3 times more frequently than men. PHPT occurs predominantly in individuals in middle age and can reach 4 cases per 1 000 persons in women after their 60`s. Predominantly PHPT causes no or few clinical signs and diagnosis is made upon the established changes of the levels of calcium, phosphorus and PTH (1,2). By far the most common lesion found in patients with PHPT is the solitary parathyroid adenoma, occurring in 85%-90% of patients, while in the rest 10%-15% primary hyperplasia of the parathyroid glands is present (3). In the past the standard surgical approach for PHPT was the bilateral four-gland parathyroid exploration. While in most of the patients with PHPT only one parathyroid gland is being affected, the above mentioned surgical approach is inappropriate in all cases. An unilateral approach is appealing in a disease in which only a single gland is involved and is connected with less postsurgical complications and shortens the time of the operation. As a result, the currently most widely used surgical approach is the minimally invasive parathyroidectomy with removal of previously established and localized adenoma (4). Because the parathyroid glands can vary in number and localization, the sensitivity and specificity of the applied preoperative imaging methods are of great importance. Despite its limitations and variable accuracy preoperative scintigraphy with

<sup>99m</sup>Tc-MIBI and <sup>99m</sup>Tc-tetrofosmin along with ultrasound examination has an established role in the preoperative protocols in patients with PHPT (5,6), especially in ectopic localization of the hyperfunctioning parathyroid glands and recurrence of the disease.

We present a case of a woman with laboratory and clinical data for primary hyperparathyroidism, where the initially negative scan performed with <sup>99m</sup>Tc-tetrofosmin turned into positive one when the scintigraphy was performed with another radionucleotide – <sup>99m</sup>Tc-MIBI, five months later.

### Case presentation:

A 56-year old woman diagnosed with PHPT in January, 2013, based upon her complaints of fatigue, recurrent nephrolithiasis, bone aches and laboratory findings of high levels of total calcium – 2.71 mmol/l (2,1-2,62 mmol/l), PTH – 273,6 pg/ml (15-65 pg/ml) and low normal phosphorus – 0,78 mmol/l (0,77-1,36 mmol/l). She also showed a low normal level of 25 (OH) Vitamin D3 – 32,5 ng/ml (30-50 ng/ml) and decreased bone mineral density (BMD) in the spine (T score – 3,1). A neck ultrasound (US) revealed a 8,4/6,4/9 mm hypoechoic nodule inferior to the right thyroid lobe with hyperechoic rim and increased color flow Doppler signal suspicious for parathyroid adenoma. In March, 2013 she underwent total thyroidectomy with no intraoperatively found parathyroid adenoma and the histological result showing colloid nodular goiter. Postoperatively levels of total calcium and PTH remained high. Because there were no US and MRI data for abnormal parathyroid glands, the patient was referred to the Department of Nuclear medicine for parathyroid scintigraphy.

In May, 2014 a single-isotope dual-phase scintigraphy with <sup>99m</sup>Tc-Tetrofosmin combined with early SPECT was performed. The scan showed no definite areas of abnormal uptake to suggest possible sites of abnormal parathyroid tissue (Fig. 1, Fig .2).

In November, 2014 due to the worsening of her complaints, registered further rising of the levels of total calcium – 2,92 mmol/l (2,1-2,62 mmol/l ) and PTH – 334,6 pg/ml (15-65 pg/ml) and no confirmed US data for parathyroid adenoma, the patient was referred again for parathyroid nuclear imaging. A single-isotope dual-phase scintigraphy with a different radio-pharmaceutical-<sup>99m</sup>Tc-MIBI combined with early SPECT was performed. The results are shown in Figure 3 and Figure 4 respectively.

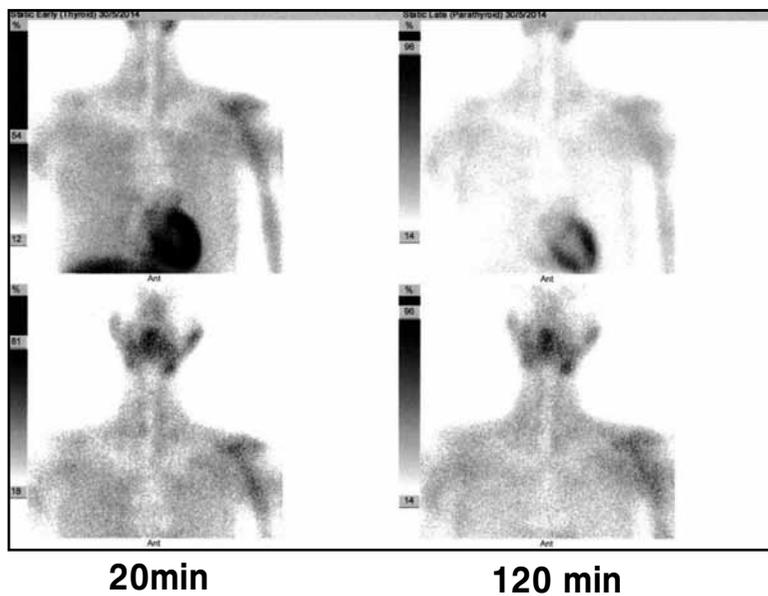
The single-isotope dual-phase scintigraphy with <sup>99m</sup>Tc-MIBI combined with early SPECT showed a definite area of abnormal activity suggesting possible abnormal parathyroid tissue in the region of the right lower neck. Despite there being no supportive data from US and MRI imaging for the presence of parathyroid adenoma, the patient underwent a surgical operation with the successful removal of a parathyroid adenoma engaging the right lower parathyroid gland, followed by a reduction of the levels of calcium and PTH.

### Discussion:

This case provides a unique opportunity to compare the results of two <sup>99m</sup>Tc based scans with different radio-pharmaceuticals in the history of PHPT in one patient. Several technical and biological factors can affect the accumulation of <sup>99m</sup>Tc-MIBI and <sup>99m</sup>Tc-Tetrofosmin in the parathyroid adenomas and thus change the sensitivity and specificity of the scintigraphy and could explain the conversion of one initially negative scan into a positive one.

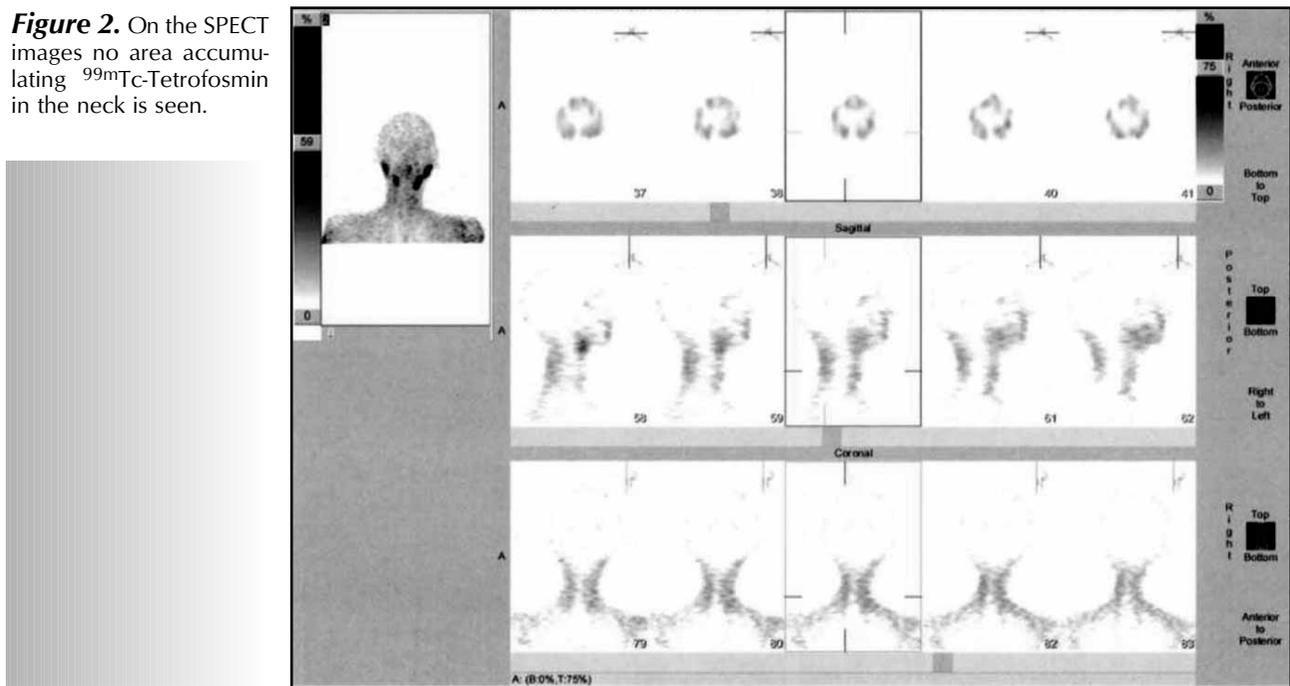
<sup>99m</sup>Tc-MIBI and <sup>99m</sup>Tc-Tetrofosmin are both monovalent lipophilic cations that passively diffuse down the electrochemical gradient through cell membranes and accumulate in mitochondria (<sup>99m</sup>Tc-MIBI) and cytosol (<sup>99m</sup>Tc-Tetrofosmin) of the abnormal parathyroid cells. Intact parathyroid cells do not accumulate <sup>99m</sup>Tc-MIBI or <sup>99m</sup>Tc-Tetrofosmin. The precise mechanism of this selective uptake in abnormal parathyroid glands remains unclear, but high mitochondrial activity observed in patients with PHPT is considered to be the major component of this increased uptake.

The results of the scintigraphy can be influenced to some extent by the preoperative levels of total calcium, PTH and 25 (OH) Vitamin D3. In a study of 102 patients with PHPT, more than 95% of those with plasma calcium greater than 2,82 mmol/l had a positive scan as compared with 60% of those with values less than that. The same correlation was noted for the levels of PTH. A serum PTH level higher than 160 pg/ml correlated with positive scans in 93% as compared with 57% in those with lower levels (7). A significant negative correlation between 25(OH) Vitamin D3 levels and the uptake of nucleotides in parathyroid cells was reported. In one study of 421 patients with PHPT it was shown that in those with 25(OH) Vitamin D3 less than 25 ng/ml higher levels of PTH were detected and larger sizes of parathyroid adenomas in comparison with those with Vitamin D (>25ng/ml) and were eight times more likely (OR 7,86, 95%CI, 4,78-12,93, P<0,001) to have a positive scan (8). Suboptimal 25(OH) Vitamin D3 levels can stimulate the growth of parathyroid adenoma by a mechanism unrelated to hypocalcemia or 1,25 (OH)<sub>2</sub> Vitamin D3 deficiency and reduce the calcemic response to PTH, so that a higher PTH level and more parathyroid cells are need-



**Figure 1.** On the early planar images (20 min) no uptake of <sup>99m</sup>Tc- Tetrofosmin is visible in the thyroid gland or around (total thyroidectomy). On the late planar images (120 min) no definite areas of abnormal activity suggesting possible abnormal parathyroid tissue are detected.

**Figure 2.** On the SPECT images no area accumulating <sup>99m</sup>Tc-Tetrofosmin in the neck is seen.

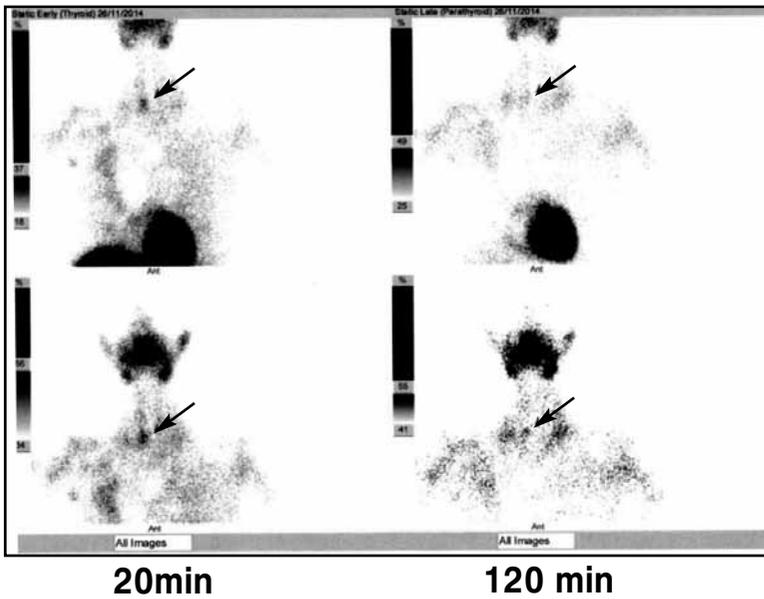


ed to maintain the increased set-point that is characteristic of the disease (9).

Concomitant use of some drugs also can affect the nuclear imaging results. The use of calcium channel blockers may interfere with <sup>99m</sup>Tc-MIBI uptake by parathyroid cells and reduce the sensitivity of the scan. Friedman et al. found that the odds ratio for a negative scan was about two fold higher in patients taking calcium channel blockers than those who were not (OR 2,88, 95% CI, 1,03-8,10, P=0,045) (10).

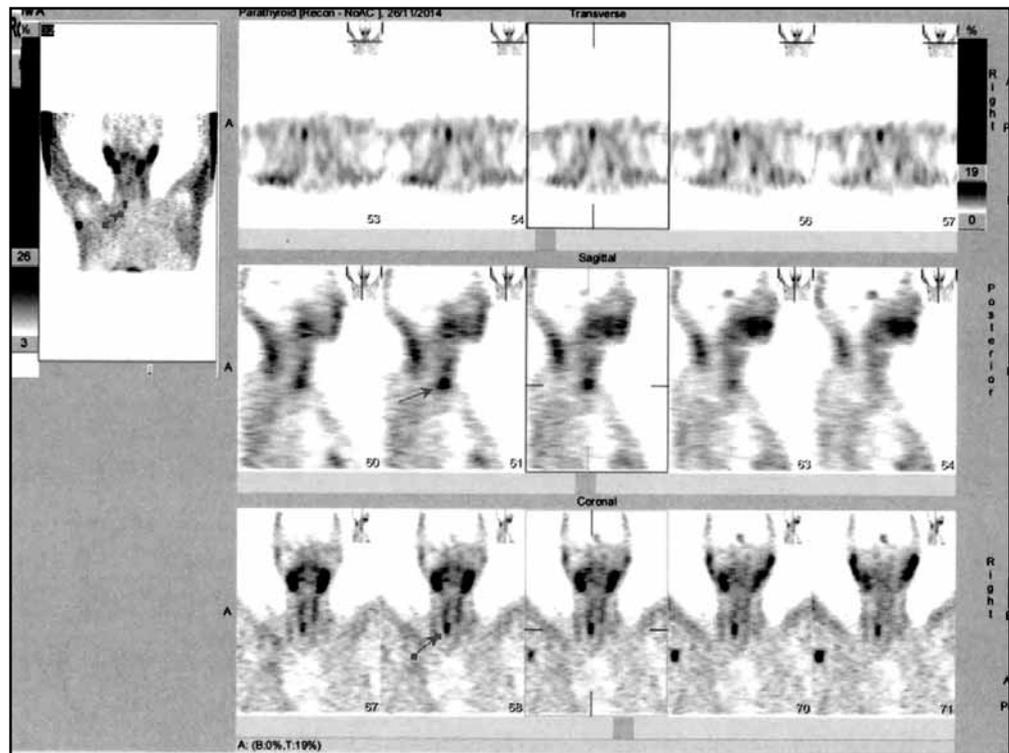
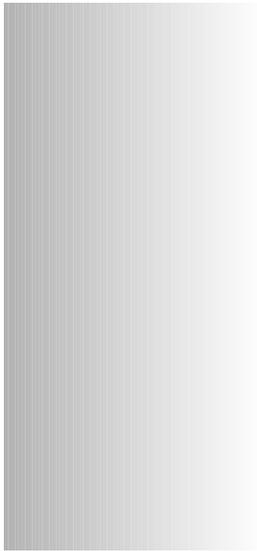
Several biological factors, including the size and

cellular content of parathyroid adenomas can affect the outcomes of the nuclear scans. Although considered to be very important, the size of the adenoma is not the only factor involved. Cell content of the adenoma plays a significant role as oxyphil cells have a higher mitochondrial content and accumulate Technetium isotopes to a larger extent. The presence of oxyphil cells within the parathyroid adenomas is associated with a positive <sup>99m</sup>Tc-MIBI scan (11). One study pointed out that an adenoma weight >600 mg and an oxyphil cell content >20% increased the rate of



**Figure 3.** On the early planar images (20 min) no uptake of  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI is visible in the thyroid gland (total thyroidectomy) but an area of  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI accumulation is seen in the right lower neck. On the late planar images (120 min) a definite area of abnormal activity suggesting possible abnormal parathyroid tissue is detected in the same zone (arrows).

**Figure 4.** On the SPECT images area of increased  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI uptake is seen in the lower right neck



obtaining a positive sestamibi scan by 10- and 4-fold respectively (12).

In the presence of more than one abnormal parathyroid gland there is a significant limitation of nuclear parathyroid scanning in the possibility of proper detection of all diseased glands. Siperstein et al. showed that the accuracy of  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scan was 49% in multi-gland disease (5). Similarly, the accuracy of  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI was only 30% in a group of 21 patients

with double adenomas (13). A possible explanation of this fact is the preferential uptake of nucleotides by one abnormal parathyroid gland, which makes visualization of the others impossible.

The uptake of  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI and  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmin into parathyroid adenoma cells depends on the activity of the intracellular P glycoprotein coded by MDR gene, which functions as an ATP-dependent efflux pump, preventing the accumulation of lipophilic,

cationic radionucleotides, including  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI and  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmin (9). P glycoprotein expression in parathyroid adenomas has been considered to be another important factor influencing nucleotide uptake in parathyroid adenomas. In one study, 71% (10 out of 14) of adenomas which showed strong P glycoprotein membrane activity had negative imaging, while 70% (45 out of 64) with negative P glycoprotein membrane activity ( $P=0.006$ ) had a positive scan (14). Technical factors also can affect the outcome of parathyroid nuclear imaging. Improving the scintigraphy with new and more specific radio-pharmaceuticals, new combined methods like SPECT/CT and PET/CT are expected to improve the accuracy of nuclear medicine imaging in patients with PHPT.

### Conclusion

Several biological and technical factors can potentially affect the outcomes of parathyroid scintigraphy and explain the conversion of one initially negative scan into a positive one. The use of  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI and  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmin has advantages and disadvantages neither of them showing greater sensitivity or specificity than the other, but in our case  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI imaging showed greater sensitivity and specificity than  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmin. In the presence of laboratory data for PHPT and negative results from other imaging methods, scintigraphy with  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI is a good option, especially in atypical localization of parathyroid adenomas or in recurrent disease.

### References

1. Kearns AE, Thompson GB. Medical and surgical management of hyperparathyroidism. *Mayo Clin Proc* 2002; 77(1): 87-91.
2. Taniegra ED. Hyperparathyroidism. *Am Fam Physician* 2004; 69(2): 333-339.
3. Ruda JM, Hollenbeak C, Stack BC Jr. A systematic review of the diagnosis and treatment of primary hyperparathyroidism from 1995 to 2003. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 132(3): 359-372.
4. Russell CF, Laird JD, Ferguson WR. Scan-directed unilateral cervical exploration for parathyroid adenoma: a legitimate approach? *World Surg* 1990; 14(3): 406-409.
5. Siperstein A, Berber E, Barbosa GF, Tsinberg M, Greene AB, Mitchell J, et al. Predicting the success of limited exploration for primary hyperparathyroidism using ultrasound, sestamibi, and intraoperative parathyroid hormone: Analysis of 1158 cases. *Ann Surg* 2008; 248(3):420-428.
6. Neychev VK, Kouniavsky G, Shieue Z, Udall DN, Somervell H, Umbricht CB, et al. Chasing "shadows": Discovering the subtleties of sestamibi scans to facilitate minimally invasive parathyroidectomy. *World J Surg* 2011; 35(1):140-146.
7. Parikshak M, Castillo ED, Conrad MF, Talpos GB. Impact of hypercalcemia and parathyroid hormone level on the sensitivity of preoperative sestamibi scanning for primary hyperparathyroidism. *Am Surg* 2003; 69(5): 393-398.
8. Kandil E, Tufaro AP, Carson KA, Lin F, Somervell H, Farrag T, et al. Correlation of plasma 25-hydroxyvitamin D levels with severity of primary hyperparathyroidism and likelihood of parathyroid adenoma localization on sestamibi scan. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2008; 134(10):1071-1075.
9. Rao DS, Honasoge M, Divine GW, Phillips ER, Lee MW, Ansari MR, et al. Effect of vitamin D nutrition on parathyroid adenoma weight: Pathogenetic and clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(3):1054-1058.
10. Friedman K, Somervell H, Patel P, Melton GB, Garrett-Mayer E, Dackiw AP, et al. Effect of calcium channel blockers on the sensitivity of pre-operative  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI SPECT for hyperparathyroidism. *Surgery* 2004; 136(6): 1199-1204.
11. Mehta NY, Ruda JM, Kapadia S, Boyer PJ, Hollenbeak CS, Stack BC, Jr. Relationship of technetium tc  $^{99m}$  sestamibi scans to histopathological features of hyperfunctioning parathyroid tissue. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 131(6): 493-498.
12. Erbil Y, Kapran Y, Issever H, Barbaros U, Adalet I, Dizdaroglu F, et al. The positive effect of adenoma weight and oxyphil cell content on pre-operative localization with  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi scanning for primary hyperparathyroidism. *Am J Surg* 2008; 195(1): 34-39.
13. Hacıyanlı M, Lal G, Morita E, Duh QY, Kebebew E, Clark OH. Accuracy of preoperative localization studies and intraoperative parathyroid hormone assay in patients with primary hyperparathyroidism and double adenoma. *J Am Coll Surg* 2003; 197(5): 739-746.
14. Gupta Y, Ahmed R, Happerfield L, Pinder SE, Balan KK, Wishart GC. P-glycoprotein expression is associated with sestamibi washout in primary hyperparathyroidism. *Br J Surg* 2007; 94(12): 1491-1495.

### Address for correspondence:

г-р Албена Ботушанова,  
Категра Клинична Онкология,  
Секция Нуклеарна медицина, МУ, Пловдив  
бул. „В. Априлов“ №15А, Пловдив 4000  
e-mail: abotushanova@abv.bg

Dr Albena Botushanova,  
Department of Clinical Oncology,  
Section Nuclear Medicine;  
Medical University, Plovdiv  
15A, V. Aprilov Str., Plovdiv 4000  
e-mail: abotushanova@abv.bg



# Общо отчетно-изборно събрание на Българско гружество по ендокринология

На 11 март 2017 година се проведе Общо отчетно-изборно събрание на Българско гружество по ендокринология (БДЕ) в зала Европа на хотел Рамага, „Мария Луиза“ №131, София. Присъстваха 152 члена на БДЕ.

За Председател на Отчетно-изборното събрание бе избран Доц. Пламен Попиванов, който ръководи протичането му. Бяха избрани Комисия по предложенията и Комисия по избора.

Направи се отчет за периода 10. 01. 2014-10. 03. 2017г. Доклади изнесоха Проф. Анна-Мария Борисова (Отчетен доклад на Управителния съвет на БДЕ), Проф. Мария Орбецова (Отчетен доклад на Главния редактор на сп. Ендокринология), Д-р Боян Нончев (Отчетен доклад на Ревизионната комисия). Подробен анализ на работата на Ръководството на БДЕ направи Проф. Анна-Мария Борисова, която обобщи накрая изпълнените задачи.

След проведените дебати и направени предложения от членовете на Общото събрание на БДЕ, под Ръководството на Комисията по избора се подготвиха две бюлетини с предложенията за:

Първа бюлетина – Ръководство и Председател на БДЕ;

Втора бюлетина – Ревизионна комисия – председател и членове; Главен редактор и Редакционна колегия на сп. Ендокринология. Комисията по избора провери общия брой получени бюлетини и установи, че те са 152 (сто петдесет и две). Проведе се преброяване на гласовете за всеки предложен член на БДЕ за участие в Ръководните органи на Сдружението. Приложени са работните документи по проведеното изброяване на гласовете. Изборният процес приключи в 13.00 часа на 11. 03. 2017 г.

Резултатите от избора обяви Председателят на Комисията по избора Д-р Виктор Маргаритов:

**Председател** – Проф. Анна-Мария Борисова

**Управителен съвет** – Проф. Цветалина Танкова, Д-р Александър Шинков, Проф. Мария Орбецова, Проф. Михаил Боянов, Проф. Кирил Христозов, Доц. Малина Петкова, Проф. Жулиета Геренова, Доц. Иван Цинликов, Проф. Здравко Каменов, Д-р Алекси Делчев.

2017



# Българско дружество по ендокринология

## Ревизионна комисия:

**Председател** – Д-р Боян Нончев и членове Д-р Красимир Анастасов,  
Д-р Роза Бобева, Д-р Валя Мичорова, Д-р Анелия Мишева.

**Главен редактор на сп. Ендокринология** – Проф. Мария Орбецова

На Заседание на Ръководството на БДЕ на 5 април 2017 г. се взеха решения  
относно:

**Секретар на БДЕ** – Проф. Цветалина Танкова

**Касиер на БДЕ** – Д-р Александър Шинков.

## Editorial Board/Редакционна колегия и съвет

**Анелия Томова**/Aneliya Tomova

**Анна-Мария Борисова**/

Anna-Maria Borissova

**Атанаска Еленкова**/Atanaska Elenkova

**Владимир Христов**/Vladimir Christov

**Георги Кирилов**/Georgi Kirilov

**Драгомير Коев**/Dragomir Koev

**Живка Бонева** /Zhivka Boneva

**Жулиета Геренова**/Julieta Gerenova

**Здравко Каменов**/Zdravko Kamenov

**Иван Цинликов**/Ivan Tzinlikov

**Илиана Атанасова**/Iliana Atanassova

**Калинка Коприварова**/Kalinka Koprivarova

**Катя Тодорова**/Katia Todorova

**Кирил Христов**/Kiril Hristozov

**Лидия Коева**/Lidia Koeva

**Малина Петкова**/Malina Petkova

**Митко Митков**/Mitko Mitkov

**Михаил Боянов**/Mihail Boyanov

**Нарцис Калева**/Nartsis Kaleva

**Пламен Попиванов**/Plamen Popivanov

**Радка Савова**/Radka Savova

**Русанка Ковачева**/Roussanka Kovatcheva

**Сабина Захариева**/Sabina Zacharieva

**Филип Куманов**/Philip Kumanov

**Цветалина Танкова**/Tsvetalina Tankova

**Почетен Главен редактор на сп. Ендокринология** –

Проф. Боян Лозанов

**Комисия по етика с Председател** Доц. Живка Бонева и членове

Доц. Пламен Попиванов, Д-р Валя Мичорова, Д-р Виктор Маргаритов,

Д-р Емил Младенов.

**Борд по извънболнична помощ по ендокринология с Председател**

Д-р Алекси Делчев и членове Д-р Елка Димитрова, Д-р Пенка Велкова,

Д-р Роза Бобева, Д-р Иванка Костова, Д-р Красимир Анастасов.

**Определиха се датите за националните събития на БДЕ през 2018 г:**

- 13-14. 04. 2018 г. – Училище на БДЕ на тема „Полови жлези“
- 11-13. 10. 2018 г. – XII<sup>ти</sup> Национален конгрес на БДЕ, Гранд хотел Пловдив

## Bulgarian Society of Endocrinology '2017



*Българско дружество  
по ендокринология*

# Национален симпозиум

*„Затлъстяване и  
здравни рискове“*



*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. (032) 602486;  
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) 32602486;  
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 of future scientific events (congresses, symposia, etc.) in all fields of clinical Endocrinology.

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

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

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

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

Структурата на статиите трябва да отговаря на следните изисквания:

#### **Титулна страница**

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

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

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

#### **Резюме**

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

#### **Основен текст**

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

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

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

#### **Title page**

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

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

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

#### **Abstract**

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

#### **Main text**

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

#### **Tables and figures**

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

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

## Таблицы и илюстрации

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

## Книгопис

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

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

## References

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

## Examples

### Reference to a journal article:

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

### If the original cited paper is in Bulgarian:

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

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

### Примери:

#### Статия от списание:

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

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

#### Глава (раздел) от книга:

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

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

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

### References to a book chapter:

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

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

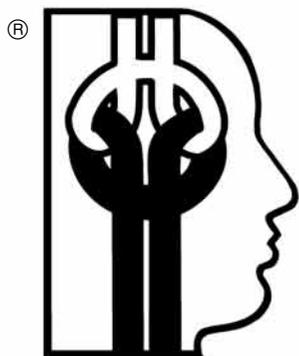
### Address for sending the manuscripts and other editorial correspondence

#### Editorial Board Address for Correspondence:

Clinical Center of Endocrinology,  
„Acad. Iv. Penchev“, University Hospital, 2  
Zdrave Str., 1431 Sofia, Bulgaria;  
Prof. Maria Orbetzova, *Editor in Chief*  
Tel (+359) 32 60 24 86;  
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. (032) 602486;  
Мобилен: 0887771322,  
E-mail: morbetzova@abv.bg



# ЕНДОКРИНОЛОГИЯ

# ENDOCRINOLOGIA

Списание  
на Българското дружество  
по ендокринология  
към СНМД в България

Journal  
of the Bulgarian Society  
of Endocrinology (BSE)

**Главен редактор**

Проф. д-р Мария ОРБЕЦОВА, гм

**Редактор на английския текст**

Джеф ТОМАС

**Отговорен редактор**

Румен НИНОВ

**© Първа корица и графичен дизайн**

Румен НИНОВ

**Editor-in-chief**

Prof. Maria ORBETZOVA, MD PhD

**English language editor**

Jeff THOMAS

**Art director** Rumen NINOV

© **Cover&Design** Rumen NINOV

**Технически секретар**

Маргарита СЛАВЧЕВА

E mail: mora4a2@abv.bg

**Technical secretary**

Margarita SLAVCHEVA

E mail: mora4a2@abv.bg

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

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

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

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

**Адрес на редакционната колегия:** Клиничен център – УСБАЛЕ, „Акад. Иван Пенчев“ ул. „Здраве“ №2, 1431 София;  
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;  
Mobile (+359) 0887771322 (Prof. Maria Orbetzova); email: morbetzova@abv.bg, Technical Secretary – M. Slavcheva (mobile (+0359) 0889 295884 ), email: mora4a2@abv.bg