



ЕНДОКРИНОЛОГИЯ **ENDOCRINOLOGIA**

Списание
на Българското дружество
по ендокринология
(БДЕ)

Journal
of the Bulgarian Society
of Endocrinology
(BSE)

Гл. редактор: Боян Лозанов
Научен секретар: Р. Ковачева

Editor-in-Chief: Boyan Lozanov
Scientific secretary: R. Kovatcheva

Редакционна колегия:
С. Захариева, Ц. Танкова, Д. Коев, З. Каменов,
Вл. Христов, М. Орбецова

Editorial Board:
S. Zakharieva, Tz. Tankova, Z. Kamenov, M. Orbetzova, D. Koev, Vl. Christov

Редакционен съвет:
А.-М. Борисова, Г. Кирилов, Ф. Куманов, М. Протич, М. Петкова, М. Боянов, К. Коприварова, Ж. Геренова, В. Цанева, В. Йотова, Л. Коева

Advisory Board:
А.-М. Borissova, G. Kirilov, F. Kumanov, M. Protich, M. Petkova, J. Gerenova, M. Boyanov, K. Koprivareva, V. Tzaneva, V. Jotova, L. Koeva

Международен научен съвет:
М. Богоев (Скопие), А. Булатов (Москва), Г. Ердоган (Анкара), А. Изигори (Рим), Б. Каранфилски (Скопие), П. Кенгъл-Тейлър (Нюкасъл на Тайн), М. Кокулеско (Букурещ), Г. Красас (Солун), П. Лауберг (Дания), Д. А. Кутрас (Атина), Дж. Лазарус (Кардиф), Е. Нишлаг (Мюнстер), А. Пинкера (Пица), С. Рефетоф (Чикаго), М. Серрано Риос (Мадрид), Й. Фьовени (Буганеща)

International Scientific Board:
M. Bogoev (Skopie), A. Bulatov (Moscow), M. Coculescu (Bucharest), G. Erdogan (Ankara), J. Fovenyi (Budapest), A. Isidori (Rome), B. Karanfilski (Scopie), P. Kendall-Taylor (Newcastle upon Tyne), D. A. Koutras (Athens), G. Krassas (Thessaloniki), P. Lauberg (Denmark), J. H. Lazarus (Cardiff), E. Nieschlag (Munster), A. Pinchera (Pisa), S. Refetoff (Chicago), M. Serrano Rios (Madrid)

Списанието се индексира от/The journal is indexed by:

- *Bulgarian Citation Index*

Списание

ЕНДОКРИНОЛОГИЯ

том XV, книжка 4, 2010

Съдържание

Обзори

Самуел Рефетоф и Александра Димитреску

Синдроми на намалена чувствителност към тиреоидните хормони: Генетични дефекти на хормоналните рецептори, клетъчните транспортери и дейодинази 186

Мария Орбецова, Митко Митков, Благовест Пехливанов

Грелин – роля в регулация на телесното тегло, метаболитни и репродуктивни нарушения 212

Оригинални статии

Боян Лозанов, Ж. Гергелчева, Д. Димов, Г. Лазарова, И. Гашарова

Случай на тиреотоксична кардиомиопатия с електрокардиографски промени наподобяващи остър коронарен синдром 224

Жулиета Геренова, Ирена Манолова, Христо Георгиев, Захари Никитов

Серумни нива на TNF-alpha и неалкохолна стеатозна болест при пациенти със захарен диабет тип 2 и метаболитен синдром 231

Указания за авторите 239

Адрес на редакционната колегия: Клиничен център – МБАЛ по ендокринология, „Акад. Иван Пенчев“ ул. „Здраве“ №2, 1431 София; тел. (02) 985 6001; факс (02) 987 4145; Мобилен: 0888/680 343 (проф. Лозанов), Доц. Р. Ковачева – научен секретар (GSM 0898/60 86 02)

- Elsevier Bibliographic Databases, (SCOPUS) Netherlands
- EMBASE

ISSN 1310-8131

Journal
ENDOCRINOLOGIA

volume XV, number 4, 2010

Contents

Reviews

Samuel Refetoff and Alexandra M. Dumitrescu

Syndromes of Reduced Sensitivity to Thyroid Hormone: genetic Defects in Hormone Receptors, Gell Transporters and Deiodination 186

Maria Orbetzova, Mitko Mitkov, Blagovest Pehlivanov

Ghrelin – Role in the Regulation of Body Weight, Metabolic and Reproductive Disturbances 212

Originale articles

Boyan Lozanov, G.Gergelcheva, D. Dimov, G. Lazarova and I. Gasharova

A Case With Thyrotoxic Cardiomyopathy and ECG- Imaging Resembling an Acute Coronary Syndrome 224

Julieta Gerenova, Irena Manolova, Hristo Georgiev, Zahari Nikitov

Serum Levels of TNF-alpha and Non-alcoholic Fatty Liver Disease in Type 2 Diabetes Mellitus Patients with Metabolic Syndrome 231

Instructions to Authors 239

**Editorial Board: Clinical Center of Endocrinology,
2, Zdrave Str., 1431 Sofia, Bulgaria;
Tel (+0359) 2-895 6001; Fax C 2-987 4145; Mobil (+0359) 888 680 343 Lozanov,
Assoc. Prof. R. Kovatcheva – Sci. Secretary (GSM 0898/60 86 02)**

Синдроми на намалена чувствителност към тиреоидните хормони: Генетични дефекти на хормоналните рецептори, клетъчните транспортери и де-йодинази

Самуел Рефетоф^(1,2,3) и Александра Димитреску⁽¹⁾

Департаменти по медицина (1), педиатрия (2) и Комитет по генетика към Университета – Чикаго, САЩ, Илиноис 60637 – 1470

Syndromes of Reduced Sensitivity to Thyroid Hormone: genetic Defects in Hormone Receptors, Cell Transporters and Deiodination

Samuel Refetoff^{1,2,3} and Alexandra M. Dumitrescu¹

Departments of Medicine¹, Pediatrics² and Committee on Genetics³, University of Chicago, Illinois 60637-1470

Резюме

Ефектът на тиреоидните хормони (ТХ) върху таргетните тъкани се осъществява чрез поне 6 шест основни стъпки. Мутациите отнасящи се до три от тях – обект на настоящата статия, са основно проучени. Първият доказан дефект обуславящ резистентност към ТХ, означаван с акронима RTH, засяга бета-гена на Т3-рецептора. Той се среща при 1 от 40,000 новородени, отнасящи се към 339 фамилии, общо 1,000 случая към настоящия момент. При

Abstract

At least six major steps are required for secreted thyroid hormone (TH) to exert its action on target tissues. Mutations interfering with three of these steps have been so far identified and are the subject of this communication.

The first recognized defect, causing resistance to TH, involves the TH receptor β gene and carries the acronym, RTH. Occurring in ~1 of 40,000 newborn, affected subjects belonging to 339 families surpass 1,000. The gene defect remains unknown in 15% of subjects with RTH.

15% от лицата с RTH дефектът остава неразпознат.

Неотдавна бяха доказани два нови синдрома, характеризиращи се с намалена чувствителност към ТХ. Единият от тях е доказан при 150 мъже от 57 фамилии и се извява с тежки психомоторни нарушения. Същият се дължи на мутации на клетъчните мембранни транспортери на ТХ, MCT8. Другият засяга вътреклетъчния метаболизъм на ТХ и се дължи на мутации на *SECISBP2* гена, който кодира синтеза на селенопротеини, включително ТХ-дейодиназите.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: Синдром на резистентност към тиреоидни хормони, Т3-бета ген, клетъчни дейодинази, клетъчно-мембранни транспортери на тиреоидните хормони

Two novel syndromes causing reduced sensitivity to TH were recently identified. One, producing severe psychomotor defects in more than 150 males from 57 families, is caused by mutations in the cell-membrane transporter of TH, *MCT8*. The second defect, affecting the intracellular metabolism of TH is caused by mutations in the *SECISBP2* gene required for the synthesis of selenoproteins, including TH deiodinases.

KEY WORDS: Resistance to thyroid hormone, T3-beta gene, TH deiodinases, cell-membrane transporter of thyroid hormones

BACKGROUND AND PHYSIOLOGY

Thyroid hormone (TH) plays a major role in growth and development and acts on peripheral tissues of the adult to regulate their level of metabolism. Its action is most dramatic in metamorphosing amphibians, producing resorption of the tadpole tail and budding of limbs to generate the adult frog. In mammals, including man, severe TH deprivation during intrauterine life, and in the immediate postnatal period, results in irreversible damage of the central nervous system.

Resistance to thyroid hormone (RTH), a syndrome of reduced end-organ responsiveness to TH was identified in 1967 (1). The early report postulated various mechanisms including defects in TH transport, metabolism and action (2). However, with the subsequent identification of TH receptor (TR) β gene mutations (3, 4) the term RTH become synonymous with defects of the TR (5). The recent discoveries of genetic defects that reduce the effectiveness of TH through altered cell membrane transport (6, 7) and metabolism (8) have broadened the defini-

tion of TH insensitivity to encompass all defects that can interfere with the biological activity of a chemically intact hormone secreted in normal amounts. In this communication, use of the acronym RTH is limited to the syndrome produced by reduced intracellular T₃ action of the active TH, T₃. The term reduced sensitivity to TH is used to denote reduced effectiveness of TH in the broader sense TH Secretion, Cell-membrane Transport, Metabolism and Action Proper mediation of TH action requires

- 1) the availability of an intact TH,
- 2) its transport across cell membrane,
- 3) intracellular metabolism and hormone activation,
- 4) cytosolic and nuclear processing,
- 5) association with receptors and
- 6) interaction with co-regulators or other post receptor effects required for the expression of TH effect.

The maintenance of a constant supply of TH is insured by a feedback control mechanism involving the hypothalamus, pituitary, and thyroid

gland (Fig. 1A). A decrease in the circulating TH concentration induces a hypothalamus-mediated stimulation of thyrotropin (TSH) secretion from the pituitary thyrotrophs which stimulates the thyroid follicular cells to synthesize and secrete more hormone. In contrast, TH excess shuts down the system, using the same pathway, until homeostasis is reinstated. This system, centrally regulated, does not take into consideration changes in TH demand in a particular organ or cell.

To accommodate the local requirement in TH, additional systems are in operation. One such system is the control of TH entry into the cell through active transmembrane transporters (9). Another is the activation of the hormone precursor thyroxine (T_4) by removal of the outer ring iodine (5'-deiodination) to form triiodothyronine (T_3) or, inactivate T_4 and T_3 by inner ring (5-deiodination) to form reverse T_3 (rT_3) and T_2 , respectively (Fig. 1B). Changing concentrations of deiodinases in various cell types, allows an additional local regulation of hormone supply (10).

Finally, the presence and abundance of TRs, through which TH action is mediated, determine the type and degree of hormonal response. Action takes place in the cytosol as well as in the nucleus (11). The latter, known as genomic effect, has been more extensively studied (12, 13) (Fig. 1C). TRs are transcription factors that are associated with DNA of genes whose expression they regulate.

How Thyroid Hormone Deficiency and Excess Coexist TH deficiency and excess are associated with typical symptoms and signs reflecting the effects of global lack and excess of the hormone, respectively, on all body tissues. A deviation to this rule was recognized with the identification of the RTH syndrome. Usually caused by heterozygous mutations in the *TR β* gene, subjects have high TH levels without TSH suppression. This paradox extends to clinical and biochemical observations suggesting, TH deficiency, sufficiency, and excess, depending on the level of *TR β* gene expression in various tissues (5).

The syndrome of TH cell transport defect (THCTD) exhibits a similar paradox, as subjects have high serum T_3 concentration but the uptake of TH is not uniform in all tissues and cell types (14).

RESISTANCE TO THYROID HORMONE (RTH):

TH Action

Expression of TH effects requires the intracellular presence of sufficient amount of the active hormone T_3 . Rapid, non-genomic action is exerted at the level of the plasma phosphorylation and second messengers (11). However, the principal and best-studied effect requires the translocation of the hormone into the nucleus where it interacts with TRs to regulate (activate or repress) transcription of target genes.

These genes contain specific sequences at or near their promoter regions (TH response elements or TREs) to which TRs bind. In the absence of TH, TRs interact and associate with other molecules, most notably the coregulator retinoid X receptor, and corepressors. These complexes have silencing effect on genes membrane and cytoplasm, involving ion channels, oxidative positively regulated by TH. By binding to TR, T_3 induces conformational changes in the TR molecule, triggering a chain of processes.

Briefly, these include:

release of the corepressor, recruitment of coactivators and a large number of other proteins, some with histone acetylation activity. In positively controlled genes, this results in the loosening of the nucleosome structure making the DNA more accessible transcription factors that mediate binding of RNA polymerase II and general transcription initiation factors (15).

Etiology and Variants

Most subjects with RTH have mutations in the *TR β* gene, which fully explain the refractoriness of target tissues to TH and the resulting abnormalities of thyroid function tests (TFTs). Formerly, RTH was subdivided into generalized, isolated pituitary and peripheral tissues. Based on symptoms and signs, this subclassification does not have a logical basis since the former two are encountered in individuals with the same mutation (16) and the latter represents the development of tolerance to the ingestion of excess TH.

While abnormal interaction between a particular mutant TR and a cofactor protein may

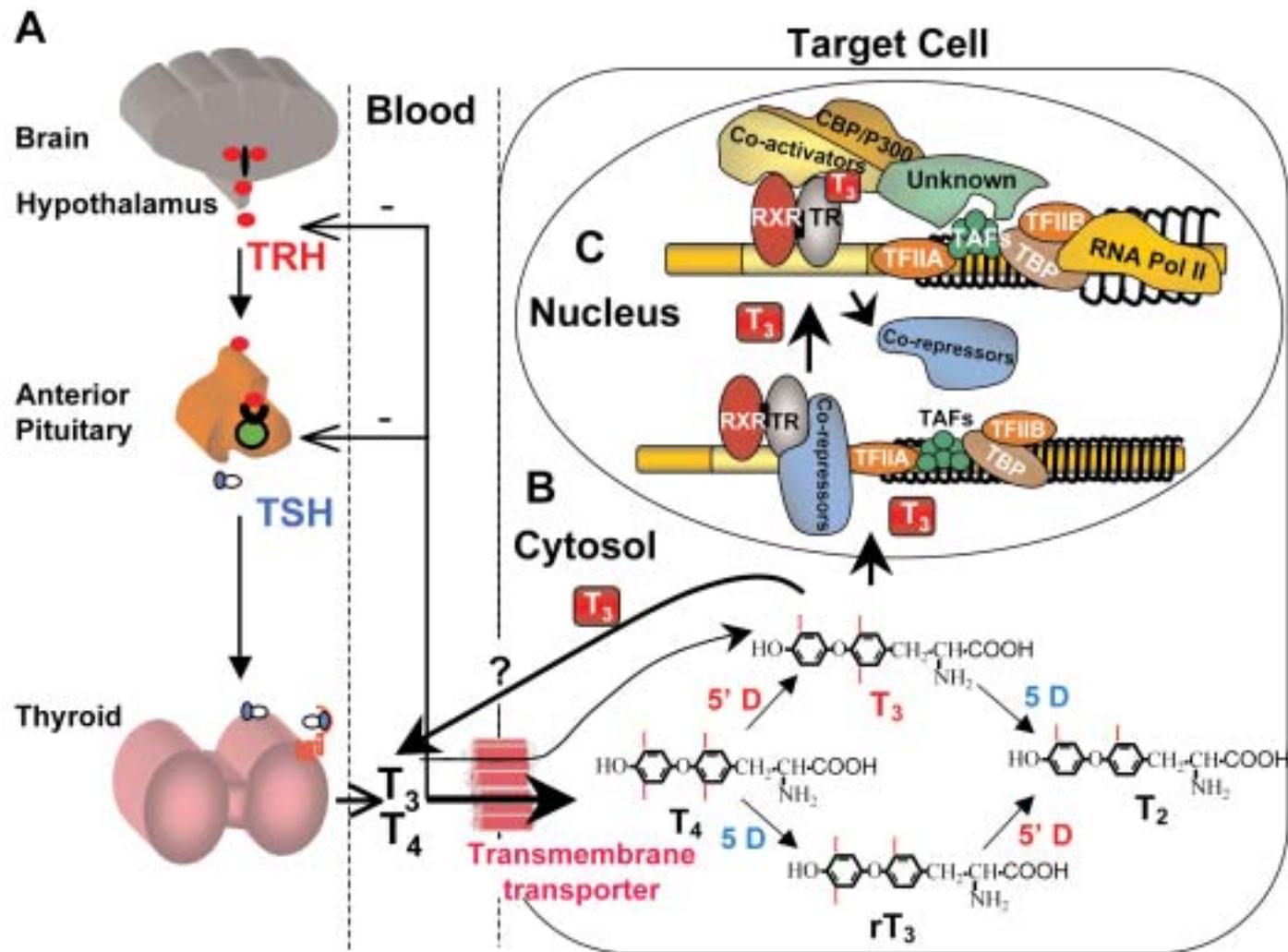


Figure 1. Feedback control that regulates the amount of TH in blood. (B) Intracellular metabolism of TH, regulating TH bioactivity. (C) Genomic action of TH. For details see text.
 TRH, TRH releasing hormone; TSH, thyroid stimulating hormone (thyrotropin); T₄, 3,3',5,5'-tetraiodothyronine (thyroxine, T₄); T₃, 3,3',5-triiodothyronine (T₃); rT₃ 3,3',5'-triiodothyronine deiodination by removal of an iodine from the 5' position in a iodothyronine; 5D, 5-deiodination; T₂, 3,3'-diiodothyronine; TR, TH receptor; RXR, retinoid X receptor; CBP/P300, cAMP-binding protein/general transcription adaptor; TFIIA and TFIIB, transcription intermediary factor II, A and B; protein; TAF, TBP-associated factor;

explain some of the discrepancies between the degree of T₃-binding impairment and the magnitude of the functional defect, the molecular basis of the heterogeneity of the RTH phenotype in individuals with the same mutation remains unknown and cannot be resolved by in-vitro transfection studies. This phenotypic variation can occur across families (17) and within the same family (18). Differences in the expression level of the mutant relative to the normal TRβ allele found in one study (19) was not confirmed by another (20). Observations in families with the same TRβ mutation suggest that genetic variability of factors other than TRβ, may modulate the phenotype of RTH (18).

NonTR RTH refers to individuals with the RTH phenotype in whom mutations in the TRβ gene have been excluded by gene sequencing. It occurs in 15% of families with RTH and in several families mutations in both TRβ and TRα genes have been excluded by linkage analysis, thus ruling out mosaicism (21).

First reported in 1996 (22), the inheritance is autosomal dominant with 2,5:1 predominance in females. It is clinically and biochemically undistinguishable from RTH with TRβ gene mutations (Fig. 2). The TRβ gene transcripts were of normal size and abundance. Nevertheless, fibroblasts were resistant to the in-vitro effect of TH. fibroblasts from individuals with non TR RTH but not from normal individuals or subjects with complete TRβ gene deletion and Far Western analysis revealed an additional 84 kD band.

Intrafamilial linkage analysis, and direct screening for mutations by DNA sequencing of several families with nonTR-RTH excluded the involvement of coactivators (SRC-1/NcoA-1; and NcoA-3/SRC-3/AIB1/RAC-3), two corepressors (NCoR and SMRT) and two coregulators (RXRγ and TRIP1) as well as the cell-transporter LST-1 (OATP1B1) (21).

Incidence and Inheritance

The precise incidence of RTH is unknown because this condition cannot be detected by routine screening for hypothyroidism. A limited neonatal screen for high blood T₄ found 1 case per 40,000 life births (23). Current published cases surpass 1,000 and 183 of the 372 families

with RTH (49%) were investigated in the authors' institution. Of the latter, 27 families (15%) had no TRβ gene mutations. Of the 156 with TRβ mutations, 43 (27,6%) occurred de-novo.

In the majority of families, the syndrome is transmitted in an autosomal dominant fashion. In one family with complete deletion of the TRβ gene, inheritance was recessive (1, 24). RTH occurs with equal frequency in both sexes and has wide geographic and racial distribution.

The TR Genes and Mutations

The TRα and TRβ genes, located on chromosomes 17 and 3 respectively, encode proteins of structural and sequence similarities. Both genes produce two isoforms; α1 and α2 by alternative splicing and β1 and β2 by different Recombinant WT TRβ interacted aberrantly with nuclear extracts of transcription start points. TRα2 binds to TREs but due to a sequence difference at the ligand-binding domain site, it does not bind TH and thus does not function as a proper TR (25). Moreover, it appears to have a weak antagonistic effect. Additional TR isoforms, including a TRβ with shorter amino terminus (26).

(TRβ3) and truncated molecules (ΔTRβ3, ΔTRα1 and ΔTRα2), lacking the DNA-binding domain, have been identified in different tissues of rodents (27, 28). The latter three exhibit dominant antagonistic effect but their significance in humans remains unknown (29).

The relative expression and product distribution of the two TR genes vary among tissues and during different stages of development. To a certain degree, TRβ and TRα are interchangeable (30, 31). However, the compensatory effects observed in the absence of one of the receptors are not complete and some TH effects are TR isoform specific (see Animal Models, below).

Mutations are located in the carboxyl terminus of the TRβ, mostly contained within three CpG rich „hot spots“, which are in the ligand-binding domain (aa 242-460) and adjacent hinge domain (aa 234-243) of the receptor protein and distributed in 3 clusters (17, 32, 33) (Fig. 3). The mutant TRβ molecules have either reduced affinity for T₃ (32, 34), or abnormal interaction with one of the cofactors involved in TH action (33, 35).

Mutations have been now identified in 343 families, of which 325 are single nucleotide sub-

stitutions, resulting in one amino acid replacement and in 4 instances a stop codon. In the remaining, nucleotide deletions or insertions produce frameshifts, which in 5 instances create a nonsense protein with two additional amino acids. Given that there are only 124 different mutations, many are shared by more than one family. When sought, proof that they developed independently has been obtained (17). TR β R338W, caused by a C to T replacement in a CpG has been identified in 29 unrelated families. It is surprising that not a single mutation has been reported in noncoding TR β gene regions or to produce abnormal splice variants. In contrast, of the 245 mutations in the androgen receptor gene, 8 were located in splice junctions, resulting in aberrant splicing in 5 (36). Sequencing of cDNA is important in subjects with clinically proven RTH in whom no mutations could be found in genomic DNA. Somatic TR β gene mutations have been identified in two TSH-producing pituitary adenomas (37). No germline TR α mutations have been identified in humans.

Clinical Features and Course of the Disease

Characteristic of the RTH syndrome is the paucity of specific clinical manifestations. When present, they are variable from one patient to another (5, 16). Presenting symptoms and signs are goiter, hyperactive behavior, learning disabilities, developmental delay and sinus tachycardia. The finding of elevated serum TH levels in association with nonsuppressed TSH usually leads to the diagnosis.

The majority of subjects maintain a normal metabolic state at the expense of high TH levels. This compensation for the hyposensitivity to TH is variable not only among individuals but also in different tissues. As a consequence, clinical and laboratory evidence of TH deficiency and excess often coexist. For example, delayed growth and bone maturation and learning disabilities, suggestive of hypothyroidism, can be present along with hyperactivity and tachycardia, compatible with thyrotoxicosis. Common clinical features and their frequency are given in Table 1.

Table 1. Clinical Features: Frequency of Symptoms and Signs

FINDINGS		FREQUENCY (%)
Thyroid gland	Goiter	66-95
Heart	Tachycardia	33-75
Nervous System	Emotional disturbances	60
	Hyperkinetic behavior	33-68
	Attention deficit hyperactivity disorder	40-60
	Learning disability	30
	Mental retardation (IQ <70)	4-16
	Hearing loss (sensorineural)	10-22
Growth and Development	Short stature (<5%)	18-25
	Delayed bone age >2 SD	29-47
	Low body mass index (in children)	33
Recurrent Ear and Throat Infections		55

IQ = intellectual quotient

Data derived from (5, 16, 88).

Frank symptoms of hypothyroidism are more common in individuals who have received treatment to normalize their circulating TH levels.

Goiter is by far the most common finding, reported in 66-95% of cases. Enlargement is usually diffuse. Nodularity and gross asymmetry occurs in goiters recurring after surgery. Sinus tachycardia is also very common, which, together with goiter, often lead to the erroneous diagnosis of autoimmune thyrotoxicosis.

About one-half of subjects with RTH have some degree of learning disability with or without attention deficit hyperactivity disorder (5). In contrast, the occurrence of RTH in children with attention deficit disorder is extremely rare. One-quarter have intellectual quotients (IQ) less than 85% but frank mental retardation (IQ <60) was found only in 3% of cases. Deaf-mutism and color blindness occurred in all three affected members of a single family with *TRβ* gene deletion (1).

The course of the disease is as variable as its presentation. Most subjects have normal growth and development, and lead a normal life at the expense of high TH levels and a small goiter. Others present variable degrees of mental and growth retardation. Symptoms of hyperactivity tend to improve with age. Goiter usually recurs after surgery. As a consequence, some subjects have been submitted to several thyroidectomies or treatments with radioiodide (5).

RTH has contributed to the demise of only one child, homozygous for a dominant *TRβ* mutation (T332Δ), with a resting heart rate of 190 beats/minute (38). He died from cardiogenic shock complicating staphylococcal pneumonia.

Laboratory Findings

In the untreated subject, a high serum free T_4 concentration and nonsuppressed TSH are *sine qua non* requirements for the diagnosis of RTH. They are usually accompanied by high serum levels of T_3 and rT_3 concentration is also high. Serum T_4 and T_3 values can be just above to several fold the upper limit of normal but are usually congruent, resulting in a normal $T_3:T_4$ ratio (5). This contrasts with the disproportionate increase in serum T_3 characteristic of autoimmune thyrotoxicosis. Serum thyroglobulin concentration tends also to be high, reflecting the

level of TSH induced thyroid gland hyperactivity. The response of TSH to TSH-releasing hormone is normal or exaggerated, In contrast, the As a consequence, some subjects have been depending on the baseline TSH level. TSH has relatively high bioactivity, which explains the development of a TSH-induced goiter despite normal levels of immunoreactive TSH (39). Thyroidal radioiodide uptake is high and not dischargeable by perchlorate. Antibodies to thyroperoxidase and thyroglobulin are usually negative but when present, they are indicative of coexistent autoimmune thyroid disease.

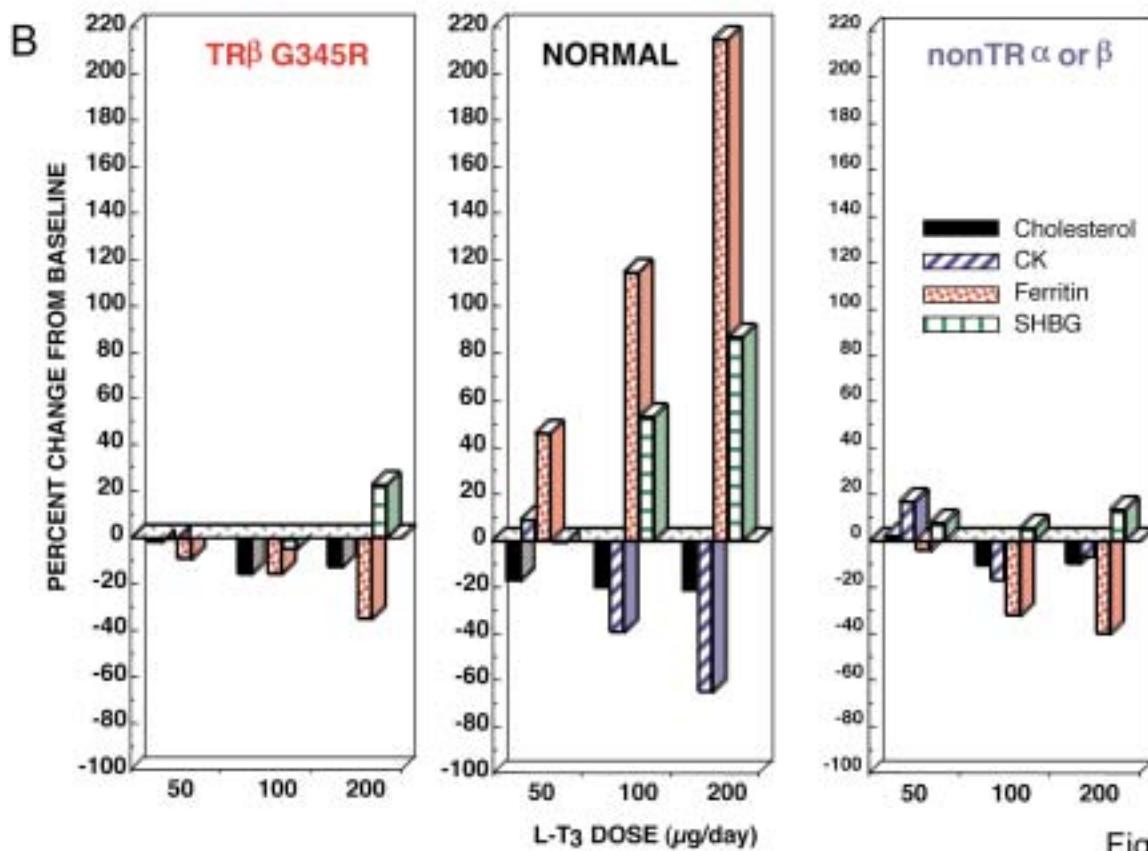
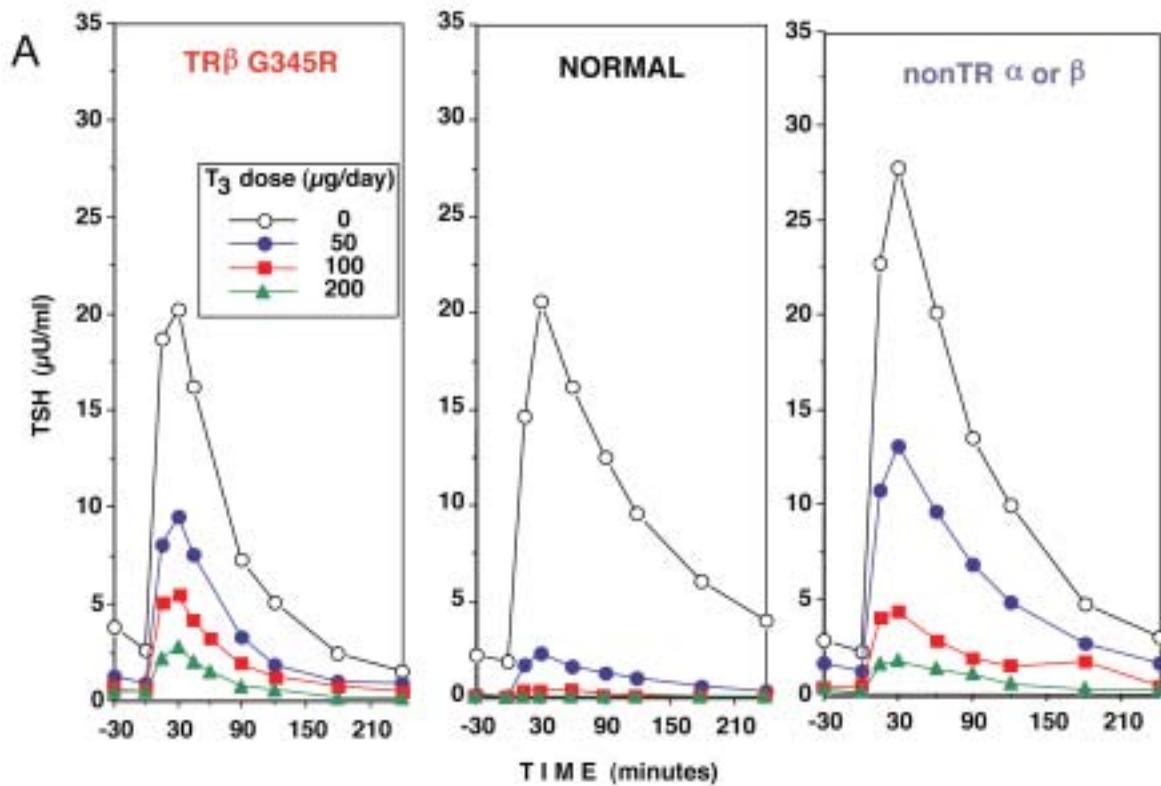
Evaluation for other endocrine abnormalities has yielded negative results. Tests assessing THaction on peripheral tissue at baseline are by and large normal, but are also of low sensitivity. A protocol, using short-term administration of $L-T_3$ to determine the sensitivity of central and peripheral tissues to TH has been standardized (5). The three incremental adult doses, each given for three consecutive supraphysiologic doses of 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{day}$, administered in two daily doses. Attenuated stimulation of sex-hormone binding globulin and ferritin and reduced suppression of TSH, cholesterol and creatine kinase are compatible with RTH (Fig. 2).



Figure 2. Responses to the administration of incremental doses of $L-T_3$ in three representative subjects: with RTH due to *TRβ* gene mutation (left), TRH without a mutation in the TR genes (nonTR RTH, right) and a normal individual (center).

The hormone was given in three incremental doses, each for 3 days. (A)

Thyrotroph responses to TSH-releasing hormone (TRH) stimulation. Compared to normal, TSH responses persist during $L-T_3$ suppression. (B) Peripheral tissues responses. Note the stimulation of ferritin and sex hormone binding globulin (SHBG) and the suppression of cholesterol and creatine kinase (CK) in the normal subject. Responses in affected subjects, with or without a *TRβ* gene mutation, were blunted or paradoxical.



Figure

Molecular Basis of the Disorder and its Variable Manifestations

Individuals expressing a single WT *TRβ* allele due to deletion of one allele are normal while those expressing a mutant allele (*mTRβ*) have RTH. This is not due to compensatory overexpression of the WT allele (20), and the reduced amount of TR does not produce haploinsufficiency. Rather, the presence of a defective *mTRβ* interferes with the function of the WT *TRβ*, a phenomenon termed dominant negative effect. This explains why inheritance of RTH is dominant when caused by *mTRβ*s and recessive in subjects with *TRβ* gene deletion (24, 34).

To exert dominant negative effect, *mTRβ*s with impaired T_3 -binding require a preserved DNA-binding domain and the ability to dimerize with a homologous or heterologous partner. *mTRβ*s interfere with WT TR function by occupying TREs on target genes and by engaging WT *TRβ* in homodimerization. It is for this reason that, in subjects with a replacement dose of 50 $\mu\text{g}/\text{day}$ and two 10 that no mutations have been identified in CpGs located in regions of the *TRβ* involved in homodimerization (40) (see „cold region 1“ in Fig. 3.). Dominant negative effect can be also exerted through impaired association of a *mTRβ* with a cofactor including, increased affinity to corepressor (35) or reduced association with coactivator (33). Similarly, *mTRβ*s with complete inability to bind T_3 can produce minimal dysfunction if association to corepressor is also reduced (34).

Less apparent was the explanation for the reverse situation of some *mTRβ*s exhibiting strong dominant negative effect with minimal impairment or even, intact T_3 -binding. The two mutations R243Q and R243W, located in the hinge domain are two such examples. These mutants manifest severe RTH and impaired transactivation function despite unimpaired translocation into the nucleus and normal T_3 -binding in solution. The defect resides in the reduced ability of T_3 to dissociate homodimers bound to TRE only when the *mTRβ*s are bound to DNA (41, 42). Rarely, *mTRβ*s may show greater impairment of transactivation on genes negatively than positively regulated by T_3 (34,

43). It is possible T_3 -binding to these *mTRβ*s (R383H and R429Q) is allosterically modulated by the different TREs (44).

The variable phenotype of RTH has multiple mechanisms. Homozygotes devoid of *TRβ* are deaf and color blind even though the magnitude of TFT abnormalities are comparable to heterozygotes with *mTRβ*s. This is due to the total absence of *TRβ* mediated action required for cochlear and photoreceptor development (see Animal Models below). Conversely, the severe signs of hypothyroidism in bone and brain of homozygotes with *mTRβ*s can be explained by the silencing effect of the double dose of the defective *TRβ* that interferes with *TRα* function as well, which does not occur with *TRβ* deletion.

Differences in the magnitude of hormonal resistance in different tissue are due to the absolute and relative levels of *TRβ* and *TRα* expression. For example, the hypothalamus and pituitary, dependent on *TRβ*, manifest relative hormone deprivation, while the heart, dependent on *TRα*, exhibits signs of hormone excess in the form of tachycardia (5). Inter- and intra-familial variation in the severity of RTH, likely caused by genetically modulated cofactors, and the occurrence of nonTR RTH have been addressed above, under Etiology and Variants.

Animal Models

The generation of mice with *TRβ* deletion (knockout, KO) and with mutations (knockin, KI) replicating those observed in man, have been invaluable in understanding the physiology of TR and the pathophysiology of RTH. Similar manipulations of the *TRα* gene have allowed the prediction a putative phenotype for corresponding gene abnormalities in man (45).

***TRβ* gene manipulation:** *TRβ*KO mice manifest all the features of humans with *TRβ* gene deletion. Heterozygotes are normal and homozygotes have, in addition to the classical TFT abnormalities, sensorineural deafness and monochromatic vision, indicating that the deaf-mutism and color blindness in humans can be fully explained by the *TRβ* deficiency. These mice allowed an in-depth investigation establishing that *TRβ*1 deficiency was responsible for

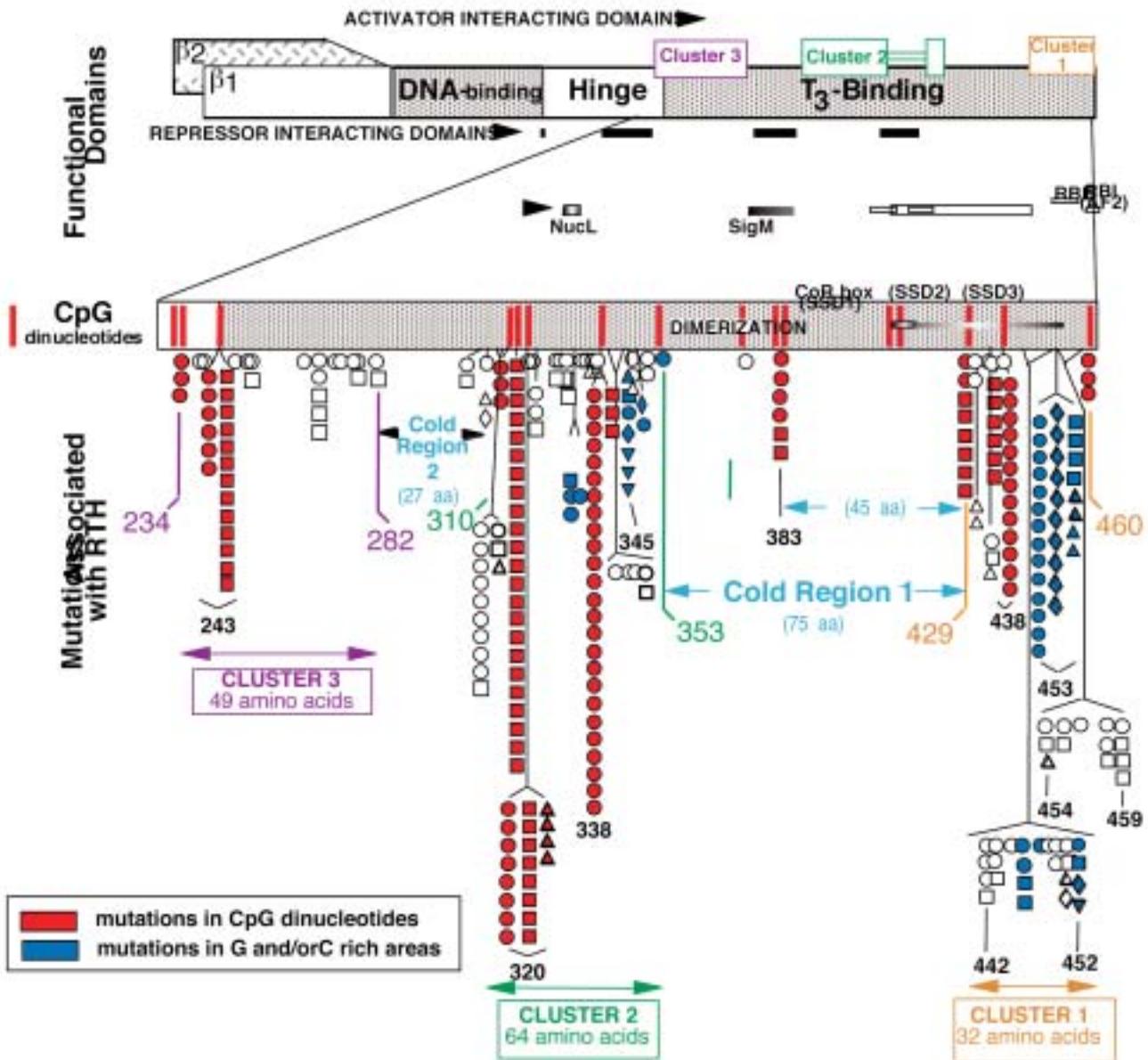


Figure 3. Location of mutations in the TR α molecule in subjects with RTH.

TOP PORTION: Schematic representation of TR α and its functional domains for interaction with TREs (DNA-binding), with hormone (T3-binding), with activating (89), repressing (90-92) cofactors and with nuclear receptor partners (dimerization) (93-95). Note their relationship to the three clusters of natural mutations.

Regulation of TH supply, metabolism and genomic action. (A)
(reverse T3, rT3); T2, 3,3'-diiodothyronine; 5'D, TBP, TATA-binding 42

BOTTOM PORTION: The T3-binding domain and distal end of the hinge region, which contain the three mutation clusters, are expanded and show the positions of CpG dinucleotide which are mutational "hot spots" in the TR α gene. The location of 121 different mutations detected in 299 unrelated families (published and our unpublished data) are each indicated by a symbol. Identical mutations in members of unrelated families are indicated vertically by the same color and symbol. "Cold regions" are areas devoid of mutations associated with RTH. Amino acids are numbered consecutively starting at the amino terminus of the TR α 1 molecule according to the consensus statement of the First International Workshop on RTH (96). TR α 2 has 15 additional residues at the aminoterminalus.

AF2, Hormone-dependent activation function (12th amphipatic helix) (97, 98); RBE, corepressor-binding enhancer; SSD, silencing subdomain (92); Nucl, nuclear localization (99); SigM, signature motif (100).

the hearing defect whereas TR β 2 for the color blindness (46). TR β KO mice have increased heart rate that normalizes with reduction on the TH level. This finding, together with the lower heart rate in TR α 1KO mice (45), indicates that TH affects heart rate through TR α 1, and explains the tachycardia observed in some patients with RTH.

TR β KI mice, engineered after human TR β gene mutations (frame-shift PV and T337 Δ) are true models of the dominantly inherited form or RTH. Heterozygous KI mice manifest many of the abnormalities observed in man. In addition, homozygotes develop metastatic thyroid cancer (47).

TR α gene manipulation: TR α gene deletions, total or only α 1, do not produce important alterations in TH or TSH concentrations (26). Several human mutations occurring in the TR β gene (PV, R438C and P453H) (48-50), were targeted in homologous regions of the TR α 1 gene of the mouse. The resulting phenotypes were variable but did not exhibit RTH. In the heterozygous state, the former two show severe postnatal development and growth retardation, while the latter has increased body fat and insulin resistance. Decreased heart rate and cold-induced thermogenesis, as well as reduced fertility, were also observed. All three TR α 1KIs were lethal in the homozygous state, recapitulating the noxious effect of unliganded TR α 1.

Combined and related gene deletions: Deletion of both α and β TRs is compatible with life (30, 31). This contrasts with the complete TH deficiency in the athyreotic Pax8KO mouse which dies prior to weaning, unless rescued by TH. The survival in the absence of TR is not due to the presence of an unidentified TR but to the absence of the noxious effect of aporeceptors. Indeed, removal of the TR α gene rescues the Pax8KO mice from death (51). Deletion of the TR α 1 gene also prevents the development of cerebellar abnormalities during TH deprivation (52). The aporeceptor does not seem to be required for the upregulation of TSH. NCoA-1 (SRC1) KO mice have resistance to TH in addition to sex-hormones (53). Mice deficient in retinoid-X receptor γ , the dimerization partner of TR, are also mildly resistance to TH (54).

Treatment

There is no treatment that will fully and specifically correct the defect. Most important is not to intervene with the sole purpose of normalizing the TH levels. Sinus tachycardia can be controlled with the β -adrenergic blocking agent, atenolol. Prenatal diagnosis and counseling is particularly important in families whose affected members show evidence of growth or mental retardation. Fortunately, in most subjects with RTH, the partial tissue resistance to TH is adequately compensated for by an increase in the endogenous supply of TH and thus, treatment is not required. This is not the case in patients with limited thyroïdal reserve due to prior ablative therapy. In these patients, the serum TSH level can be used as a guideline for hormone dosage. Rarely, the compensation is incomplete and requires the judicious administration of supra-physiologic doses of the hormone. In children, particular attention must be paid to growth, bone maturation and mental development. It is suggested that TH be given in incremental doses and that the BMR, nitrogen balance and serum SHBG be monitored at each dose, and bone age and growth on a longer term. Development of a catabolic state is an indication of overtreatment.

Even more rarely, infants may present with failure to thrive accompanied by hypermetabolism and severe tachycardia not controlled by beta-blockers. This has been observed with frameshift mutations producing a TR β with an extended nonsense carboxylterminal sequence (55). In such instances temporary reduction of the TH level with somatostatin, and if ineffective, the judicious administration of antithyroid drugs or triiodothyroacetic acid may be necessary.

A recent survey showed increased miscarriage rate and low birth weight of normal infants born to mothers with RTH (56). It is unclear at this time whether intervention during early gestation is appropriate. However, mothers with RTH should be followed carefully during pregnancy and, if carrying a normal infant, not allowed the FT₄ to rise more than 20% above the upper limit of normal. The wisdom of in-utero treatment is questionable (57).

Treatment with supraphysiological doses of L-T₃, given as a single dose every other day has

successfully reduced goiter size, without causing side effects (58).

The L-T₃ dose must be adjusted in increments until TSH and thyroglobulin are suppressed.

THYROID HORMONE CELL TRANSPORTER DEFECT

Cell Membrane Transporters of TH

The tight correlation between serum free TH concentrations and the level of TH- dependent processes, suggesting an equilibrium between the intracellular and serum free fraction of TH, has perpetuated the hypothesis of passive hormonal diffusion into cells (59). However, the identification and characterization of several classes of molecules with different kinetics and substrate preferences has changed this paradigm (60). These proteins belong to different families of solute carriers, organic anions, amino acids, and monocarboxylate transporters (MCT) (9). Differences in terms of tissue distribution and kinetics, as well as transport of other ligands, impart their distinctive roles in the cell-specific delivery of TH (9). Their importance was most convincingly demonstrated with the identification, in two different laboratories, of the first inherited THCTD caused by mutations in the *MCT8* gene (6, 7).

Etiology and Variants

A sex-linked form of mental retardation with motor abnormalities was described in 1944 (61) and subsequently named the Allan Herndon Dudley syndrome. In 1990, the syndrome was mapped to a locus on chromosome Xq21 (62). Following the identification of *MCT8* gene mutations in subjects with TFT abnormalities and neuropsychiatric manifestations suggestive of the Allan Herndon Dudley syndrome (6, 7), mutations in the same gene were found in other families with the syndrome, including the original family described in 1944 (63). The affected subjects presented the characteristic TFT abnormalities, not previously suspected.

While the severity of the disease is variable among families with *MCT8* gene mutations, no clear correlation of phenotype with genotype has been found. Given the existence of other

types of TH transporters and their different tissue distributions, it is anticipated that defects in each molecule would result in distinct phenotype, the nature of which cannot be predicted. However, as mice deficient in specific TH transporters become available, some idea about the nature of such diseases may be deduced.

Inheritance and Incidence

The inheritance is X-chromosome linked. Affected males manifest the psychomotor and TFT abnormalities, whereas carrier females show only mild TFT defects. Affected individuals are Asian, Amerindian and Caucasian of diverse ethnic origins. De novo mutations have been identified in 5 instances.

The incidence of this recently recognized defect is not known. The identification of 26 families with *MCT8* gene defects in fewer than 3 years indicates that this syndrome is more common than initially suspected. Spontaneous *MCT8* gene mutations can be maintained in the population because carrier females are asymptomatic, thus no negative selection takes place.

The *MCT8* Gene and Mutations

The *MCT8* gene was first cloned during the physical characterization of the Xq13.2 region known to contain the X-inactivation center (64). It has 6 exons and a very long (more than 100kb) first intron. It belongs to a family of genes, officially named *SLC16*, the products of which catalyze proton-linked transport of monocarboxylates, such as lactate, pyruvate and ketone bodies. The deduced products of the *MCT8* (*SLC16A2*) gene are proteins of 613 and 539 amino acids (translated from two in-frame start sites) containing 12 transmembrane domains with both amino- and carboxyl- termini located within the cell (65). In 2003, Friesema et al (66) demonstrated that the rat homologue was a specific transporter of TH into cells.

We now know of 26 families with *MCT8* gene mutations (67, 68) (and personal observations). Mutations are distributed throughout the coding region of the gene (**Fig. 4**). Single amino acid substitutions causing missense mutations were found in 10 families and in 4 they resulted

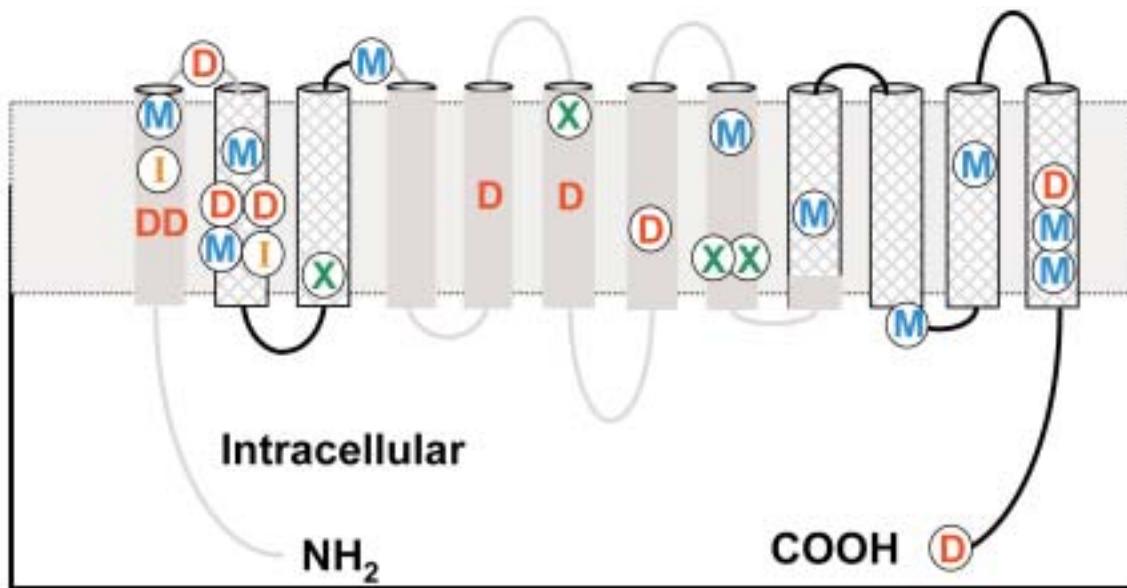


Figure 4. Location of mutations in the MCT8 gene of 26 families. Their type is indicated as follows: M, missense; X, nonsense; I, insertion; D, deletion.

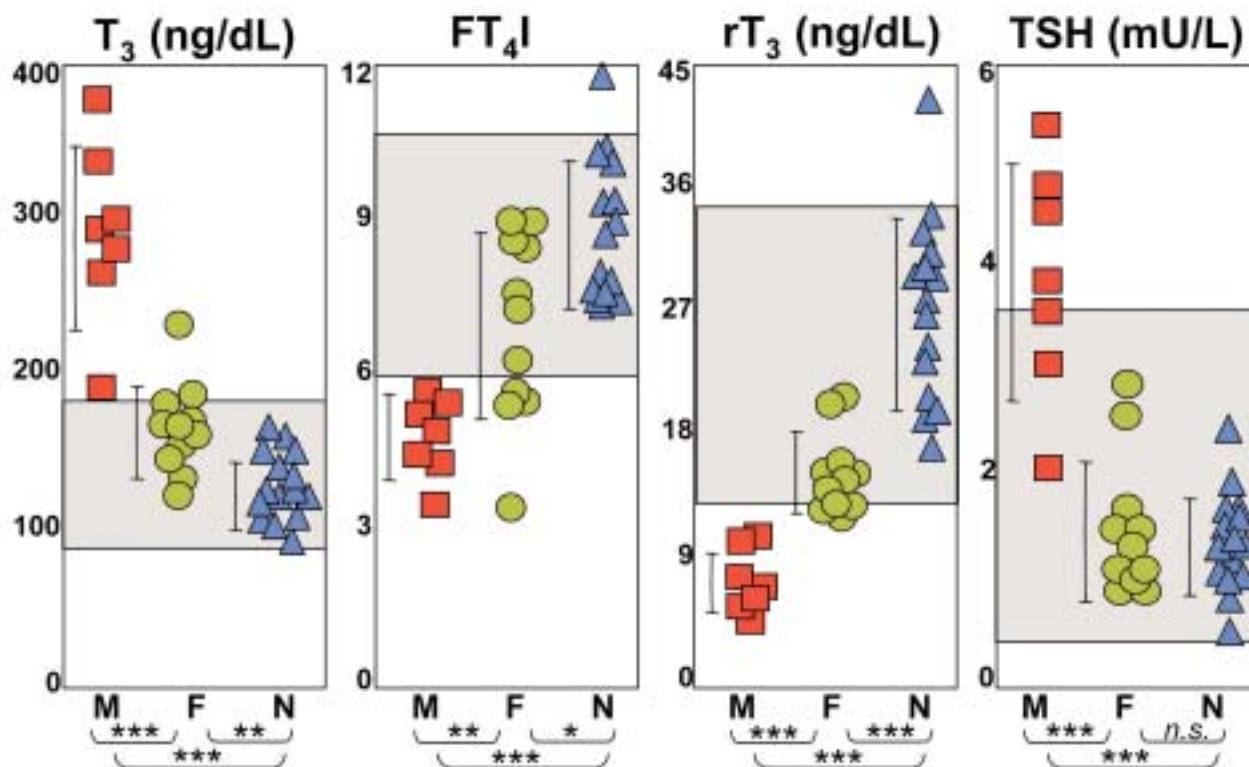


Figure 5. Thyroid function tests from six families studied at the University of Chicago: seven affected males (M, in red squares), eleven carrier females (F, in green circles), and fifteen unaffected family members (N, in blue triangles). (* P < 0.05; ** P < 0.01, *** P < 0.001). Shaded areas represent the normal range for each test. Bars are 2 SDs.

in nonsense mutations. Single amino acid deletions or insertions were each reported in two families. One or two nucleotide deletions or insertions produced 2 stop codons, and in one case a 64-amino-acid extension of the carboxyl terminus of the MCT8 molecule. Deletions of 10 nucleotides or more were reported in 4 families, and in one, an intronic mutation affected the splice site. Two unrelated families with the same mutation occurred on two occasions (F229Δ and S448X).

Clinical Features and Course of the Disease

Male patients that are later found to have *MCT8* gene mutations are referred for medical neurodevelopmental abnormalities. They present with hypotonia, motor delay, feeding problems, inability to walk and no speech development. The clinical presentation of more than 100 male patients with *MCT8* gene mutations known to date is very similar, with consistent TFT abnormalities, described earlier, and severe psychomotor retardation. Review of these families indicates that parents were not consanguineous and gestation and delivery were normal. Infants were normal in length, weight, and head circumference. They do not show typical signs of hypothyroidism. An early sign of the defect, manifesting in the first few weeks of life, was hypotonia and feeding difficulties.

With advancing age, weight gain lags behind and microcephaly became apparent, while linear growth proceeded normally. Although truncal hypotonia persisted, there is progressive development of limb rigidity leading to spastic quadriplegia. Muscle mass is diminished and there is generalized muscle weakness with typical poor head control, originally described as „limber neck“ (61). Purposeless movements and characteristic paroxysms of kinesigenic dyskinesias are common. These are usually triggered by somatosensory stimuli, such as changing of clothes or lifting the child. The attacks consist of extension of the body, opening of the mouth, and stretching or flexing of the limbs lasting for 2 to less than a minute (69). In addition to these nonepileptic events, true seizures can also occur.

Reflexes are usually brisk, clonus is often present but nystagmus and extension plantar responses are less common. Most affected children are never able to sit by themselves or walk; those that manage to do so, lose this ability with time, indicating progressive deterioration.

Cognitive impairment is severe. Individuals never develop speech or, at the most, acquire the ability to emit garbled sounds. Their behavior tends to be non aggressive. Although early death has occurred in some families, most often due to aspiration pneumonia, some individuals leave beyond the age of 70 years. investigation during infancy or early childhood because of Female carriers do not manifest any of the psychomotor abnormalities described above. However, intellectual delay and frank mental retardation have been reported (6, 70).

Laboratory Findings

Most characteristic, if not pathognomonic, are the high serum T_3 and low rT_3 concentrations. Although T_4 is reduced in most cases and is usually the first thyroid abnormality identified during neonatal screening, a normal T_4 has been observed in some individuals (71). TSH levels are normal or slightly elevated, rarely above 6 mU/L. Interestingly, heterozygous female carriers have serum TH concentrations intermediate between affected males and unaffected family members (Fig. 5).

All other blood and urine chemistry has been normal, including organic and amino acids, carnitine and pyruvate. Lactic acid was high in one case (70), but not in others (72) (and personal observation).

Although brain magnetic resonance imaging is often normal, atrophy of the cerebrum, thalamus, and basal ganglia have been reported, probably reflecting dysmyelination (67, 72). Administration of incremental doses of L- T_3 , using the protocol devised for the study of patients with RTH, showed reduced pituitary sensitivity to the hormone (personal observations).

Cultured skin fibroblasts from males with *MCT8* deficiency [L512P and delAFrSh404(416X)] showed a significant reduction T_4 and T_3 uptake (73). It was, on average, 24% and 7,3%, respec-

tively, compared to 100% in fibroblasts from normal individuals. Baseline D2 enzymatic activity was 6 to 8-fold higher. Fibroblasts from carrier females gave results intermediate to those of affected males and normals.

Molecular Basis of the Disorder

There is no question that a defective MCT8 molecule is at the basis of *MCT8* gene-linked TH cell transport defects. Cellular T_3 -uptake, determined in 12 different mutations (68), showed no activity in 4 mutations, 2 missense (Leu471Pro and Leu512Pro) and 2 nonsense mutations (Arg245X and Ser448X). In 3 mutations, (F229 Δ , insertion Ile189 and Ala224Val), uptake was from 2,4 to 5%. In the remaining 5 mutations, T_3 -uptake ranged from 8,6 to 33% that of the wild-type MCT8; all five were missense mutations (S194F, V235M, R271H, L434W, and L598P).

Based on available clinical, chemical and in vitro information, there is no clear relation between the degree of impaired MCT8-mediated T_3 transport and the level of serum T_3 . This is probably due to the important role of perturbations in iodothyronine metabolism on the production of T_3 as demonstrated in the *Mct8*KO mice (see below). Except for early death, no other clinical findings appear to correlate with the degree of functional or physical disruption of the MCT8 molecule. Genetic factors, variability of tissue expression of MCT8, and other iodothyronine cell membrane transporters could be at the basis of this lack of phenotype/genotype correlation. However, the possibility that MCT8 is involved in the transport of other ligands has not been excluded.

Animal Model Demonstrating Tissue Specific TH Deficiency and Excess

Mct8-deficient recombinant (*Mct8*KO) mice (14, 74) replicate the characteristic TFT abnormalities found in humans and, thus, helped in understanding the mechanisms responsible for the thyroid phenotype (75). Measurements of tissue T_3 content showed variable availability of the circulating hormone to tissues, depending on redundancy in TH transmembrane transporters. Tissues, such as the liver (9), that express other transporters than *Mct8*, have T_3

concentrations reflecting the high levels in serum and are, therefore, „thyrotoxic“ (Fig. 6A). Hepatic thyrotoxicosis in *Mct8*KO mice increases the D1 enzymatic activity (Fig. 6B). In accordance, serum cholesterol concentration is increased and serum alkaline phosphatase is decreased. In contrast, tissues with limited redundancy in cell membrane TH transporters, such as the brain (9), have decreased T_3 content in *Mct8* KO mice (Fig. 6C). As a consequence, and also because of low T_4 , local D2 enzymatic activity is increased (Fig. 6D). D2's role is to maintain local levels of T_3 in the context of TH deficiency and its activity is post-translationally regulated by TH availability (10).

These findings of coexistent T_3 excess and deficiency in the *Mct8*KO mouse tissues explain, in part, the mechanisms responsible for the TFT pattern observed in *Mct8* deficiency (14, 74). The increased D1 and D2 activities, stimulated by opposite states of intracellular TH availability, have an additive consumptive effect on T_4 levels and result in increased T_3 generation. The impaired T_3 uptake in the brain reduces its availability for deiodination by D3. The increased liver D1 enzymatic activity also stimulates rT_3 metabolism. These tissue-specific differences in intracellular TH content and consequent changes in TH metabolism are likely responsible for the unusual clinical presentation of this defect compared to global TH deficiency.

Treatment

Treatment options for patients with *MCT8* gene mutations are currently limited. Supportive measures include the use of braces to prevent malpositioned contractures that may ultimately require orthopedic surgery. Diet should be adjusted to prevent aspiration. Dystonia might be improved with medications such as anticholinergics, L-DOPA carbamazepine and lioresol. Drooling might be improved with glycopyrolate or scopolamine. Seizures should be treated with standard anticonvulsivants. When refractory, ketogenic diet has been successful as well as administration of supraphysiologic doses of L- T_4 . Experience with such treatments is, however, limited to only a few cases.

Detection of low T_4 or elevated TSH by

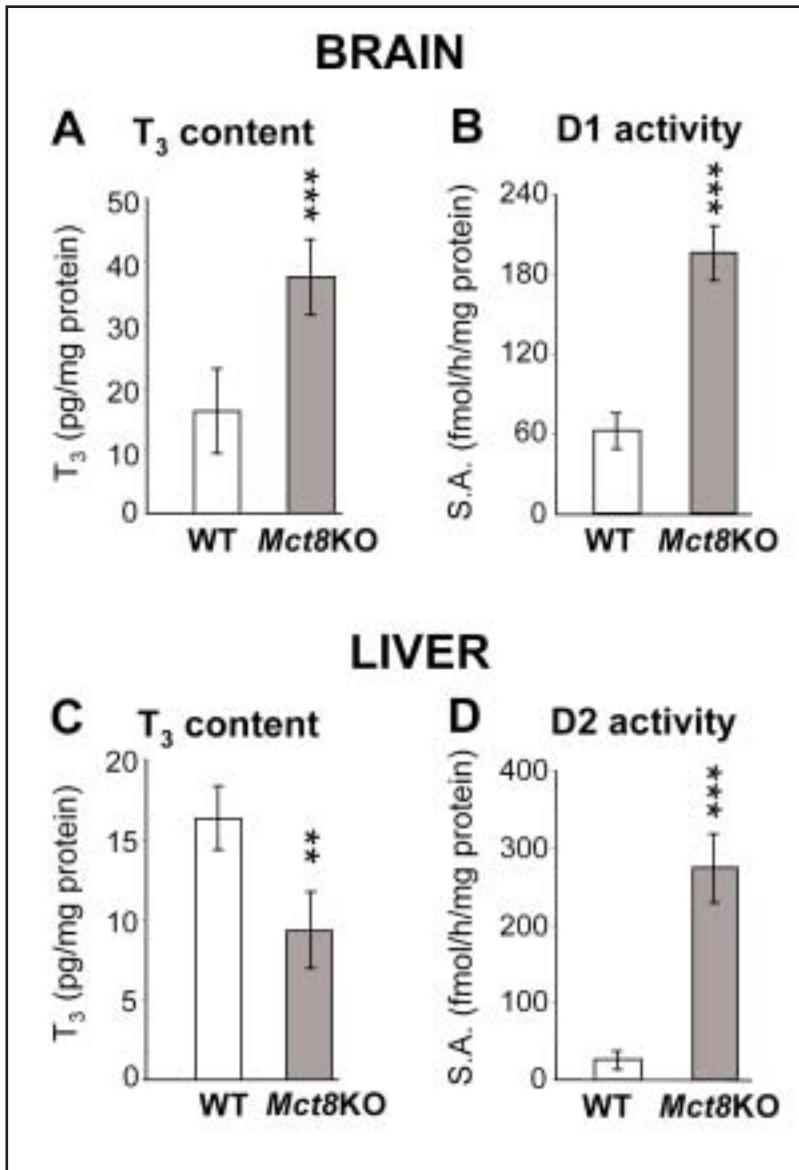


Figure 6. Effects of Mct8 deficiency in mice: (A) Liver T₃ content; (B) Liver deiodinase 1 enzymatic activity; (C) Brain T₃ content; (D) Brain deiodinase 2 enzymatic activity. Bars represent mean±SD. WT, wild type male mice; Mct8KO, male Mct8 knockout mice; S.A., specific activity; ** P<0.01, *** P<0.001. RBI, corepressor-binding inhibitor (98);

neonatal screening has led, in several infants, to treatment with L-T₄. However, no improvement has been noted when used in physiological doses, presumably because of the impaired uptake of the hormone in MCT8-dependent tissues. Administration of T₄ during pregnancy and the efficacy of several TH analogs, that may bypass the molecular defect by using alternative transporters, have therapeutic potential that are being tested in Mct8-deficient mice.

THYROID HORMONE METABOLISM DEFECT

Intracellular Metabolism of TH The requirement for TH varies with tissue, cell type and time. Control of TH entry into the cell through membrane transporters is apparently insufficient to provide the proper hormone supply. Further fine-tuning is achieved by the generation of active TH or by its inactivation at the site of action. D1 and D2 are 5'-iodothyronine deiodinases that catalyze TH activation by converting T₄ to T₃. D3, a 5-deiodinase is the main TH inactivator through conversion of T₄ to rT₃ and T₃ to T₂.

Deiodinases are selenoproteins containing the rare amino acid, selenocysteine. Its presence

in the active center is required for their enzymatic activity. The signals and mechanism of selenoprotein synthesis is summarized below (see The *SBP2* Gene its Product, Function and Mutations). Deiodinases are differentially expressed in tissues and are further regulated at the level of transcription, translation and metabolism by alterations in the intracellular environment (10). D2 activity can change very rapidly as its half-life is more than 15-fold shorter than that of D1 and D3. D2 inactivation, mediated through ubiquitination, is accelerated by T₄, a process reversible by deubiquitination.

Etiology and Variants

Until recently, defects of TH metabolism observed in man were all acquired. The most frequent produces the „low T₃ syndrome“ of non-thyroidal illness (76). In 2005, the first inherited disorder of iodothyronine metabolism was described, caused by a reduction in the synthesis rather than structure of deiodinases (8).

The mutant gene, the selenocysteine insertion sequence-binding protein 2 (*SECISBP2*, in short *SBP2*), affects the synthesis of selenoproteins including the deiodinases. It is anticipated that mutations in other genes causing defective thyroid metabolism may have different phenotypes.

Incidence and Inheritance

The incidence of inherited defects of metabolism is unknown as the first two families were reported only two years ago. Furthermore, it affects only one of the 12 known genes involved in deiodinase synthesis and degradation. The inheritance of *SBP2*-mediated defect in TH metabolism is recessive. The ethnic origins of the parents were Bedouin from Saudi Arabia (homozygous), African and Irish (compound heterozygous) (8).

The *SBP2* Gene its Product, Function and Mutations

Human *SBP2* cDNA was cloned in 2002 (77). The gene has 17 exons and is located in chromosome 9q22.2. terminal domain is sufficient for all known functions of *SBP2* including selenocysteine insertion sequence-binding, ribosome binding and selenocysteine incorporation (78). A

unique N-terminal domain contains a strong nuclear localization signal but its precise function is unknown (77). *SBP2* is expressed at low levels in all tissues tested and at high levels, as well as from an additional transcript, in testis (77).

Several factors are required for Sec incorporation: cis-acting sequences present in the mRNA of a selenoprotein [UGA codon and selenocysteine insertion sequence] and trans-acting factors [elongation factor (eEF^{Sec}), tRNA^{Sec}, and *SBP2*] (78). Sec is incorporated through recoding of a UGA codon present in the mRNAs of a selenoproteins. This process is dictated by the presence of selenocysteine insertion sequence, a characteristic stem-loop RNA structure in the 3' untranslated region. *SBP2* binds to the selenocysteine insertion sequence, recruits eEF^{Sec} which, in turn brings the tRNA^{Sec} to the UGA codon for the incorporation of selenocysteine in the protein nascent chain.

Three mutations in the *SBP2* gene were identified. In one family, affected individuals are homozygous for *SBP2* R540Q, which is likely a hypomorphic allele. In another family, the affected child inherited from the father the nonsense

The protein has 854 amino acids. The C- mutation K438X and from the mother an intronic mutation (IVS8ds+29G->A). The latter creates an alternative donor splice site, which is half of the time used to produce an alternative transcript that incorporates 26pb into exon 8. Thus, the affected child expresses one quarter of the normal *SBP2* transcript.

Clinical Features

The propositi of the two families with *SBP2* gene defects came to medical attention because of short stature and delayed bone age, which prompted thyroid function testing and identification of abnormalities (8). Pregnancy and birth were normal but neonatal screen in one of the children showed an elevated TSH level with high normal T₄. Development proceeded normally but puberty was delayed. Audiogram showed normal hearing. The clinical manifestations during adult life are not known as the 4 affected individual range in age from 2 to 16 years.

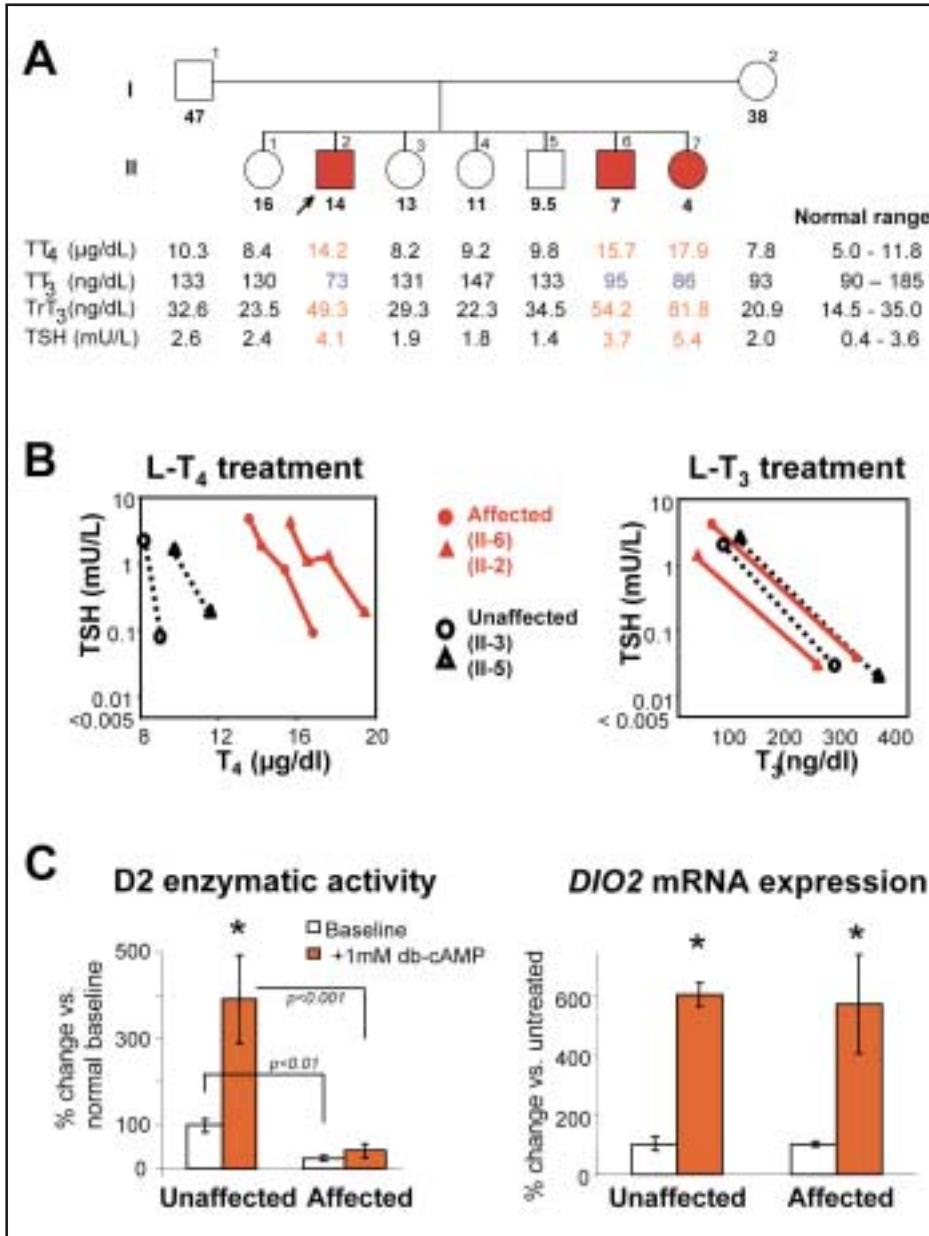


Figure 7. A family with SBP2 gene mutation and the resulting in-vivo and in-vitro abnormalities. (A) Pedigree and thyroid function tests (TFTs) in members of Family A. TFT values are aligned under each subject symbol. Numbers 43 immediately below each symbol are ages in years. TT₄, total T₄; TT₃, total T₃; TrT₃, total reverse T₃; thyroid-stimulating hormone, TSH. Abnormal values are in bold characters: high in red, low in blue. * Normal range for children: 100-205 μg/dL. (B) Serum TSH and corresponding serum T₄ and T₃ levels, before and during the oral administration of incremental doses of L-T₄ and L-T₃. Note the higher concentrations of T₄ required to reduce serum TSH in the affected subjects. indicate ± SEM. Baseline and stimulated D2 activity is significantly lower in affected. There is significant increase of DIO2 mRNA with db-cAMP, in both normals and affected; * P < 0.001. There are no significant differences between affected and unaffected in baseline and db-cAMP stimulated DIO2 mRNA.

Laboratory Findings

The characteristic laboratory findings in subjects with SBP2 gene mutations are high T₄, low T₃, high rT₃ and slightly elevated serum TSH (Fig. 7A) (8). No other hormonal abnormalities have been detected and, despite delayed growth, serum IGF1 concentrations are normal.

The hypothesis that the observed TFT abnormalities could be the consequence of impaired conversion of T₄ to T₃ was supported by the different potencies of incremental doses L-T₄ and L-T₃. to suppress TSH. Compared to

normal sibling, affected children required higher doses and serum concentrations of T₄, but not T₃, to reduce their TSH (Fig. 7B).

Skin fibroblasts obtained from the affected individuals and propagated in cell culture, showed reduced baseline and cAMP-stimulated D2 enzymatic activity, compared to fibroblasts from unaffected individuals. However, baseline and cAMP-stimulated D2 mRNA levels were not different from normal (Fig. 7C).

As SBP2 is epistatic to selenoprotein synthesis, identification of decreased D2 activity due to a recessive SBP2 defect was likely to

affect other selenoproteins. Indeed, glutathione peroxidase was reduced by 7,5-fold in serum and by 3,3-fold in fibroblasts of the affected compared to normal subjects. Furthermore, serum selenoprotein P levels were significantly reduced (8).

Molecular Basis of the Disorder

Clinical and laboratory investigations have established that the mutations in the SBP2 gene fully explain the observed abnormalities. The question was, how can a defective gene, involved in the synthesis of an entire class of proteins, present mainly abnormal TFTs? First of all, the defect in all subjects is partial. Second, there is a known hierarchical preservation of selenoproteins during selenium deprivation. (78, 79). This hierarchy is supposedly produced by the rates of selenoprotein degradation and by the functional demands of particular selenoproteins (78). Therefore, selenoproteins with short half life and high demand for their function, such as D2, might be the first to fail when the selenocysteine incorporation machinery becomes inefficient.

It is remarkable that affected individuals have a similar thyroid phenotype as mice with combined *Dio1* and *Dio2* genes targeted disruption, without having a defect in these loci. As the subjects described herein, these mice have high serum T_4 and TSH concentration, low T_3 and markedly elevated rT_3 (Valerie A. Galton, personal communication). Furthermore, as *Dio2*KO male mice (80), they have growth delay between 3 - 8 weeks, reminiscent of the propositi of both families. In contrast to the mice, the affected children had normal hearing, probably due to the partial deiodinase deficiency, including low D2 and D3.

Animal Models

There is no mouse model of a SBP2 defect. It should be noted that KO mice with complete inability to synthesize selenoproteins die during early embryonic development (81). However, a partial synthesis defect results in uneven deficiency in the different types of selenoproteins, reflecting the hierarchy in selenoprotein expres-

sion known to occur under conditions of selenium deprivation.

Mice deficient in each of the three deiodinases have been created by homologous recombination (80, 82, 83) and a strain with marked deficiency in D1 has been identified (84). *Dio1*KO mice have elevated levels of T_4 and rT_3 while the concentrations of T_3 and TSH are unimpaired. *Dio2*KO mice have significantly elevated serum T_4 and normal T_3 levels but contrary to *Dio1*KO mice, TSH concentration is elevated. In addition, *Dio2*KO mice show some growth retardation and defective auditory function (85). Finally, lack of D3 is most deleterious. Total deficiency is associated with partial embryonic and neonatal lethality. Surviving mice exhibit severe growth retardation, impaired reproductive function and central hypothyroidism (83). Because the *Dio3* gene is subject to imprinting, heterozygotes have reduced D3 activity only if the null allele is inherited from the father.

Treatment

Although the subjects described have generalized deficiency of selenoproteins, the phenotype is mild, most likely owing to the fact that the deficiency is not complete and due to the hierarchical preservation of selenoproteins. A more severe deficiency may have more severe consequences. In addition the repercussions resulting from the described defects might be underestimated in these young subjects who, with age, could present additional manifestations, such as decreased fertility (86) and propensity to develop cancer due to impaired anti-oxidative protection (87). Having this selenocysteine incorporation defect and the low levels of serum selenium, it is possible that selenium supplementation would be beneficial to these patients. This is currently under investigation.

DIFFERENTIAL DIAGNOSIS

The combination of non-suppressed (normal or slightly elevated) serum TSH with increased concentrations of T_4 , T_3 or both, is characteristic of the three syndromes of reduced sensitivity to TH (Table 2). Exclusion of serum

Table 2. Comparison of TFT Abnormalities in Syndromes of reduced sensitivity to TH

Syndrome	FT ₄	FT ₃	rFT ₃	TSH	Other manifestations	Gene
RTH	↑↑	↑N	↑↑	N, sl ↑	ADD Tachycardia, goiter	<i>TRβ</i>
THCTD*	↓	↑↑	↓	N, sl ↑	Severe psychomotor impairment	<i>MCT8</i>
THMD	↑↑	↓	↑↑	N, sl ↑	Growth delay	<i>SBP2</i>

* males

THCTD = thyroid hormone transport defect
 THMD = thyroid hormone metabolism defect
 sl, slight; ↑, increased; ↓, decreased; N, normal.

TH transport protein abnormalities by direct assessment or measurement of the free TH levels, (preferably by equilibrium dialysis) is recommended before proceeding with further testing. The laboratory test abnormalities must be confirmed by repeated testing, several weeks or months apart, since transient changes in TFTs can be the consequence of a variety of non-thyroidal illnesses and drugs. Other rare causes of increased TH concentration, such as the presence of iodothyronine antibodies should be considered when thyroglobulin and/or thyroperoxidase antibodies are positive. It should be noted that in a TH cell transporter defect due to *MCT8* gene mutations, serum T₄ concentration is usually low, rather than high.

Although the clinical presentation of TH cell transporter defects involving other cell-membrane transporters than *MCT8*, is unknown, the latter always presents in males accompanied by psychomotor abnormalities, including truncal hypotonia, limb spasticity, poor head control, dyskinetic movements and absent or garbled speech. However, presence of the characteristic TFT abnormalities is mandatory. Sequencing of the *MCT8* gene in subjects with similar psychomotor manifestations but no characteristic TFT changes have yielded negative results.

Because the clinical presentations of RTH, and TH metabolism defect, are variable and non-

specific, the differential diagnosis includes all possible causes of hyperthyroxinemia accompanied by non-suppressed TSH (Table 3). A typical feature of RTH and *SBP2*-linked TH metabolism defect is high free T₄ concentration. It should be noted that in mutant albumins with high affinity for T₄, free T₄ can be falsely elevated when measured by a direct method. In RTH the possibility of a TSH producing pituitary adenoma should be considered particularly when first presenting in an adult and when the parents have normal TFTs or are not available for testing. Measurement of the α-subunit of pituitary glycoproteins should precede imaging studies.

Most rewarding and cost effective is to obtain TFTs in first degree relatives. In RTH, which usually is dominantly inherited, testing both parents may suffice.

Identification of affected sibling and children can help in sorting out symptoms and signs that are unrelated to the condition under investigation. Mothers of males suspected of having *MCT8* gene defect, should be also tested as they could present a mild thyroid phenotype.

Genetic testing can be sufficient to provide the diagnosis under the following circumstances. pathognomonic if it results in a functionally defective protein or failure to synthesize the protein. Linkage analysis, if informative, can exclude the involvement of a specific gene. However,

Table 3. Conditions Associated with Hyperthyroxinemia

Thyroid Function Tests						
Defect	T ₄	T ₃	rT ₃	TSH	FT ₄ direct	FT ₄ dialysis
↑TBG	↑	↑	↑	N	N	N
↑TTR*	↑	N	↑	N	N	N
FDH	↑	↑ or N	↑	N	↑	N
RTH	↑	↑ or N	↑	s↑ or N	↑	↑
SBP2	↑	↓	↑	s↑ or N	↑	↑
Acute NTI	↑	↓↓	↑	N	↑ or N	N

* refers to TTR with increased affinity for T₄ and rT₃

TBG, T₄ binding globulin; TTR, transthyretin;
 FDH, familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia;
 SBP2, selenocysteine insertion binding sequence protein;
 NTI, nonthyroidal illness;
 sl, slight; ↑, increased; ↓, decreased; N, normal.

absence of a mutation does not rule out the suspected defect, particularly when dealing with mosaicism, nonTR RTH or TH metabolism defect caused by a mutation in a gene other than *SBP2*. In such instances a biochemical diagnosis should be secured by measuring the responses to incremental doses of L-T₄ and/or L-T₃, as described in the respective section of Laboratory Tests.

SUMMARY AND PRACTICE POINTS

Reduced sensitivity to thyroid hormone is more common than formerly suspected.

Cell-specific TH deprivation and excess can coexist in syndromes of reduced sensitivity to TH.

RTH

Goiter, attention deficit hyperactivity disorder

and tachycardia are the most common reasons that lead to the testing and ultimately, the diagnosis of RTH. Genetic analysis of subjects suspected of having RTH provides a short cut to diagnosis.

Failure to identify a *TRβ* gene mutation in genomic DNA from lymphocytes of subjects presenting the RTH phenotype could be due to mosaicism in a de-novo mutation or to a yet unidentified etiology of the syndrome (nonTR RTH).

Ablative treatment in RTH complicates the follow up and outcome, as adjustment of TH replacement is not easy.

TH cell transport defect

The neurological manifestations of MCT8 deficiency cannot be explained by the TFT abnormalities and the observed phenotype is different from that of global thyroid hormone

deficiency or excess.

Psychomotor abnormalities in the absence of the characteristic high serum T₃ and low rT₃ concentrations are unlikely to be the cause of MCT8 defects.

Neonatal screening programs for congenital hypothyroidism, based on blood TSH and/or T₄ measurements, are likely to miss the presence of TH cell transport defect caused by MCT8 mutations.

As carrier females are asymptomatic, the presence of a MCT8 defect is not suspected until the birth of the first affected male.

Aspiration pneumonia is the most common cause of death in affected males. Treatment with physiological doses of L-T₄ has not corrected the phenotype in several patients.

TH metabolism defect

The phenotypes of isolated deiodinase defects in man remain unknown.

SPECULATIONS and UNCERTAINTIES RTH

Sporadic, nonTR RTH could be due to putative recessive defects in proteins involved in the mediation of TH action.

Data from TR α KI mice suggest that mutations in humans may not have TFT abnormalities and that lethality could be the reason for failure of its identification.

The contribution of cytosolic (non-genomic) action of TH to the phenotype of RTH remains unknown.

TH cell transport defect

Genetic defects of TH transporters other than MCT8 are likely to have a different phenotype.

The neuropsychiatric abnormalities could be due to early TH transport defect specific to brain cells or MCT8 may be required for the transport of an important, but yet unidentified substance.

It is unknown if brain damage in humans with MCT8 deficiency occurs in the embryo or

develops after birth? This is of great importance in the planning of therapy.

It is unknown if the low T₄ precedes the elevated T₃ and whether TFT abnormalities are always present at birth?

TH metabolism defect

Other, yet undefined gene defects affecting TH metabolism may share the TFT abnormalities found in SBP2 deficiency.

The phenotype of complete SBP2 deficiency is expected to be more severe, if not lethal, than that so far identified.

ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by grants DK17050, RR04999 and DK07011 from the National Institutes of Health. Reprinted from Refetoff S, Dumitrescu AM. Syndromes of reduced sensitivity to thyroid hormone: genetic defects in hormone receptors, cell transporters and deiodination. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab., 21::277-305, 2007 with permission from Elsevier.

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Refetoff S, DeWind LT, DeGroot LJ 1967 Familial syndrome combining deaf-mutism, stippled epiphyses, goiter, and abnormally high PBI: possible target organ refractoriness to thyroid hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 27:279-294
2. Refetoff S, DeGroot LJ, Benard B, DeWind LT 1972 Studies of a sibship with apparent hereditary resistance to the intracellular action of thyroid hormone. *Metabolism* 21:723-756
3. Sakurai A, Takeda K, Ain K, Ceccarelli P, Nakai A, Seino S, Bell GI, Refetoff S, DeGroot LJ 1989 Generalized resistance to thyroid hormone associated with a mutation in the ligand-binding domain of the human thyroid hormone receptor β . *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 86:8977-8981
4. Usala SJ, Tennyson GE, Bale AE, Lash RW, Gesundheit N, Wondisford FE, Accili D, Hauser P, Weintraub BD 1990 A base mutation of the c-erbA β thyroid hormone receptor in a kindred with generalized thyroid hormone resistance. Molecular heterogeneity in two other kindreds. *J. Clin. Invest.* 85:93-100
5. Refetoff S, Weiss RE, Usala SJ 1993 The syndromes of resistance to thyroid hormone. *Endocr Rev* 14:348-399
6. Dumitrescu AM, Liao XH, Best TB, Brockmann K, Refetoff S 2004 A Novel Syndrome Combining Thyroid and Neurological Abnormalities Is Associated with Mutations in a Monocarboxylate Transporter Gene. *Am J Hum Genet* 74:168-175
7. Friesema EC, Grueters A, Biebermann H, Krude H, von Moers A, Reeser M, Barrett TG, Mancilla EE, Svensson J, Kester MH, Kuiper GG, Balkassmi S, Uitterlinden AG, Koehle J, Rodien P, Halestrap AP, Visser TJ 2004 Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *Lancet* 364:1435-7
8. Dumitrescu AM, Liao X-H, Abdullah SYM, Lado-Abeal J, Abdul-Majed F, Moeller LC, Boran G, Schomburg L, Weiss RE, Refetoff S 2005 Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism. *Nat Genet* 37:1247-52
9. Friesema EC, Jansen J, Milici C, Visser TJ 2005 Thyroid hormone transporters. *Vitam Horm* 70:137-67
10. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR 2002 Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenoiodinases. *Endocr. Rev.* 23:38-89
11. Bassett JH, Harvey CB, Williams GR 2003 Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Mol Cell Endocrinol* 213:1-11
12. Zhang J, Lazar MA 2000 The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu Rev Physiol* 62:439-66
13. Yen PM, Ando S, Feng X, Liu Y, Maruvada P, Xia X 2006 Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Mol Cell Endocrinol* 246:121-7
14. Dumitrescu AM, Liao XH, Weiss RE, Millen K, Refetoff S 2006 Tissue specific thyroid hormone deprivation and excess in Mct8 deficient mice.
15. Fondell JD, Guermah M, Malik S, Roeder RG 1999 Thyroid hormone receptor-associated proteins and general positive cofactors mediate thyroid hormone receptor function in the absence of the TATA box-binding protein-associated factors of TFIID. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1959-1964
16. Beck-Peccoz P, Chatterjee VKK 1994 The variable clinical phenotype in thyroid hormone resistance syndrome. *Thyroid* 4:225-232
17. Weiss RE, Weinberg M, Refetoff S 1993 Identical mutations in unrelated families with generalized resistance to thyroid hormone occur in cytosine-guanine-rich areas of the thyroid hormone receptor beta gene: Analysis of 15 families. *J Clin Invest* 91:2408-2415
18. Weiss RE, Marcocci C, Bruno-Bossio G, Refetoff S 1993 Multiple genetic factors in the heterogeneity of thyroid hormone resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76:257-259
19. Mixson AJ, Hauser P, Tennyson G, Renault JC, Bodenner DL, Weintraub BD 1993 Differential expression of mutant and normal beta T3 receptor alleles in kindreds with generalized resistance to thyroid hormone. *J. Clin. Invest.* 91:2296-2300
20. Hayashi Y, Janssen OE, Weiss RE, Murata Y, Seo H, Refetoff S 1993 The relative expression of mutant and normal thyroid hormone receptor genes in patients with generalized resistance to thyroid hormone determined by estimation of their specific messenger ribonucleic acid products. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76:64-69
21. Sadow P, Reutrakul S, Weiss RE, Refetoff S 2000 Resistance to thyroid hormone in the absence of mutations in the thyroid hormone receptor genes. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes.* 7:253-259
22. Weiss RE, Hayashi Y, Nagaya T, Petty KJ, Murata Y, Tunka H, Seo H, Refetoff S 1996 Dominant inheritance of resistance to thyroid hormone not linked to defects in the thyroid hormone receptors α or β genes may be due to a defective co-factor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81:4196-4203
23. LaFranchi SH, Snyder DB, Sesser DE, Skeels MR, Singh N, Brent GA, Nelson JC 2003 Follow-up of newborns with elevated screening T4 concentrations. *J. Pediatr.* 143:296-301
24. Takeda K, Sakurai A, DeGroot LJ, Refetoff S 1992 Recessive inheritance of thyroid hormone resistance caused by complete deletion of the protein-coding region of the thyroid hormone receptor- β gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74:49-55
25. Mitsuhashi T, Tennyson GE, Nikodem VM 1988 Alternative splicing generates messages encoding rat c-erbA proteins that do not bind thyroid hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5804-5805
26. Macchia PE, Takeuchi Y, Kawai T, Cua K, Gauthier K, Chassande O, Seo H, Hayashi Y, Samarut J, Murata Y, Weiss RE, Refetoff S 2001 Increased sensitivity to thyroid hormone in mice with complete deficiency of thyroid hormone receptor alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 98:349-354

27. **Chassande O, Fraichard A, Gauthier K, Flamant F, Legrand C, Savatier P, Laudet V, Samarut J** 1997 Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the c-erb-Aa locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor- α and triiodothyronine receptor activities. *Mol. Endocrinol.* 11:1278-1290
28. **Williams GR** 2000 Cloning and Characterization of Two Novel Thyroid Hormone Receptor beta Isoforms. *Mol. Cell. Biol.* 20:8329-8342
29. **Gauthier K, Plateroti M, Harvey CB, Williams GR, Weiss RE, Refetoff S, Willott JF, Sundin V, Roux J-P, Malaval L, Hara M, Samarut J, Chassande O** 2001 Genetic analysis reveals different functions for the products of the thyroid hormone receptor alpha locus. *Mol. Cell. Biol.* 21:4748-4760
30. **Gauthier K, Chassande O, Platerotti M, Roux J-P, Legrand C, Rousset B, Weiss R, Trouillas J, Samarut J** 1999 Different functions for the thyroid hormone receptors TR α and TR β in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *EMBO J.* 18:623-631
31. **Gøthe S, Wang Z, Ng L, Kindblom JM, Campos Barros A, Ohlsson C, Vennstrøm B, Forrest D** 1999 Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes & Dev.* 13:1329-1341
32. **Adams M, Matthews C, Collingwood TN, Tone Y, Beck-Peccoz P, Chatterjee KK** 1994 Genetic analysis of 29 kindreds with generalized and pituitary resistance to thyroid hormone: identification of thirteen novel mutations in the thyroid hormone receptor β gene. *J. Clin. Invest.* 94:506-515
33. **Collingwood TN, Wagner R, Matthews CH, Clifton-Bligh RJ, Mark G, Rajanayagam O, Agostini M, Fletterick RJ, Beck-Peccoz P, Reinhardt W, Binder G, Ranke MB, Hermus A, Hesch RD, Lazarus J, Paul N, Parfitt V, Ragatt P, de Zegher F, Chatterjee VKK** 1998 A role for helix 3 of the TR β ligand-binding domain in coactivator recruitment identified by characterization of a third cluster of mutations in resistance to thyroid hormone. *Embo J.* 17:4760-4770
34. **Hayashi Y, Weiss RE, Sarne DH, Yen PM, Sunthornthepvarakul T, Marcocci C, Chin WW, Refetoff S** 1995 Do clinical manifestations of resistance to thyroid hormone correlate with the functional alteration of the corresponding mutant thyroid hormone- β receptors? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80:3246-3256
35. **Yoh SM, Chatterjee VKK, Privalsky ML** 1997 Thyroid hormone resistance syndrome manifests as an aberrant interaction between mutant T $_3$ receptor and transcriptional corepressor. *Mol. Endocrinol.* 11:470-480
36. **Gottlieb B, Lehvaslaiho H, Beitel LK, Lumbroso R, Pinsky L, Trifiro M** 1998 The Androgen Receptor Gene Mutations Database. *Nucleic. Acids. Res.* 26:234-8
37. **Ando S, Sarlis NJ, Oldfield EH, Yen PM** 2001 Somatic mutation of TRbeta can cause a defect in negative regulation of TSH in a TSH-secreting pituitary tumor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86:5572-5576
38. **Ono S, Schwartz ID, Mueller OT, Root AW, Usala SJ, Bercu BB** 1991 Homozygosity for a „dominant negative“ thyroid hormone receptor gene responsible for generalized resistance to thyroid hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 73:990-994
39. **Persani L, Asteria C, Tonacchera M, Vitti P, Chatterjee VKK, Beck-Peccoz P** 1994 Evidence for secretion of thyrotropin with enhanced bioactivity in syndromes of thyroid hormone resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78:1034-1039
40. **Hayashi Y, Sunthornthepvarakul T, Refetoff S** 1994 Mutations of CpG dinucleotides located in the triiodothyronine (T $_3$)-binding domain of the thyroid hormone receptor (TR) β gene that appears to be devoid of natural mutations may not be detected because they are unlikely to produce the clinical phenotype of resistance to thyroid hormone. *J. Clin. Invest.* 94:607-615
41. **Yagi H, Pohlenz J, Hayashi Y, Sakurai A, Refetoff S** 1997 Resistance to thyroid hormone caused by two mutant thyroid hormone receptor β , R243Q and R243W, with marked impairment of function that cannot be explained by altered in-vitro 3,5,3'-triiodothyronine binding affinity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82:1608-1614
42. **Safer JD, Cohen RN, Hollenberg AN, Wondisford FE** 1998 Defective release of corepressor by hinge mutants of the thyroid hormone receptor found in patients with resistance to thyroid hormone. *J. Biol. Chem.* 273:30175-30182
43. **Clifton-Bligh RJ, de Zegher F, Wagner RL, Collingwood TN, François I, Van Helvoirt M, Fletterick RJ, Chatterjee VKK** 1998 A novel mutation (R383H) in resistance to thyroid hormone syndrome predominantly impairs corepressor release and negative transcriptional regulation. *Mol. Endocrinol.* 12:609-621
44. **Kurokawa R, DiRenzo J, Boehm M, Sugarman J, Gloss B, Rosenfeld MG, Heyman RA, Glass CK** 1994 Regulation of retinoid signaling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding. *Nature (Lond)* 371:528-531
45. **Flamant F, Samarut J** 2003 Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends Endocrinol. Metab.* 14:85-90
46. **Jones I, Srinivas M, Ng L, Forrest D** 2003 The thyroid hormone receptor beta gene: structure and functions in the brain and sensory systems. *Thyroid* 13:1057-1068
47. **Suzuki H, Willingham MC, Cheng SY** 2002 Mice with a mutation in the thyroid hormone receptor Beta gene spontaneously develop thyroid carcinoma: a mouse model of thyroid carcinogenesis. *Thyroid* 12:963-969
48. **Kaneshige M, Suzuki H, Kaneshige K, Cheng J, Wimbrow H, Barlow C, Willingham MC, Cheng S-y** 2001 A targeted dominant negative mutation of the thyroid hormone alpha 1 receptor causes increased mortality, infertility, and dwarfism in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 98:15095-15100
49. **Tinnikov A, Nordstrom K, Thoren P, Kindblom JM, Malin S, Rozell B, Adams M, Rajanayagam O, Pettersson S, Ohlsson C, Chatterjee K, Vennstrom B** 2002 Retardation of post-natal development caused by a negatively acting thyroid hormone receptor alpha1. *Embo. J.* 21:5079-5087
50. **Liu YY, Schultz JJ, Brent GA** 2003 A thyroid hormone receptor alpha gene mutation (P398H) is associated with visceral adiposity and impaired catecholamine-stimulated lipolysis in mice. *J. Biol. Chem.* 278:38913-38920

51. **Flamant F, Poguet AL, Plateroti M, Chassande O, Gauthier K, Streichenberger N, Mansouri A, Samarut J** 2002 Congenital Hypothyroid Pax8(-/-) Mutant Mice Can Be Rescued by Inactivating the TRalpha Gene. *Mol. Endocrinol.* 16:24-32
52. **Morte B, Manzano J, Scanlan T, Vennstrom B, Bernal J** 2002 Deletion of the thyroid hormone receptor alpha 1 prevents the structural alterations of the cerebellum induced by hypothyroidism. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 99:3985-3989
53. **Weiss RE, Xu J, Ning G, Pohlenz J, O'Malley BW, Refetoff S** 1999 Mice deficient in the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) are resistant to thyroid hormone. *EMBO J.* 18:1900-1904
54. **Brown NS, Smart A, Sharma V, Brinkmeier ML, Greenlee L, Camper SA, Jensen DR, Eckel RoH, Krezel W, Chambon P, Haugen BR** 2000 Thyroid hormone resistance and increased metabolic rate in the RXR- γ deficient mouse. *J. Clin. Invest.* 106:73-79
55. **Wu SY, Cohen RN, Simsek E, Senses DA, Yar NE, Grasberger H, Noel J, Refetoff S, Weiss RE** 2006 A novel thyroid Hormone receptor-beta mutation that fails to bind nuclear receptor corepressor in a patient as an apparent cause of severe, predominantly pituitary resistance to thyroid hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 91:1887-95
56. **Anselmo J, Cao D, Karrison T, Weiss RE, Refetoff S** 2004 Fetal loss associated with excess thyroid hormone exposure. *Jama* 292:691-695
57. **Weiss RE, Refetoff S** 1999 Editorial: Treatment of resistance to thyroid hormone-primus non nocere. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84:401-404
58. **Anselmo J, Refetoff S** 2004 Regression of a large goiter in a patient with resistance to thyroid hormone by every other day treatment with triiodothyronine. *Thyroid* 14:71-4
59. **Ekins R** 1992 The free hormone hypothesis and measurement of free hormones. *Clin. Chem.* 38:1289-1293
Hennemann G, Docter R, Friesema EC, de Jong M, Krenning EP,
60. **Visser TJ** 2001 Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocr. Rev.* 22:451-476
61. **Allan W, Herndon CN, Dudley FC** 1944 Some examples of the inheritance of mental deficiency: apparently sex-linked idiocy and microcephaly. *Am J Ment Defic* 48:325-334
62. **Schwartz CE, Ulmer J, Brown A, Pancoast I, Goodman HO, Stevenson RE** 1990 Allan-Herndon syndrome. II. Linkage to DNA markers in Xq21. *Am J Hum Genet* 47:454-8
63. **Schwartz CE, May MM, Carpenter NJ, Rogers RC, Martin J, Bialer MG, Ward J, Sanabria J, Marsa S, Lewis JA, Echeverri R, Lubs HA, Voeller K, Simensen RJ, Stevenson RE** 2005 Allan-Herndon-Dudley Syndrome and the Monocarboxylate Transporter 8 (MCT8) Gene. *Am J Hum Genet* 77:41-53
64. **Lafreniere RG, Carrel L, Willard HF** 1994 A novel transmembrane transporter encoded by the XPCT gene in Xq13.2. *Hum. Mol. Genet.* 3:1133-1139
65. **Halestrap AP, Meredith D** 2004 The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *PLoS Arch* 447:619-28
66. **Friesema EC, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ** 2003 Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J. Biol. Chem.* 278:40128-35
67. **Kakinuma H, Itoh M, Takahashi H** 2005 A novel mutation in the monocarboxylate transporter 8 gene in a boy with putamen lesions and low free T4 levels in cerebrospinal fluid. *J Pediatr* 147:552-4
68. **Friesema EC, Jansen J, Heuer H, Trajkovic M, Bauer K, Visser TJ** 2006 Mechanisms of Disease: psychomotor retardation and high T3 levels caused by mutations in monocarboxylate transporter 8. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2:512-23
69. **Brockmann K, Dumitrescu AM, Best TT, Hanefeld F, Refetoff S** 2005 X-linked paroxysmal dyskinesia and severe global retardation caused by defective MCT8 gene. *J Neurol* 252:663-666
70. **Herzovich V, Vaiani E, Marino R, Dratler G, Lazati JM, Tilitzky S, Ramirez P, Iorcansky S, Rivarola MA, Belgorosky A** 2006 Unexpected Peripheral Markers of Thyroid Function in a Patient with a Novel Mutation of the MCT8 Thyroid Hormone Transporter Gene. *Horm Res* 67:1-6
71. **Maranduba CM, Friesema EC, Kok F, Kester MH, Jansen J, Sertie AL, Passos Bueno MR, Visser TJ** 2006 Decreased cellular T3 uptake and metabolism in Allan-Herndon-Dudley syndrome(AHDS) due to a novel mutation in the MCT8 thyroid hormone transporter. *J Med Genet* 43:457- 60
72. **Holden KR, Zuniga OF, May MM, Su H, Molinero MR, Rogers RC, Schwartz CE** 2005 X-linked MCT8 gene mutations: characterization of the pediatric neurologic phenotype. *J Child Neurol* 20:852-7
73. **Dumitrescu A, Liao X-H, Lado-Abel J, Moeller L, Brockmann K, Refetoff S** 2004 (abstract) On the mechanism producing the unusual thyroid phenotype in defects of the MCT8 gene. *Thyroid* 14:761
74. **Trajkovic M, Visser TJ, Mittag J, Horn S, Lukas J, Darras VM, Raivich G, Bauer K, Heuer H** 2007 Abnormal thyroid hormone metabolism in mice lacking the monocarboxylate transporter 8. *J Clin Invest* 117:627-635
75. **Bernal J** 2006 Role of Monocarboxylate Anion Transporter 8 (MCT8) in Thyroid Hormone Transport: Answers from Mice. *Endocrinology* 147:4034-5
76. **Koenig RJ** 2005 Regulation of type 1 iodothyronine deiodinase in health and disease. *Thyroid* 15:835-40
77. **Lescure A, Allmang C, Yamada K, Carbon P, Krol A** 2002 cDNA cloning, expression pattern and RNA binding analysis of human selenocysteine insertion sequence (SECIS) binding protein 2. *Gene* 291:279-85
78. **Copeland PR** 2003 Regulation of gene expression by stop codon recoding: selenocysteine. *Gene* 312:17-25
79. **Köhrle J** 2005 Selenium and the control of thyroid hormone metabolism. *Thyroid* 15:841-53
80. **Schneider MJ, Fiering SN, Pallud SE, Parlow AF, St Germain DL, Galton VA** 2001 Targeted Disruption of the Type 2 Selenodeiodinase Gene (DIO2) Results in a Phenotype of Pituitary Resistance to T(4). *Mol. Endocrinol.* 15:2137-48.
81. **Bosl MR, Takaku K, Oshima M, Nishimura S, Taketo MM** 1997 Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (Trsp). *Proc Natl Acad Sci (USA)* 94:5531-4

82. **Schneider MJ, Fiering SN, Thai B, Wu SY, St Germain E, Parlow AF, St Germain DL, Galton VA** 2006 Targeted disruption of the type 1 selenodeiodinase gene (dio1) results in marked changes in thyroid hormone economy in mice. *Endocrinology* 147:580-9
83. **Hernandez A, Martinez ME, Fiering S, Galton VA, St Germain D** 2006 Type 3 deiodinase is critical for the maturation and function of the thyroid axis. *J Clin Invest* 116:476-84
84. **Maia AL, Berry MJ, Sabbag R, Harney JW, Larsen PR** 1995 Structural and functional differences in the dio1 gene in mice with inherited type 1 deiodinase deficiency. *Mol Endocrinol* 9:969-80
85. **Ng L, Goodyear RJ, Woods CA, Schneider MJ, Diamond E, Richardson GP, Kelley MW, Germain DL, Galton VA, Forrest D** 2004 Hearing loss and retarded cochlear development in mice lacking type 2 iodothyronine deiodinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3474-9
86. **Carlson BA, Xu XM, Gladyshev VN, Hatfield DL** 2005 Selective rescue of selenoprotein expression in mice lacking a highly specialized methyl group in selenocysteine tRNA. *J Biol Chem* 280:5542-8
87. **Chu FF, Esworthy RS, Chu PG, Longmate JA, Huycke MM, Wilczynski S, Doroshov JH** 2004 Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes. *Cancer Res* 64:962-8
88. **Brucker-Davis F, Skarulis MC, Grace MB, Benichou J, Hauser P, Wiggs E, Weintraub BD** 1995 Genetic and clinical features of 42 kindreds with resistance to thyroid hormone. The National Institutes of Health prospective study. *Ann. Intern. Med.* 123:573-583
89. **Feng W, Ribeiro RCJ, Wagner RL, Nguyen H, Apriletti JW, Fletterick RJ, Baxter JD, Kushner PJ, West BL** 1998 Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science* 280:1747-1749
90. **Chen JD, Evans RM** 1995 A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377:454-457
91. **Hörlein AJ, Nggr AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Südersrtüm M, Glass CK, Rosenfeld MG** 1995 Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377:397-404
92. **Busch K, Martin B, Baniahmad A, Renkawitz R, Müller M** 1997 At least three subdomains of v-erbA are involved in its silencing function. *Mol. Endocrinol.* 11:379-389
93. **Forman BM, Samuels HH** 1990 Interactions among a subfamily of nuclear hormone receptors: the regulatory zipper model. *Mol. Endocrinol.* 4:1293-1301
94. **Kurokawa R, Yu VC, Naar A, Kyakumoto S, Han Z, Silverman S, Rosenfeld MG, Glass CK** 1993 Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers. *Genes Develop.* 7:1423-1435
95. **Au-Fliegner M, Helmer E, Casanova J, Raaka BM, Samuels HT** 1993 The conserved ninth C-terminal heptad in thyroid hormone and retinoic acid receptors mediates diverse responses by affecting heterodimer but not homodimer formation. *Mol. Cel. Endocrinol.* 13:5725-5737
96. **Beck-Peccoz P, Chatterjee VKK, Chin WW, DeGroot LJ, Jameson JL, Nakamura H, Refetoff S, Usala SJ, Weintraub BD** 1993 Nomenclature of thyroid hormone receptor β -gene mutations in resistance to thyroid hormone: Consensus statement from the first workshop on thyroid hormone resistance, July 10-11, 1993, Cambridge, United Kingdom. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78:990-993
97. **Tone Y, Collingwood TN, Adams M, Chatterjee VK** 1994 Functional analysis of a transactivation domain in the thyroid hormone β receptor. *J. Biol. Chem.* 269:31157-31161
98. **Baniahmad A, Leng X, Burris TP, Tsai SY, Tsai M-J, O'Malley BW** 1995 The t4 activation domain of the thyroid hormone receptor is required for release of a putative corepressor(s) necessary for transcriptional silencing. *Mol. Cell. Biol.* 15:76-86
99. **Hamy F, Helbeque NJ, Henichart P** 1992 Comparison between synthetic nuclear localisation signal peptides from the steroid thyroid hormone receptor superfamily. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183:289-293
100. **Wurtz J-M, Bourguet W, Renaud J-P, Vivat V, Chambon P, Moras D** 1996 A canonical structure for the ligand-binding domain of the nuclear receptors. *Nature Struct. Biol.* 3:87-94

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Prof. Samuel Refetoff
Departments of Medicine University of
Chicago, Illinois 60637-1470

e-mail refetoff@ucicago.edu

Грелин – роля в регулация на телесното тегло, метаболитни и репродуктивни нарушения

Мария Орбецова¹, Митко Митков¹, Благовест Пехливанов²

¹ Клиника по Ендокринология и болести на обмяната; ² Катедра по Акушерство и гинекология,

Медицински Университет, Пловдив

Ghrelin – Role in the Regulation of Body Weight, Metabolic and Reproductive Disturbances

Maria Orbetzova¹, Mitko Mitkov¹, Blagovest Pehlivanov²

¹ Clinic of Endocrinology and metabolic diseases; ² Clinic of Obstetrics and gynaecology, Plovdiv Medical University

Резюме

Грелинът притежава мощни орекси-генни, адипогенни и соматотропни свойства, водещи до увеличаване приема на храна и телесното тегло. Секретиран предимно от стомаха, грелинът представлява естествен лиганд на рецептора на секретазозите на растежния хормон (GHS-R) и изпълва критериите за мозъчно-чревен пептид. Оста мозък-чревен тракт се явява ефектор на анаболните процеси чрез регулиране на растежа, храненето и метаболизма посредством вагално аферентно медиране на сигналните пътища на грелина. Обаче, широкото тъканно разпространение на грелина и рецепторите му предполага и допълнителни функции. Регица

Abstract

Ghrelin has profound orexigenic, adipogenic, and somatotropic properties, increasing food intake and body weight. Secreted predominantly from the stomach, ghrelin is the natural ligand for the growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) in the pituitary gland, thus fulfilling the criteria of a brain-gut peptide. The brain-gut axis is the effector of anabolism by regulating growth, feeding, and metabolism via vagal afferent mediating ghrelin signaling. However, the wide tissue distribution of ghrelin suggests that it may have other functions as well. Several studies propose that ghrelin could have an important function in glucose homeostasis and insulin release, independent of GH secretion. Low plasma ghrelin levels are associated

проучвания показват, че грелинът играе важна роля в регулиране на глюкозната хомеостаза и освобождаването на инсулин, независимо от секрецията на растежния хормон. По-ниските плазмени нива на грелина се асоциират с повишаване на базалния инсулин и наличието на инсулинова резистентност, което предполага, че този пептид играе и физиологична, и патофизиологична роли във въглехидратния метаболизъм. Проучванията от последните години откриват аномалии на грелиновата регулация при синдром на поликистозни яйчници (PCOS), които не са присъщи само на наличните при това заболяване затлъстяване и инсулиновата резистентност. Механизмите, които лежат в основата на тази нарушена регулация и ролята на грелина в репродуктивните процеси подлежат на по-нататъшно изясняване.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: грелин – синдром на поликистозни яйчници – телесно тегло – инсулинова резистентност – въглехидратен метаболизъм

Структура и функция на грелина (общи сведения)

Грелинът е орексигенен фактор, който се секретира предимно от ендокринните клетки на стомаха (60-70%), но също така от дуоденума, илеума, цекума и колона (1). В много малки количества се синтезира и в редица други тъкани – различни зони на мозъка (хипоталамус, хипокампус, кора на главния мозък), хипофизна жлеза, надбъбречни жлези, панкреас, кости, бъбреци, бели дробове, плацентата (1, 2). Представлява 28-аминокиселинен пептид (молекулно тегло 3314) с ацилова странична верига – л-октаноева киселина, която е есенциална за ефектите му върху апетита (2). Произ-

with elevated fasting insulin levels and insulin resistance, suggesting both physiological and pathophysiological roles for ghrelin. Recent data also suggest an intrinsic abnormality of ghrelin regulation in PCOS not attributable to obesity or insulin resistance alone. The mechanisms linking abnormal ghrelin regulation with PCOS and reproductive disturbances should be a focus for future research.

KEY WORDS: ghrelin – polycystic ovary syndrome – weigh control – insulin resistance – carbohydrate metabolism

хожда от про-пептид, съдържащ 117 аминокиселинни остатъка, наречен препрогрелин (2). Грелинът е първият открит естествен хормон, при който сериновият остатък на позиция 3 (Ser3) е естерифициран с н-октаноева киселина, рядка посттрандукционна модификация, водеща до повишаване липофилността на молекулата. Представлява ендогенен агонист на рецептора на секретозите на растежния хормон (GHS), който е единственият идентифициран до момента негов рецептор. GHS-R е G-протеин свързан рецептор, който се експресира във всички ядра на хипоталамуса, както и в други тъкани – стомах, чревен тракт, панкреас, бъбреци, мастна тъкан, сърце и бели дробове.

Различават се 2 типа рецептори – тип 1 α и 1 β , като вторият е неактивен (3).

Грелинът стимулира освобождаването на растежен хормон (GH) посредством въздействието си върху тип 1 α рецепторите в хипоталамуса (GHS-R1a) (2, 4, 5). От това му основно действие произхожда и наименованието ghrelin – „ghre“ е индоевропейски езиков корен, означаващ „растеж“.

Интересно е, че грелинът циркулира главно като des-octyl (des-octanoyl) грелин, т.е. без естерификация на Ser3 – форма на протеина, която няма ендокринни свойства и не може да стимулира GHS-R1a (2, 6). Ацилираният грелин (пог 10% от тоталния грелин в циркулацията) преминава през кръвно-мозъчната бариера в двете посоки посредством насищана транспортна система, изискваща наличието на уникалния октаноев остатък в молекулата му. Обратно, деацилираната форма преминава през кръвно-мозъчната бариера чрез пасивен механизъм без насищане и остава в централната нервна система (7). Чрез редица *in vitro* постановки с клетъчни линии и синтетични пептиди е доказано, че активната част от молекулата на грелина, отговорна за рецепторното активиране, е тетрапептидът Gly-Ser-Ser(n-octanoyl)-Phe, а C-терминалната част на молекулата играе ключова роля в детерминиране биоктивната конформация на грелина (8).

Връзка на грелина с приема на храна и телесното тегло

Въз основа на факта, че се произвежда главно в стомаха, а основните му залавни места са в зоните на хипоталамуса, грелинът изглежда представлява важен ендокринен сигнал, свързващ периферните механизми, долавящи калорийния внос, с мозъчните центрове, контролиращи енергийната хомеостаза (9). Грелинът притежава и локално действие, свързано с координиране мотилитета на стомаха и дуоденума (10). При хора с фиксиран хранителен прием нивата на грелина в циркулацията са ви-

соки на гладно, бързо спадат след нахранване (11-13) и изглежда се регулират както от калорийния внос, така и от циркулиращи хранителни сигнали, както е инсулинът (14, 15). При слаби индивиди плазмената концентрация на грелин прогресивно нараства при гладуване и достига най-ниска стойност за 1 час след нахранване, точно обратното на динамиката на инсулина (12). Нивата на грелина спадат след прием на храна или глюкоза, но не и след прием на вода, което показва, че разтягането на стомаха не е регулиращият фактор (14). Инсулин-индуцираната хипогликемия осъществява „ир“-регулация на експресията на uPK в стомаха при плъховете (16).

Продукцията на грелин в стомаха е локализирана в А (α)-подобни клетки, които не показват имунореактивност към глюкагона, но имат сходни морфологични характеристики с панкреасните α -клетки, напр. наличие на компактни и плътни секреторни гранули (1). Този факт в светлината на горепосочените данни предполага, че съществува система от грелин продуциращи клетки, които реагират на плазмените концентрации на глюкоза. Молекулните сигнали, регулиращи секрецията на грелин са в процес на изучаване. Натоваването с глюкоза и приемът на храна водят до бързо спадане на грелина в плазмата, което предполага, че последният отразява моментната промяна в хранителния статус на индивида и се явява индикатор на краткотрайния енергиен баланс.

Прилагането на грелин централно или периферно у експериментални животни води до повишаване на апетита и нарастване на теглото, а при хора въвеждането му в системната циркулация също има за резултат повишен апетит (14, 17-19). Механизмите на действие на грелина, свързани с регулацията на апетита, не са докрай изяснени. Мощният му орексигенен ефект отчасти се медира от активирането на NPY- (невронен пептид Y) и AgPR- (Agouti gene-related protein – протеин, свързан с „агути“ гена) съдържащите неврони в хипоталамичния nucleus arcuatus (14, 20, 21). Nucleus

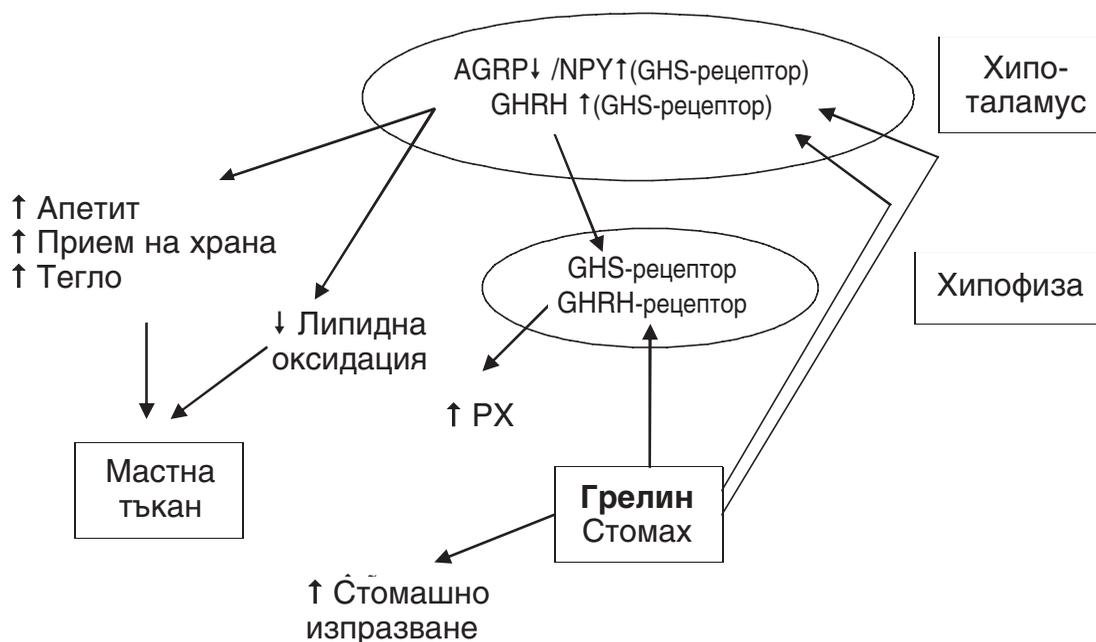
arcuatus е основното хипоталамично ядро, регулиращо приема на храна и телесното тегло чрез наличието на неврони, съдържащи орексигенни пептиди (NPY и AGRP) и анорексигенни пептиди – POMC (про-опиомеланокортин) и CART (кокаин амфетамин-регулиран транскрипт). В подкрепа на горното становище е намерено, че при плъхове и краткотрайното, и по-продължителното лечение с грелин води до покачване на хипоталамичните нива на uPHK на NPY и AGRP (22). В допълнение, ефектите на грелина могат да бъдат антагонизирани от паралелно прилагане на антагонисти на AGRP или антагонисти на Y1 и Y5 рецепторите на NPY (17), както и от деструкция на nucleus arcuatus (23).

Грелинът е включен в координацията на приема и усвояването на храната чрез ефектите си върху продукцията на растежен хормон (РХ) (23). От своя страна РХ

стимулира чернодробната продукция на IGF-1, който играе централна роля в регулацията на въглехидратната и липидната обмяна, както и в растежа на мускулите и костите (10). Намерено е, че грелинът стимулира GHRH (рилизинг хормон на растежния хормон)-съдържащите неврони в nucleus arcuatus посредством наличните там GHS рецептори (25), но не е известно дали повлиява освобождаването на соматостатин. Обсъждат се и директни въздействия върху аденохипофизата със стимулиране на соматрофите и противоействие на соматостатина (10). Повишаването на апетита се последва от покачване на теглото, обаче последното не е в зависимост от нарастване на мускулната маса или органно разрастване, които са типичните ефекти на РХ, а е резултат от повишена адипогенеза и намалена мастна обмяна (26, 27) (Фиг.1).

Метаболитни ефекти

Ендокринни ефекти



Фигура 1. Схема на механизмите на действие на грелин (адаптирано по 27).
Figure 1. Scheme of the mechanisms of ghrelin actions (adapted from 27).

В обобщение на натрупващите се до момента данни при хора, циркулиращият грелин е в обратна зависимост от телесното тегло, количеството мастна тъкан, обема на адипоцитите и плазмените нива на лептина и инсулина (8). Възможно е в такъв случай повишената или намалена секреция на грелин да има за роля компенсирание на нарушената метаболитна регулация при патологични промени в теглото. Секрецията му може да се разглежда като отговор на организма за подготовка на метаболитните процеси да посрещнат наличния калориен внос. В периоди на гладуване и недохранване повишените грелинови нива ще направят организма енергийно по-продуктивен (т.е. ще се повиши апетитът, респ. приемът на храна и хранителните вещества ще се складират като мазнини) и, обратно, в периоди на изобилие, когато теглото се покачва, ниските грелинови нива (т.е. релативният дефицит на грелин) ще доведе до потискане на апетита, респ. намаляване на храненето и по-малко отлагане на мазнини (14, 28). Така, грелинът е включен и в двата края на везните на енергийния баланс – при натрупване на енергия чрез активната си наличност (повишени нива), което кара хората да почувстват глад и прави организма им енергийно по-продуктивен, и при загуба на енергия, когато нивата му спадат в периоди на калориен излишък, което предпазва от по-нататъшно натрупване на енергия и прави организма по-малко енергийно продуктивен (27).

Плазмените концентрации на грелин са намерени по-високи при пациенти с анорексия нервоза и по-ниски при пациенти със затлъстяване в сравнение с контроли с нормално тегло (28, 29), които наблюдават подкрепят хипотезата, че грелинът може да бъде «пусковия механизъм» за отключване процеса на хранене и да играе роля в патогенезата на затлъстяването при хора (13, 30). Анорексия нервоза е асоциирана в повишени нива на РХ и ниски нива на IGF-1, което подсказва хранително придобито потискане на действието на РХ или

РХ резистентност. Въпреки че грелинът е повишен при пациентите с анорексия нервоза, не се намира взаимовръзка между нивата му и тези на РХ (31, 32).

Нарастването на плазмените грелинови нива след редукция на тегло посредством диетолечение, намерено от Cummings и сътр. (33) също подкрепя хипотезата, че грелинът играе роля за дълготрайната регулация на теглото. Стомашният байпас се асоциира с подчертано по-ниски грелинови нива в сравнение с тези при контроли с нормално тегло и със затлъстяване, което вероятно допринася за редуциращия теглото ефект на тази процедура (33). Хроничната консумация на фруктоза повишава статистически значимо плазмените нива на грелин при експерименталната постановка с плъхове и в проучванията при хора, на което може да се дължи пониженото чувство на ситост и повишената консумация на храна (34). Храните с нисък гликемичен индекс потискат нивата на грелина и способстват за понижаване на апетита и редукция на тегло.

Експресията на uРНК на грелин във фундуса на стомаха при миши db/db модел с диабет и обезитет е „down“-регулирана в сравнение с контроли (19), което също сочи, че промените в грелиновата експресия са физиологична адаптация. Напоследък се обсъждат възможни мутации в гена на грелина, които да обяснят нарушената регулация на телесното тегло при затлъстяване у бозайници, както подсказва намерената връзка между мутации в гена на препрогрелин/грелин и появата на затлъстяване (30).

Връзка на грелина с обменните процеси

Съществуващите до момента данни от усиленото изучаване ролята на грелина в обменните процеси показват недвусмислена връзка с контрола на глюкозната хомеостаза и β -клетъчната функция. Краткотрайните ефекти на екзогенен грелин

индуцират хипергликемия и хипоинсулинизм при здрави лица и опитни гризачи по независим от RX механизъм на действие (35). Обратно, грелин-рецепторни антагонисти могат да подобрят глюкозния толеранс при плъхове без да водят до повишаване на телното вследствие повишаване на инсулиновата секреция (36). Много от проучванията при пациенти с диабет тип 1 показват ниски нива на грелина, вероятно като проява на компенсаторен механизъм срещу хипергликемията (36).

Въпреки че данните от продължително прилагане на грелин не са достатъчно изяснени, изглежда е налице тенденция за повишаване и на плазмената глюкоза, и на инсулина, което говори за влошаване на инсулиновата чувствителност (35). Данните от прилагане GHSR1a антагонисти предполагат, че тези съединения подобряват глюкозния толеранс и инсулиновата резистентност в дългосрочен план и могат да са многообещаваща терапевтична възможност за лечение на диабет тип 2.

Много проучвания показват, концентрациите на грелина корелират негативно с инсулиновите нива на гладно, наличието на диабет тип 2 и на инсулинова резистентност при хора, независимо от расата (28, 37). Инсулинът потиска грелина, независимо от промените на глюкозните концентрации (38). Broglio и сътр. намират, че и оралното, и венозното прилагане на инсулин потиска грелина, независимо, че те оказват противоположно действие върху нивата на глюкозата. Същите автори показват, че за протеин-индуцирано потискане на грелина е необходим орален път, венозното прилагане на аргинин не намалява грелина, независимо от повишаването на инсулина, което е интересен факт и има отношение към протеиновите диети (39). Състояния на тежка инсулинова резистентност, както при обезни индианци от племето Пима, са свързани с понижени плазмени нива на грелина на гладно (28).

В проучване на взаимовръзката между метаболитните параметри, грелина, леп-

тина и IGF-1 при кохорта от 1045 лица Ukkoла и сътр. намират, че ниските нива на грелин се асоциират с метаболитен синдром и захарен диабет тип 2 само при наличие на инсулинова и лептинова резистентност. При високи лептинови нива концентрацията на грелин спада линейно с увеличаване броя на компонентите на метаболитен синдром (40). При пациенти на хемодиализа нивата на грелина на гладно корелират негативно с наличието на метаболитен синдром, грелинът е с тенденция към спадане при нарастване броя на диагностичните критерии за метаболитен синдром, а обиколката на талията е независим предиктор за нивата му (41).

При пациенти с метаболитен синдром и ниски нива на грелин, интраартериално прилагане на грелин бързо подобрява ендотелната дисфункция. Подобно на инсулина, грелинът бързо стимулира повишена продукция на азотен оксид (NO) в култури от аортни ендотелни клетки на вол по дозо- и време-зависим начин. Намерено е, че грелин-индуцираната продукция на NO в човешки аортни ендотелни клетки се блокира от предварителното им третиране с инхибитор на NO-синтазата, инхибитор на фосфатидил инозитол (PI 3)-киназата, селективен антагонист на GHSR-1a или „изключване“ на тези рецептори. От друга страна, грелинът стимулира засилена фосфорилиране на Akt (Ser473) и ендотелната NO-синтаза в човешки аортни ендотелни клетки, както и фосфорилирането на митоген-активираната протеин (MAP) киназа, но не и MAP-киназа-зависимата продукция на вазоконстриктора ендотелин-1 във волски аортни ендотелни клетки. От тези данни се стига до извода, че грелинът притежава характерни бързи съдови действия, изразяващи се в стимулирана продукция на NO в ендотела чрез сигнални пътища, включващи GHSR-1a, PI 3-киназата, Akt и ендотелната NO-синтаза, което може да се вземе в предвид в разработване на иновативни терапевтични стратегии по отношение на ендотелната

гисфункция при диабет и инсулинова резистентност (42).

Vlasova и сътр. намират, че периферното инжектиране на антагонист на грелина при експериментални животни (плъхове) повишава артериалното налягане и пулсовата честота, поне отчасти посредством активиране на симпатиковата нервна система (43). Тези резултати повишават вниманието върху евентуални сърдечно-съдови странични ефекти при прилагането на грелинови антагонисти като терапевтична стратегия за намаляване приема на храна, особено при рискови за ССЗ индивиди (напр. пациенти с метаболитен синдром).

Роля на грелина при репродуктивните процеси и PCOS

Експериментални постановки при плъховете показват, че грелинът участва в регулацията на хипоталамо-хипофизо-овариалната ос на различни нива. Прилагането му по централен път у женски плъхове води до потискане секрецията на LH в различни стадии на еструса (44). Грелинът инхибира също секрецията на GnRH (гонадотропин рилийзинг хормон) от хипоталамус в *in vitro* постановки (44). На ниво хипофиза грелинът оказва или стимулиращи, или потискащи въздействия върху базалната секреция на LH в зависимост от стадия на менструалния цикъл. Обаче, GnRH-стимулираното LH освобождаване *in vitro* се инхибира от грелина, независимо от стероидната среда (45).

Все още малко се знае за ефектите на грелина върху репродуктивните процеси. Установени са по-високи нива при ановулаторни жени с анорексия нервоза и аменорея, индуцирана от ексцесивни физически натоварвания, както и при жени с хипоталамична аменорея (46-48). При жени с нормално тегло и аменорея високите нива на грелин пък са свързани с нарушени хранителни навици и режим (49). Не е изяснено дали нарушенията в секрецията на грелина

участват директно в невроендокринната регулация на оста хипоталамус-хипофиза-яйчник, или последните се явяват маркер на самия метаболитен статус. При резултатите потвърждаването на инхибиторен ефект на грелина върху системата GnRH-LH предполага, че при примати е налице централен регулаторен ефект на грелина върху репродуктивните процеси (50).

PCOS е най-честото ендокринно нарушение при жените в репродуктивна възраст и основна причина за стерилитет, което според съвременните концепции се приема като полово-специфичен прототип на метаболитен синдром. Поради преградоположеността на жените, носителки на синдрома, към затлъстяване, инсулинова резистентност, отклонения в обмяната на въглехидратите и мазнините в съчетание с нарушения в овулацията, т.е. процеси, при които е доказано съучастие на грелина, е оправдан интересът към изследване на нивата му при това заболяване.

Все още, обаче, няма единно становище, дали при PCOS са налице промени в нивата на апетито-регулирущите хормони, както е грелинът. Нивата му на гладно са намерени понижени в повечето (51-55), но не във всички проучвания (56, 57). Така, за първи път Pagotto и сътр. през 2002 г. (51) показват, че нивата на грелин при обезни жени с PCOS са по-ниски в сравнение със сходни по тегло здрави контроли. Грелинът е в обратна зависимост с маркерите на инсулинова резистентност. Тези корелации се запазват и след подобрение на инсулиновата чувствителност чрез лечение с хипокалорийна диета и метформин (или плацебо). Въпреки че при болшинството пациентки е постигната значима загуба на тегло, повечето от тях все още са със затлъстяване. И в двете групи редукцията на тегло води до много малки промени в плазмените грелинови нива. Интересна е намерената отрицателна корелация между грелина и андростендиона, но не и с тестостерона и другите андрогени (51).

Schofl и сътр. потвърждават по-ниски нива на грелина при PCOS, които показват високостепенна корелация със степента на инсулинова резистентност (52). След лечение с метформин при инсулин-резистентните жени нивата на грелина се покачват. При инсулин-чувствителните жени с PCOS, обаче, нивата на грелина остават съпоставими с тези при контролите. Нещо повече, авторите не намират корелация с индекса на телесна маса (BMI) (52), което предполага взаимовръзка между грелина и инсулиновата резистентност извън действията му върху контрола на апетита, респ. телесното тегло. Panidis и сътр. съобщават, че жени с PCOS и хиперандрогенемия имат сигнификантно по-ниски нива на грелина в сравнение със здрави контроли и носителки на синдрома с клинични белези на хиперандрогенизъм, но с нормални андрогенни нива. Грелиновите нива при последните са по-ниски от намерените при контролната група, но разликите не достигат сигнификантност. Авторите заключават, че PCOS-асоцираната хиперандрогенемия има за резултат редуцирани грелинови концентрации (58).

В подкрепа на връзката между заболяването и грелина са данните за повишаване нивата на последния при 3-месечно лечение с орален контрацептив, съдържащ етинил естрадиол и дроспиренон при жени с PCOS. Грелинът, по подобие и на други проучвания е в отрицателна корелация с BMI, съотношението талия:ханш, инсулина, НОМА-индекса и свободния тестостерон (59). Прилагането на грелин при жени с PCOS и с нормално тегло, и със затлъстяване води до повишаване нивата на глюкозата и понижаване тези на инсулина, което не се наблюдава при контролната група жени с нормално тегло според проучване на Fusco и сътр. (60), което е в подкрепа на взаимовръзка между грелина и хормоналните /метаболитните нарушения при заболяването.

Едно от проучванията, които не потвърждават промяна в нивата на грелина

при жени с PCOS е това на Origo и сътр. Авторите не намират корелация на грелина с нито един от хормоналните и биохимичните параметри (вкл. инсулин и маркери на инсулинова резистентност), а само с BMI (56). Тези данни са в подкрепа само на доказаната връзка между грелина и теглото и изключват влияние на самото заболяване. В известен смисъл тези наблюдения са сходни на проучването на Vik и сътр., които не намират сигнификантни разлики в нивата на грелина между група жени с PCOS с нормално тегло и здрави жени с нормално тегло, но грелинът е значимо по-нисък при здрави жени със затлъстяване в сравнение със слабите жени с PCOS (61).

Нарушена супресия на грелина след тест хранене с повишено чувство на глад и понижено чувство на ситост (според визуални аналогови скали) се описват при малка група обезни жени с PCOS дори след редукция на тегло (53), което е потвърдено и от неотдавнашно проучване, сравняващо слаби и обезни жени с PCOS и съответните им сходни по тегло контроли (62). Подробно изучаване на отговора на грелин и полипептид YY при орално натоварване с тест-хранене (527 ккал, разпределени по съдържание на 24,1% мазнини, 54,4% въглехидрати и 21,5% протеини) при жени с PCOS показват ниски базални нива на грелина и редуцирана супресия след нахранване, по-изразено при обезните в сравнение със слабите пациентки. Авторите не намират корелация на грелина с андрогените, но негативна такава се открива с НОМА-индекса (63). Жените с PCOS показват и силно супресирани отговор на невропептид Y спрямо инжектиране на грелин в сравнение с контроли, като отговорът се възстановява след лечение с метформин и сигнификантно понижение на инсулиновите нива. При тази експериментална постановка лептинът не търпи съществени промени. Явно, хиперинсулинемията е факторът, който повлиява нарушенията във взаимовръзката грелин-невропептид Y (64).

Ние намираме сигнификантно по-ниски нива на грелина при жени с PCOS в сравнение със здрави контроли ($21,78 \pm 2,12$ спрямо $34,67 \pm 3,57$ ng/ml; $p=0,04$), като грелинът е в обратна корелация с нивата на инсулина в същата степен, както и с маркерите на инсулинова резистентност. Негативна корелация се наблюдава и с BMI, обиколката на талията и съотношението талия:ханш, което е в подкрепа на повечето проучвания до момента. Нещо повече, отрицателната корелация, която се открива между грелина и тестостерона ($r = -0,315$; $p < 0,05$) и между грелина и лептина ($r = -0,306$; $p < 0,05$) изчезва след изключване влиянието на BMI, съотношението талия:ханш и НОМА-индекса (65). При сравняване на грелина между инсулин резистентни жени с PCOS и жени със захарен диабет тип 2 с по-висока по степен инсулинова резистентност нивата му се оказват сигнификантно по ниски при носителките на синдрома спрямо диабетичките (66). Въз основа на нашите данни считаме, че грелиновите нива при жените с PCOS отразяват специфични за синдрома метаболитни и хормонални нарушения.

Това, че промените в грелиновата секреция са присъщи на самото заболяване се потвърждава и от най-ново проучване на Panidis и сътр., които демонстрират, че съотношението активен (ацилиран): тотален грелин е намалено при жени с PCOS и нормално тегло, като отклоненията СА най-силно изразени при по-тежките форми на синдрома, включващи всички критерии: хиперандрогения, хронична ановулация и морфологично поликистозни яйчници (67). Въз основа на доказаните промени при жени с PCOS с различна фенотипна изява, някои автори дори предлагат грелинът да бъде използван като предиктивен маркер на заболяването и намират при плот-анализ чувствителност 70% и специфичност 86% с прагова стойност при ROC кривата $34,1$ ng/ml, под което ниво на грелина заболяването е вероятно, а при ниво под 9 ng/ml – с много висока степен на вероятност (68).

В заключение, вероятно при PCOS е налице аномалия в регулацията на грелина, която не се дължи само на наднорменото тегло и инсулиновата резистентност. Механизмите, които свързват абнормната регулация на грелина при заболяването, предстои да бъдат изяснявани. Могат да се имат в предвид независимите ефекти на грелина върху хипоталамо-хипофизо-гонадната ос с инхибиторен ефект върху LH-секрецията и намален отговор на LH към GnRH, което се наблюдава при синдрома.

КНИГОПИС/REFERENCES

1. Date Y, M Kojima, H Hosoda, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000a; 141: 4255-4261.
2. Kojima K, H Hosoda, Y Date, et al. Ghrelin is a novel growth-hormone releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-660.
3. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* 2005; 85: 495-522.

4. **Date Y, N Murakami, M Kojima, et al.** Central effects of a novel acylated peptide ghrelin on growth hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000b; 275: 477-480.
5. **Dornonville de la Cour C, M Bjorkqvist, AK Sanvik, et al.** Alike cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regul Pept* 2001; 99:141-150.
6. **Hosoda H, M Kojima, H Matsuo, K Kangawa.** Ghrelin and des-acyl ghrelin, two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 909-913.
7. **Banks WA, M Tschop, SM Robinson, ML Heiman.** Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302: 822-827.
8. **Rindi G, A Torsello, V Locatelli, E Solcia.** Ghrelin expression and actions: a novel peptide for an old cell type of the diffuse endocrine system. *Exp Biol Med* 2004; 229:1007-1016.
9. **Muccioli G, M Tschop, M Papotti, et al.** Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *Eur J Pharmacol* 2002; 440: 235-254.
10. **Altman J.** Weight in the balance. *Neuroendocrinology* 2002; 76: 131-136.
11. **Ariyasu H, K Takaya, T Tagami, et al.** Stomach is a major source of circulating ghrelin and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4753-4758.
12. **Cummings DE, JQ Purnell, RS Frayo, et al.** A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001; 50: 1714-1719.
13. **Tschop M, R Wawarta, RI Riepl, et al.** Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 2001; 24: RC190RC21.
14. **Tschop M, DL Smiley, MI Heiman.** Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000; 407: 908-913.
15. **Sakata I, K Nakamura, M Yamazaki, et al.** Ghrelin-producing cells exist as two types of cells— closed- and opened-type cells, in rat gastrointestinal tract. *Peptides* 2002; 23: 531-536.
16. **Toshinai K, MS Mondal, M Nakazato, et al.** Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycaemia, and leptin administration. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281: 1220-1225.
17. **Nakazato M, N Murakami, Y Date, et al.** A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; 409: 194-198.
18. **Wren AM, SJ Small, HI Ward, et al.** The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and GH secretion. *Endocrinology* 2000; 141: 4325-4328.
19. **Shintani M, Y Ogawa, K Ebihara, et al.** Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonize leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 2001; 50:227-232.
20. **Wren AM, IJ Seal, MA Cohen, et al.** Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 85: 5992-5995.
21. **Hewson A, S Dickinson.** Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 protein in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *J Neuroendocrinol* 2000; 12: 1047-1049.
22. **Murakami N, T Hayashida, T Kuriova, et al.** Role for central ghrelin in food intake and secretion profile of stomach ghrelin in rats. *J Endocrinol* 2002; 174: 283-288.
23. **Tamura H, J Kamegai, T Shimizu, et al.** Ghrelin stimulates G but not food intake in arcuate nucleus ablated rats. *Endocrinology* 2002; 143: 3268-3275.
24. **Horwath TL, S Diano, P Sotonyi, et al.** Minireview: Ghrelin and the regulation of energy balance – a hypothalamic perspective. *Endocrinology* 2001; 142: 4163-4169.
25. **Tannenbaum GS, M Lapointe, A Beaudet, AD Howard.** Expression of growth hormone secretagogue receptors by growth hormone-releasing hormone neurons in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 1998; 139: 4420-4423.
26. **Inui A.** Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 551-560.
27. **Higgins S, M Gueorguiev, M Korbonits.** Ghrelin, the peripheral hunger hormone. *Annals of Medicine*.2007; 39: 116–136.
28. **Tschop M, C Weyer, PA Tataranni, et al.** Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 2001a; 50: 707-709.
29. **Shiya T, M Nakazato, M Mizuta, et al.** Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 240-244.
30. **Ukkola O, E Ravussin, P Jacobson, et al.** Role of ghrelin polymorphisms in obesity based on three different studies. *Obes Res* 2002; 10: 782-791.
31. **Soriano-Guillen L, V Barrios, A Campos-Barros, J Argente.** Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa: effect of weight reduction or recuperation. *J Pediatr* 2004; 144: 30–35.
32. **Misra M, KK Miller, DB Herzog, et al.** Growth hormone and ghrelin responses to an oral glucose load in adolescent girls with anorexia nervosa and controls. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1605–1612.
33. **Cummings D, DS Weigle, RS Frayo, et al.** Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 2002; 23; 346(21): 1623-1630.
34. **Ханжиева-Дърленска Т.** Роля на фруктозама в развитието на затлъстяване. *Мединфо* 2010; 4: 1-3.
35. **Sangiao-Alvarellos S, F Cordido.** Effect of Ghrelin on Glucose-Insulin Homeostasis: Therapeutic Implications. *Int J Pept* 2010;

36. **Ukkola O.** Ghrelin and metabolic disorders. *Curr Protein Pept Sci* 2009; 10 (1): 2-7.
37. **Poykko SM, E Kellokoski, S Horkko, et al.** „Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes.“ *Diabetes* 2003; 52 (10): 2546-2553.
38. **Flanagan DE, ML Evans, TP Monsod, et al.** The influence of insulin on circulating ghrelin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;284:E313- 6.
39. **Broglio F, C Gottero, F Prodam, et al.** Ghrelin secretion is inhibited by glucose load and insulin-induced hypoglycaemia but unaffected by glucagon and arginine in humans. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 61: 503-509.
40. **Ukkola O, S Poykko, M Paivansalo, YA Kesaniemi.** Interactions between ghrelin, leptin and IGF-1 affect metabolic syndrome and early atherosclerosis. *Ann Med* 2008; 40(6): 465-473.
41. **Lee CC, RP Lee, YM Subeg, et al.** Fasting serum total ghrelin level universally correlates with metabolic syndrome in hemodialysis patients. *Arch Med Res* 2008; 39(8): 785-790.
42. **Iantorno M, H Chen, J Kim, et al.** Ghrelin has novel vascular actions that mimic PI 3-kinase-dependent actions of insulin to stimulate production of NO from endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292: E756-E764.
43. **Vlasova MA, K Jarvinen, KH Herzig.** Cardiovascular effects of ghrelin antagonist in conscious rats. *Regul Pept* 2009.
44. **Fernandez-Fernandez R, M Tena-Sempere, VM Navarro, et al.** Effects of Ghrelin upon gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin secretion in adult female rats: in vivo and in vitro studies. *Neuroendocrinology* 2006; 82(5-6): 245-55.
45. **Fernandez-Fernandez R, VM Navarro, ML Barreiro, et al.** Effects of chronic hyperghrelinemia on puberty onset and pregnancy outcome in the rat. *Endocrinology* 2005; 146(7): 3018-3025.
46. **De Souza MJ, HJ Leidy, E O'Donnell, et al.** Fasting ghrelin levels in physically active women: relationship with menstrual disturbances and metabolic hormones. *J Clin Endocrinol Metab*,2004; 89(7): 3536-3542.
47. **Misra M, KK Miller, K Kuo, et al.** Secretory dynamics of ghrelin in adolescent girls with anorexia nervosa and healthy adolescents. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289(2): E347-E356.
48. **Garcia JM, M Garcia-Touza, RA Hijazi, et al.** Active ghrelin levels and active to total ghrelin ratio in cancer-induced cachexia. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(5):2920-6.
49. **Schneider LF, MP Warren.** Functional hypothalamic amenorrhea is associated with elevated ghrelin and disordered eating. *Fertil Steril* 2006; 86(6): 1744-1749.
50. **Vulliémoz NR, E Xiao, L Xia-Zhang, et al.** Decrease in luteinizing hormone pulse frequency during a five-hour peripheral ghrelin infusion in the ovariectomized rhesus monkey. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(11): 5718-5723.
51. **Pagotto U, A Gambineri, V Vicennati, et al.** Plasma ghrelin, obesity, and the polycystic ovary syndrome: correlation with insulin resistance and androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 5625-5629.
52. **Schofl C, R Horn, T Schill, et al.** Circulating ghrelin levels in patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4607-4610.
53. **Moran LJ, M Noakes, PM Clifton, et al.** Ghrelin and measures of satiety are altered in polycystic ovary syndrome but not differentially affected by diet composition. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3337-3344.
54. **Glintborg D, M Andersen, C Hagen, et al.** Evaluation of metabolic risk markers in polycystic ovary syndrome (PCOS). Adiponectin, ghrelin, leptin and body composition in hirsute PCOS patients and controls. *Eur J Endocrinol* 2006; 155: 337-345.
55. **Micic D, M Sumarac-Dumanovic, A Kendereski, et al.** Total ghrelin levels during acute insulin infusion in patients with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest* 2007; 30: 820-827.
56. **Orio F Jr, P Lucidi, S Palomba, et al.** Circulating ghrelin concentrations in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 942-945.
57. **Kos-Kudla B, O Malecka-Mikosz, W Foltyn, et al.** Plasma ghrelin concentrations in patients with polycystic ovary syndrome before and after 6 months therapy: correlation with androgen levels. *Neuro Endocrinol Lett* 2006; 27: 763-767.
58. **Panidis D, D Farmakiotis, G Koliakos, et al.** Comparative study of plasma ghrelin levels in women with polycystic ovary syndrome, in hyperandrogenic women and in normal controls. *Human Reproduction* 2005; 20(8): 2127-2132.
59. **Sagsöz N, Z Orbak, V Noyan, et al.** The effects of oral contraceptives including low-dose estrogen and drospirenone on the concentration of leptin and ghrelin in polycystic ovary syndrome *Fertil Steril* 2009; 92(2): 660-666.
60. **Fusco A, A Bianchi, A Mancini, et al.** Effects of ghrelin administration on endocrine and metabolic parameters in obese women with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest* 2007;30(11): 948-956.
61. **Bik W, Baranowska-Bik A, Wolinska-Witort E, et al.** The relationship between metabolic status and levels of adiponectin and ghrelin in lean women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2007; 23(6): 325-331.
62. **Barber TM, Casanueva FF, Karpe F, et al.** Ghrelin levels are suppressed and show a blunted response to oral glucose in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 2008;158:511-516.
63. **Zwirska-Korczała K, K Sodowsky, SJ Konturek, et al.** Postprandial response of ghrelin and PYY and indices of low-grade chronic inflammation in lean young women with polycystic ovary syndrome. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59(2): 161-178.

64. **Romualdi D, I De Marinis, G Campagna, et al.** Alteration of ghrelin-neuropeptide Y network in obese patients with polycystic ovary syndrome: role of hyperinsulinism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008; 69(4): 562-567.

65. **Mitkov M, B Pehlivanov, M Orbetzova.** Serum ghrelin level in women with polycystic ovary syndrome and its relationship with endocrine and metabolic parameters. *Gynecol Endocrinol* 2008; 24(11): 625-630.

66. **Митков М, Д. Терзиева, Б. Нончев, М. Орбетцова.** Нива на грелин при жени с поликистозен овариален синдром (PCOS) и захарен диабет тип 2. 8-ми Национален Конгрес по Ендокринология, 19-21 октомври, 2006 г., Пловдив, *Ендокринология, супл. 3, 2006*, стр. 101-102.

67. **Panidis D, C Asteriadis, NA Georgopoulos, et al.** Decreased active, total and altered active to total ghrelin ratio in normal weight women with the more severe form of polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010; 149: 170-174.

68. **Kamal M, A Mohi, M Fawzy, H El-Sawah.** Fasting plasma ghrelin in women with and without PCOS. *Middle East Fertil Soc JI* 2010; 15: 91-94.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Доц. д-р Мария Орбетцова,

Клиника по Ендокринология и болести на обмяната; УМБАЛ „Св.Георги“, МУ, Пловдив,
Бул. „В. Априлов“ 15А 4000, Пловдив
служ. тел. 032/ 60 24 86
e-mail: morbetzova@abv.bg

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Assoc. prof. Maria Orbetzova

Plovdiv Medical University 15A. V. Aprilov Str,
4000 Plovdiv, Bulgaria
e-mail: morbetzova@abv.bg

Случай на тиреотоксична кардиомиопатия с електрокардиографски промени наподобяващи остър коронарен синдром

Боян Лозанов, Ж. Гергелчева, Д. Димов, Г. Лазарова, И. Гашарова
 Университетска болница „Лозенец“, Клиника по кардиология

A Case With Thyrotoxic Cardiomyopathy and ECG-Imaging Resembling an Acute Coronary Syndrome

Boyan Lozanov, G. Gergelcheva, D. Dimov, G. Lazarova and I. Gasharova
 Clinic of Cardiology, University Hospital „Lozenetz“, Sofia

Резюме

Тиреотоксичната кардиомиопатия (ТКМП) е тежко усложнение на хипертиреозидизма. Хормоналният ексцес може да доведе до тежка сърдечно-белодробна недостатъчност в резултат на различни дистрофични и функционални процеси, включително и коронарна недостатъчност.

Описаният тук случай се отнася за жена на 52 г. възраст с анамнеза за Базедова болест с 6 годишна давност, некоректно контролирана. Поради остро влошаване на състоянието тя бе приета в болницата с прояви на тежка застойна сърдечна недостатъчност (4-ти функ. кл), синусова тахикардия и ЕКГ промени суспектни за ос-

Abstract

Thyrotoxic cardiomyopathy is a severe complication of hyperthyroidism. The hormonal excess may provoke a severe cardio-pulmonary failure in result of different dystrophic and functional lesions including coronary symptom/signs.

The case described here concerns to a female aged 52 yr with history of Graves' disease which has been diagnosed 6 yr ago, not correctly controlled. For reason of rapid worsening she was admitted to hospital with data of severe congestive heart failure (gr 4), sinus tachycardia and ECG voltage imaging resembling an acute coronary syndrome – ST elevation and negative T waves in dynamic of the standard, V1, V2, V3, AVF. Clinical study and US established diffuse

тър коронарен синдром – ST елевация и негативни T-вълни, които проследени в динамика бяха изразени в трите стандартни отвеждания, V1, V2, V3 и AVF. Клиничното и ултразвуково изследване на щитовидната жлеза установи дифузна струма 3-та ст (по ETA)р ТАО кл 2-б и лабораторни данни за авансиран аутоимунен хипертиреозидизъм. Селективната коронарография, предприета по спешни показания, установи нормален коронарен кръвоток на дясната, лявата и нисходящия клон на лявата коронарна артерия, без данни за оклузия или спазъм (синдром на Prinzmetal), както и такива за синдрома на Takotsubo. Ехокардиографското изследване установи пролапс на митралната клапа, регургитация 3-та степен и задебелени клапни платна. Систоличното налягане в белодробната артерия бе повишено (60 mmHg).

След интензивно лечение с метимазол в дневна доза 50 мгр дневно, набиволол 5 мг дн., инфузии с водно-солеви разтвори, калиев хлорид и поддържаща кислородна терапия ЕКГ промените отзвучаха в течение на 2-3 седмици, кореспондиращо на бързото клинично подобрене, редукция на митралната регургитация до 1-2 степен е снижение на FT3 и FT4 до референтни граници за срок 6 седмици.

Описаният случай се представя с тежка тиреотоксична кардиомиопатия, при която острият хормонален ексцес обусловил екстремни кислородни нужди е основна причина за атипично възникнала тежка миокардна исхемия, наподобяваща ЕКГ-промените при остър коронарен инфаркт с тежка кардио-мулмонална недостатъчност въпреки нормалния коронарен кръвоток. Подобни услож са редки и реверзиблени при провеждане на лечение с високи дози тиреостатици и интензивно лечение на кардио-пулмоналната недостатъчност.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: кардиомиопатия, тиреотоксикоза, миокардна исхемия, миокарден инфаркт

goiter gr 3 (by ETA), TED cl.2-b and laboratory data for the advanced autoimmune hyperthyroidism. The selective coronarography undertaken in emergency revealed a normal blood flow of the main left, the left anterior descending and the right coronary arteries without any data of occlusion Prinzmetal angina as well as Takotsubo syndrome. Echocardiography revealed a mitral valve prolapse, regurgitation gr 3 and thickened mitral leaflets. The systolic pressure of pulmonary artery was elevated up to 60 mm Hg. After intensive therapy with methimazole of 50 mg/d, nebivolol 5 mg d., saline infusions, Potassium chloride and oxygen supply ECG abnormalities disappeared within 2-3 weeks which corresponded to rapid clinical improved, reduction of mitral regurgitation up to 1-2 gr and decrease of FT3, FT4 to reference range after 6 weeks.

The patient described demonstrates a severe thyrotoxic cardiomyopathy in which the acute hormonal excess provokes extreme oxygene demands as a cause of atypical myocardial ischemia mimicking an acute myocardial infarction despite of the normal coronary flow. The similar complication was rare and reversible in result of high doses thionamides and intensive treatment of cardio-pulmonary failure.

KEY WORDS: cardiomyopathy, thyrotoxicosis, myocardial ischemia, myocardial infarction

Тиреотоксичната кардиомиопатия (ТКМП) е тежко, живота-застрашаващо усложнение на тиреотоксикозата. Редица проучвания доказват, че същата е свързана с повишен кардио-васкуларен риск, включително при лица под 60 г. възраст (9). При част от случаите се касае за тежки ритъмни нарушения, при други – за прогресираща сърдечна недостатъчност (7,11). Повишена смъртност поради сърдечно-съдови усложнения на тиреотоксикозата се установява при голямо ретроспективно проучване в Швеция, проведено при 10,000 пациенти (10). Фатален изход са описани дори при млади пациенти без предшестващи или други, съпътстващи заболявания (5).

В патогенезата и клиничната изява на ТКМП основна роля имат директните и индиректните ефекти на тиреоидните хормони (ТХ) върху миокардните структури, които могат да предизвикат дистрофични лезии и прояви на конгестивна сърдечна недостатъчност (2,3). Съществена роля играе също повлияването на beta 1-адренергичната рецепторна и пострецепторна системи, както и стимулираните от ТХ оксидативни процеси в периферните тъкани и в миокарда, повишаващи кислородните нужди. (4) Независимо от тези механизми, хормоналният ексцес сам по себе си би могъл да предизвика хроничен или подостър възпалителен процес с продукцията на проинфламаторни цитокини „in loco“, водещи до ендотелни коронарни лезии и тежка хипоксия (8). Съществуват условия за възникване на коронарни спазми с клинични прояви на нестабилна стенокардия и реален риск за остър коронарен инцидент – миокарден инфаркт, при липса на други заболяване. Илюстрация за такъв тип нарушения е описаният случай.

ОПИСАНИЕ НА СЛУЧАЯ

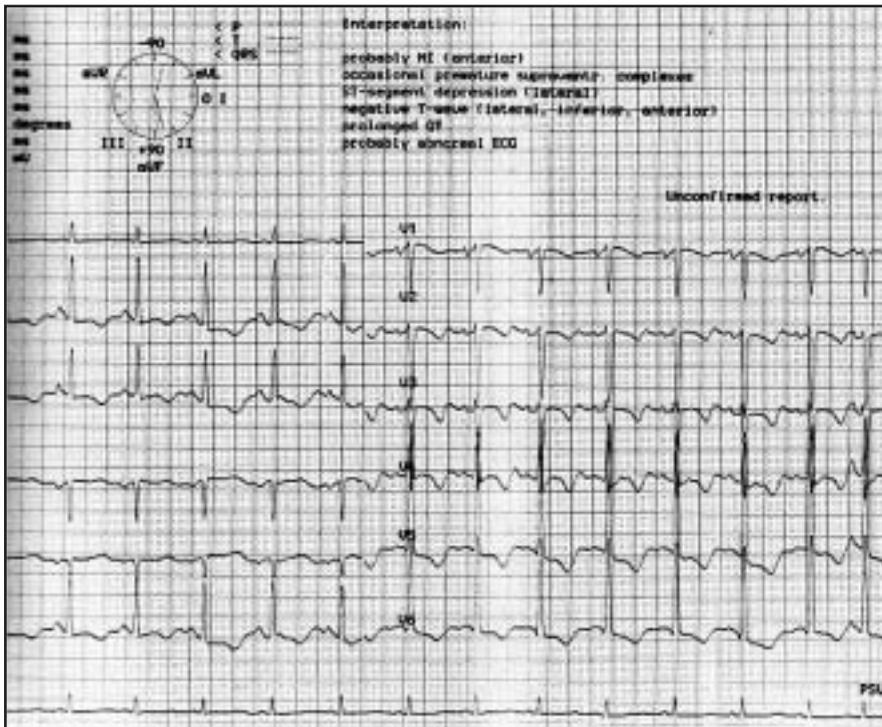
Клинични данни. Отнася се за 52 г. жена с доказана преди 6 години Базедова болест, лекувана несистемно до постъпването с относително ниски дози тиреостатици (метизол, пропицил 2 до 4 т. дн.). По-

ради рязко влошаване на състоянието бе приета по спешност в Интензивно отделение на УБ „Лозенец“ с прояви на тежка сърдечна недостатъчност (III – IV функционален клас): намален физически капацитет и задух при покой, увеличен на 4 см черен дроб, застойни отоци по долните крайници. При физикалното изследване установихме синусова тахикардия (100-120/м. при покой), артериално налягане 150/80, холосистоличен шум върху целия прекордиум, застойни явления в белите дробове, поднормено телесно тегло със значително редуциране на подкожната мастна тъкан, влажна кожа, изразен дистален тремор на ръцете. Налице бяха очни промени по типа на ендокринната офталмопатия: конюнктивална инекция и хемоза от II-ра ст, разширение на двете очни цепки, положителни симптоми на Грефе и Мьобиус, проптоза 20 мм по Hertell (ТАО кл 2б). Щитовидната жлеза бе дифузно увеличена (3-та ст. по ЕТА) с повишена плътност и изразен трил върху двата лоба. Ехографията показва изразена хипоехогенност с нееднородност на структурата и изключително богата съдова мрежа.

Лабораторни изследвания: TSH – 0,005 mIU/ml, FT3 – 13,3 pM/l (ref.r.: 2,8 – 7,1), FT4 – 46,6 pM/l (ref.r.: 12-22), rhTRAB – 32,4 IU/ml (ref.r.: 0 – 1,5), А-ТРО – 288 IU/l (ref.r.: 0 – 34), ALAT – 102 U/l, ASAT – 60 U/l, СРК – 75 U/l, СК-МВ – 51 U/l, Na – 138 mMol/l, K – 3,2 mM/l. Османалите кръвни показатели бяха в норма.

Ехокардиография: разширение на двете предсърдия (56/40 мм), митрален пръстен – 34 мм, митрален пролапс със значително задебеляване на платната и регургитация от 3-та степен, аортна и трикуспидална регургитация 2-ра ст, редуцирана систолна фракция на изтласкване и повишено систолно налягане в белодробната артерия (60 ммHg). Не се установиха данни за акинезия или други промени на апекса и средния участък на левия вентрикул.

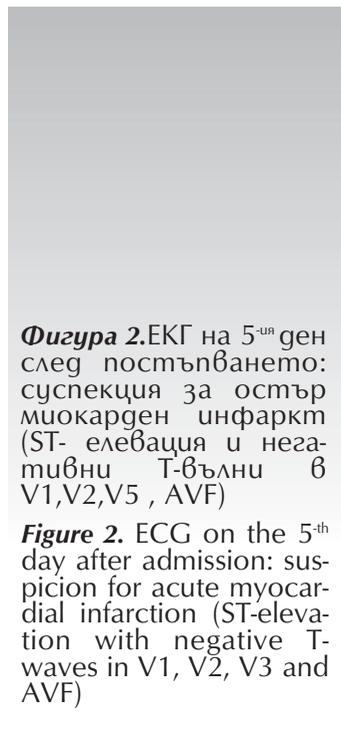
„Електрокардиограмите, проследени в динамика, са показани на фигури 1, 2 и 3.“



Фигура 1. ЕКГ при постъпването

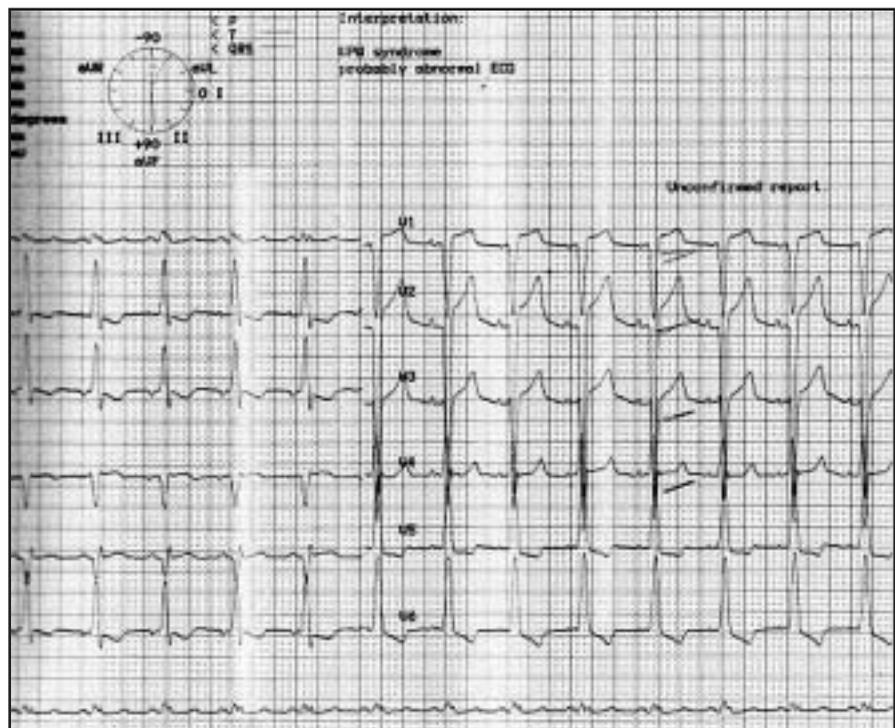
Figure 1. ECG ad admission: sinus tachycardia, premature ventricular complexes, prolonged QT, negative T-waves in standard, AVF, V1 - V5 and ST-depression

Проследени в динамика ЕКГ показаха суспектни за миокарден инфаркт данни: ST –елевация с негативни Т – вълни в V1,V2,V3 и AVF (Фиг № 2), които наложиха извършване на сърдечна катетеризация в спешен порядък.

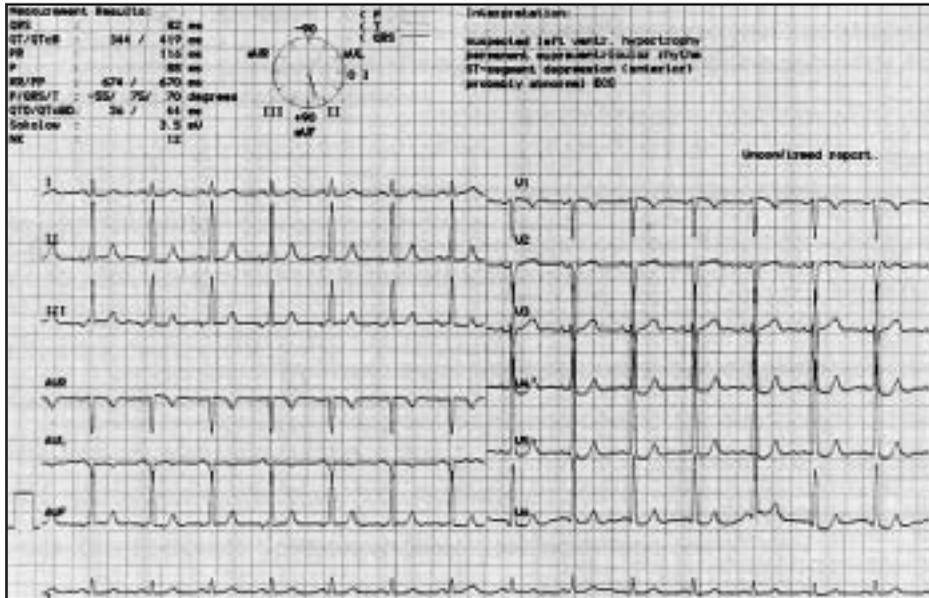


Фигура 2. ЕКГ на 5-ия ден след постъпването: суспекция за остър миокарден инфаркт (ST-елевация и негативни Т-вълни в V1,V2,V3, AVF)

Figure 2. ECG on the 5th day after admission: suspicion for acute myocardial infarction (ST-elevation with negative T-waves in V1, V2, V3 and AVF)

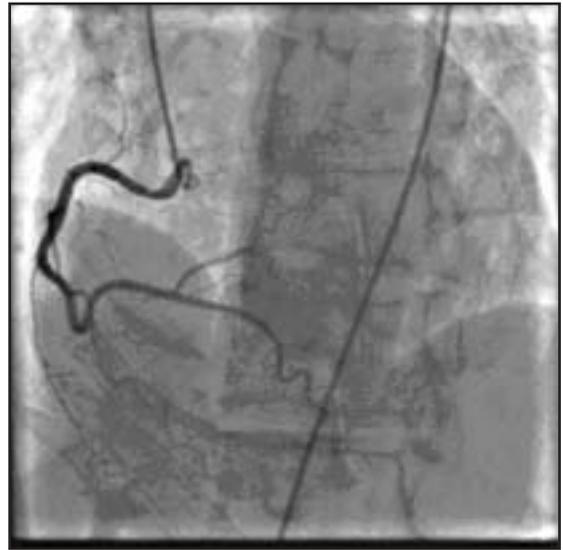
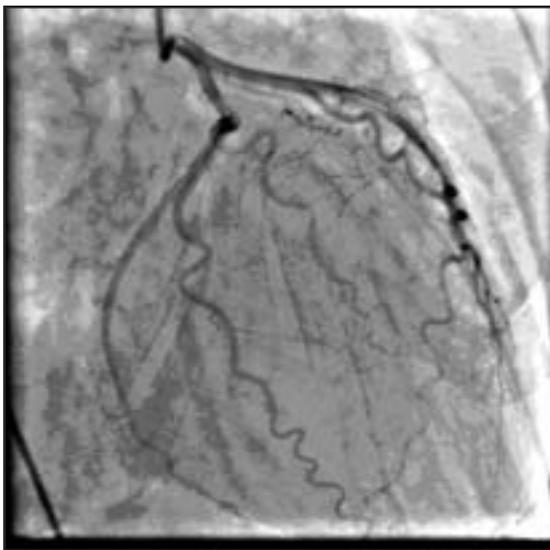


„Селективната коронарография, извършена в спешен порядък на 5-ия ден след приемането, изключи съмненията за остър миокарден инфаркт (фигура 4).“



Фигура 3. ЕКГ на 15-ия ден след приемането: промените са отзвучали, нормална ЕКГ

Figure 3. ECG on the 15-th day after admission: all abnormalities disappeared, a normal ECG



Фигура 4. Селективна коронарография на 5^{-ия} ден след приемането: нормален кръвоток, без данни за стенози или други промени в двете главни коронарни артерии и нисходящия клон на лявата коронарна артерия

Figure 4. Selective coronarography on the 5th day after admission: a normal blood flow without data for the occlusion of main left, left descending and right coronary arteries

Лечение и протичане на заболяването: проведеното интензивно лечение включваше инфузионни разтвори (NaCl 5%, serum glucosae, калиев хлорид), през устата – диуретици и бета-блокери (Nebivolol 5 мг/дн), дозирана кислородо-терапия. Анти-тиреоидното лечение бе провеждано с Thyrozol в дневна доза 50 мг. До края на първата седмица от началото на терапията проявите на сърдечна недостатъчност бяха овладяни и общото състояние значително подобро. До края на втората седмица ЕКГ образите показваха благоприятна еволюция до пълно нормализиране на Т-вълните и ST-сегмента в V1-V3 и AVF към края на третата седмица (Фиг. № 3). Степента на митралната регургитация бе редуцирана до 2-ра степен, успоредно с нормализиране на налягането в пулмоналната артерия (35 mmHg). Лечението бе продължено в амбулаторни условия с постепенно редуциране дозата на тиреостатика.

* ОБСЪЖДАНЕ

Клиничните и лабораторни данни при описания случай потвърждават диагнозата Базедова болест с тежки хормонални и имунологични нарушения, хронично-рецидивиращ ход, високостепенна дифузна струма и прояви на ТАО. Настъпилото след психострес остро влошаване с прояви на тежка сърдечна недостатъчност и суспектни за остър коронарен инцидент ЕКГ-промени изискваха провеждане на инвазивно изследване – селективна коронарна ангиография, която изключи наличие на тромботична оклузия и атеросклеротични промени в коронарните артерии. Данните от специфичните ензимни тестове бяха без отклонения. Изключихме коронарен вазоспазм (синдром на Prinzmetal), както е възможен в резултат на ексцесивен хормонален дистрес при тежък хипертиреоидизъм (12).

В диференциално-диагностично отношение имаме предвид и синдромът на Тако-Tsubo, описан неотдавна от японски автори при жени в менопауза, най-често

настъпващ след тежък психострес – „Stress Cardiomyopathy“ (6). Същият протича с картината на остър коронарен синдром и суспектни за остър миокарден инфаркт ЕКГ-промени. При тези случаи инвазивното контрастно изследване показва нормален коронарен кръвоток, но характерни промени изразяващи се със спазъм в медиалния участък на левия вентрикул и балониране на апекса – „Apical cardiomyopathy“. Ние изключихме този синдром на основание данните от ехокардиографията, както и на коронарографския образ на лявата коронарна артерия и нейния нисходящ клон, чиито ход бе непроменен.

Благоприятният изход в този случай е резултат от проведеното интензивно тиреостатично лечение и е доказателство за тежка, атипично протичаща тиреотоксична кардиомиопатия, чиято манифестация е свързана с директните и индиректните ефекти на тиреоидните хормони върху миокардните структури. Най-вероятно, острият хормонален дистрес провокирал екстремно високи кислородни нужди на периферно и централно ниво, е основна причина за настъпилата миокардна исхемия при нормален коронарен кръвоток, както и за възникналата остра кардио-пулмонална недостатъчност. От значение може да бъде също акцелерираният отговор на бета-адренергичните рецептори и пост-рецепторните G-протеини в миокарда към високите нива на тиреоидните хормони. Що се касае до промените в клапния апарат, същите биха могли да бъдат свързани с ефекта на ТХ върху ендотела и съединително-тъканните структури на митралния пръстен свързани с продукция на инфламаторни цитокини и обуславящи повишена синтеза с натрупване на глюкозоаминогликани (3). Настъпилите промени могат да имат реверзиблен характер в резултат на проведеното адекватно лечение на хипертиреоидизма (1).

В заключение, описаният от нас рядък случай на тежка тиреотоксична кардиомиопатия при Базедова болест с прояви на

остра миокардна исхемия, симулираща остър коронарен синдром при липсата на obstructivни промени в коронарните артерии, трябва да се има предвид в дифференциално-диагностично отношение при всички спешни състояния свързани с хипертиреоидизъм, независимо от неговата етиология. Същите обуславят повишен сърдечно-съдов риск и изискват адекватно терапевтично поведение.

КНИГОПИС/REFERENCES

- 1. I. Dhadke SV and VN Dhadue:** Reversible cardiomyopathy, *JAPI*, Sept.2006,740-741
- 2. Ellen WS, H. Gordon:** The heart in endocrine disorders, in : „Heart disease textbook of cardiovascular medicine“, 6th Ed, 2001, 1751-1806
- 3. Kahaly GJ, A.Schlosser, S.Mohr-Kahaly:** Cardiac morphology and cardiovascular hemodynamics in patients with hyperthyroidism, in: „The Thyroid and Cardiovascular Risk“ (*Thieme Verlag, Stuttgart-NewYork*), 2004, 50-52
- 4. Klein et al,** Thyroid Hormone and cardiovascular System, *N Engl J Med*, 344,2001,7,501-509).
- 5. May Ching Soh and Michael Croxon:** Fatal thyrotoxic cardiomyopathy in a young man, *BMJ*, 337, 28 Nov, 531
- 6. Metzi M et al:** A case of Takotsubo cardiomyopathy mimicking an acute coronary syndrome, *Nat Clin Pract Cardiovasc. Med*, 3, 2006,1,53-56

7. Nyirenda MJ, DN Clark, AR Finlayson: Thyroid disease and cardiovascular risk, *Thyroid*, 2005, 15, 718 - 724

8. Toft AD: Iodine -131 therapy for hyperthyroidism may have long-term consequences other than thyroid failure, *J.R..Coll. Physicians Edinb*, 38,2008, 328

9. Parker JLW and DH Lawson: Death from thyrotoxicosis, *The Lancet*, 302, Oct. 1973, 7834, 894-895

10. Parle J, P. Maisonneuve, MC Sheppard et al: Prediction of all-cause and cardiovascular mortality in elderly people from one low serum thyrotropin result: a 10^{year} cohort study, *The Lancet*, 358, Sept 2001,9285, 861-865

11. Vidt T, J. Verheist and G. De Keuleneas: Cardiomyopathy and thyrotoxicosis: cardiomyopathy or thyrotoxic cardiomyopathy?, *Acta Cardiol.*, 61, Feb 2006,1, 115-117

12. Yoo SY and Kim JY: Recent insights into the mechanisms of vasospastic angina, *Korean Circ J*, 39, 2009, 505-511

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Проф. Боян Лозанов

Клиничен център по ендокринология,
Ул Здраве 2, София 1431
E-mail: bojan_lozanov@hotmail.com

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Prof. Boyan Lozanov,

University Hospital of Endocrinology
2. Zdrave Str, 1431 Sofia, Bulgaria;
E-mail: bojan_lozanov@hotmail.com

Серумни нива на TNF-alpha и неалкохолна стеатозна болест при пациенти със захарен диабет тип 2 и метаболитен синдром

¹Жулиета Геренова, ²Ирена Манолова, ¹Христо Георгиев, ¹Захари Никитов

¹ Катедра Пропедевтика на Вътрешни Болести/Ендокринология, Медицински Факултет, Тракийски Университет,

²Лаборатория по Клинична Имунология, Университетска Болница, Стара Загора

Serum Levels of TNF-alpha and Non-alcoholic Fatty Liver Disease in Type 2 Diabetes Mellitus Patients with Metabolic Syndrome

¹Julieta Gerenova, ²Irena Manolova, ¹Hristo Georgiev, ¹Zahari Nikitov

¹Department of Endocrinology, Medical Faculty, Trakia University,

²Laboratory of Clinical Immunology

Резюме

Неалкохолната стеатозна болест (НАСБ) е хепаталната проява на метаболитния синдром (МС) и обичайно се свързва със затлъстяване и захарен диабет (ЗД) тип 2. Мастната тъкан продуцира различни проинфламаторни цитокини като тумор некротизиращия фактор алфа (TNF-alpha). Цел на настоящото проучване да се изследват серумните концентрации на TNF-alpha при български пациенти със захарен диабет тип 2 и МС и да се анализират тези нива във връзка с наличието на чернодробни увреждания.

Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), the hepatic manifestation of metabolic syndrome (MetS), is consistently associated with obesity and type 2 diabetes mellitus (DM). Adipose tissue produces a number of proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha). The objective of this study was to evaluate the TNF-alpha concentrations in Bulgarian type 2 diabetes mellitus patients with MetS and related these levels with NAFLD.

Methods: A total of 54 MetS patients with type 2 DM (26 males and 28 females) aged from 32 to 74 years and 20 healthy controls (8 males

Материал и методи: Изследвани са 54 пациента със ЗД тип 2 и метаболически синдром (26 мъже и 28 жени) на възраст от 32 до 74 години с давност на заболяването $9,4 \pm 8,5$ год. и 20 здрави контроли (8 мъже и 12 жени) на възраст от 24 до 74 години. Метаболическият синдром бе дефиниран по критериите на IDF 2009. На базата на ехографските промени на черния дроб пациентите бяха разделени на такива с неалкохолна стеатозна болест и такива без ехографски промени. Серумните нива на TNF-alpha бяха определени с ELISA чрез готови търговски китове (R&D systems, USA).

Резултати: Средните плазмени нива на TNF-alpha са сигнификантно по-високи при пациентите с МС ($5,05 \pm 2,6$ pg/ml) и особено при тези с неалкохолна стеатозна болест ($5,22 \pm 2,6$ pg/ml) в сравнение с контролите ($3,45 \pm 2,3$ pg/ml; $p < 0,05$). Пациентите с НАСБ бяха разделени на две групи според стойността на медианата на TNF-alpha (с ниски и високи серумни нива на TNF-alpha). Пациентите с високи нива на TNF-alpha в серума показаха сигнификантно повишение на кръвната захар на гладно и на чернодробните трансминази. Наличието на неалкохолна стеатозна болест асоциира с високи серумни нива на TNF-alpha (OR = 4,26; 95% CI: 1,16 - 15,54; $p = 0,028$).

Заключение: TNF-alpha участва в патогенезата на чернодробните нарушения при захарен диабет тип 2 и серумната концентрация на TNF-alpha може да се използва като полезен маркер за ранна диагноза на хепаталните промени при пациенти с разгърнат метаболически синдром. Инхибицията на активността на TNF-alpha може да бъде нов алтернативен начин на лечение на пациентите със захарен диабет тип 2 и неалкохолна стеатозна болест.

КЛЮЧОВИ ДУМИ: захарен диабет тип 2, метаболически синдром, неалкохолна стеатозна болест, тумор некротизиращ фактор алфа

and 12 females) aged from 24 to 74 years were consecutively enrolled in this study. MetS and its individual components were defined according IDF 2009 criteria. Based on liver ultrasound, patients were classified into either having NAFLD or not. The serum concentrations of TNF-alpha were measured by commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (R&D systems, USA).

Results: The prevalence of NAFLD in MetS patients with type 2 DM was 77,8 %. Mean plasma levels of TNF-alpha were significantly higher in all patients with MetS ($5,05 \pm 2,6$ pg/ml) and especially in those with NAFLD ($5,22 \pm 2,6$ pg/ml) compared to the controls ($3,45 \pm 2,3$ pg/ml; $p < 0,05$). Patients with NAFLD were divided into groups with high and low levels of TNF-alpha defined by the median value of TNF-alpha. Patients with high level of TNF-alpha showed significantly increased fasting glucose and liver transaminases concentrations in blood. The presence of NAFLD was associated with higher levels of TNF-alpha (OR = 4,26; 95% CI: 1,16 - 15,54; $p = 0,028$).

Conclusion: TNF-alpha participate in the pathogenesis of NAFLD and serum TNF-alpha concentrations could be a useful marker for early diagnosis of liver disturbances in patients with diabetes mellitus type 2 and metabolic syndrome. Inhibition of TNF-alpha activity may be a potential approach to treat NAFLD patients.

KEY WORDS: type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome, non-alcoholic fatty liver disease, tumor necrosis factor alpha

Неалкохолната стеатозна болест (НАСБ) се среща често при състояния асоцииращи с инсулинова резистентност, каквито са затлъстяването, захарния диабет (ЗД) тип 2, дислипидемията, метаболитния синдром (МС). Противоречиви са данните за наличие на чернодробни промени при пациенти със захарен диабет тип 2, като посредством ехографския метод, между 50 и 75% от изследваните показват кумулиране на мастна тъкан в черния дроб (4,9). В допълнение, при серия от аутопсирани със затлъстяване, наличието на захарен диабет е идентифицирано като рисков фактор за развитие на неалкохолен стеатохепатит (18). Вниманието на клиницистите към чернодробните промени при захарен диабет се засилва поради доказателствата за сериозността на хепаталните увреждания при тази група пациенти (15). Интерес за изследователите представлява установяването на маркер за ранна диагноза на чернодробните промени при захарен диабет тип 2, с цел тяхното стриктно наблюдение и лечение.

Тумор некротизиращият фактор алфа (TNF- α) е цитокин, произвеждан основно, но не само от активираните макрофаги. Секретира се също така от мастните клетки, като са измерени високи нива при затлъстяване и инсулин – резистентни състояния (12,16). Kugelmas и сътр. установиха високи плазмени нива на проинфламаторните цитокини при пациенти с НАСБ и неалкохолен стеатохепатит (13). Други автори обаче, не уставяват повишени серумни нива на TNF- α при НАСБ (5).

По-детайлни изследвания показаха повишена експресия на TNF- α в черния дроб и мастната тъкан, правейки вероятно ролята на TNF- α в патогенезата на неалкохолния стеатохепатит (7).

Цел на настоящото проучване да се изследват серумните концентрации на TNF- α при български пациенти със захарен диабет тип 2 и МС и да се анализират тези нива във връзка с наличието на чернодробни увреждания.

Материал и методи:

В това изследване са подбрани и включени проспективно 54 пациента със ЗД тип 2 и метаболитен синдром (26 мъже и 28 жени) на възраст от 32 до 74 години с давност на заболяването $9,4 \pm 8,5$ год, хоспитализирани в УМБАЛ – гр. Стара Загора през 2009 год. Метаболитният синдром бе дефиниран по критериите на IDF 2009. От изследването, с предварителна анкета, бяха изключени пациенти с анамнеза за алкохолна злоупотреба, употреба на хепатотоксични медикаменти, професионални вредности, и/или клинични или лабораторни данни за други причини за чернодробни нарушения (вирусен хепатит).

На таблица 1 са представени основните демографски, клинични и биохимични характеристики на изучаваните пациенти. Изследвани бяха 20 здрави контроли (8 мъже и 12 жени) на възраст от 24 до 74 години, с наднормено телесно тегло, без ехографски данни за чернодробни промени (табл. 2.). Ехографското изследване се извършваше с апарат Siemens Sonoline SL с конвексен 3.5 MHz трансдюсер, от един и същи изследовател (Хр. Г.) и диагностицирането на стеатозата бе на базата на общоприетите международни критерии, описана от нас подробно (2). На базата на ехографските промени на черния дроб пациентите бяха разделени на такива с ехографски данни за стеатоза и такива без ехографски промени.

Определени и анализирани бяха серумните концентрации на чернодробните ензими – ALT (аланинтрансaminaза), AST (аспартатаминотрансфераза), GGT (гаммаглутамилтрансфераза), липидните показатели – общ холестерол, HDL-холестерол, триглицериди и кръвната захар на гладно. Всички лабораторни показатели са измерени след поне 12-часово въздържане от прием на храна.

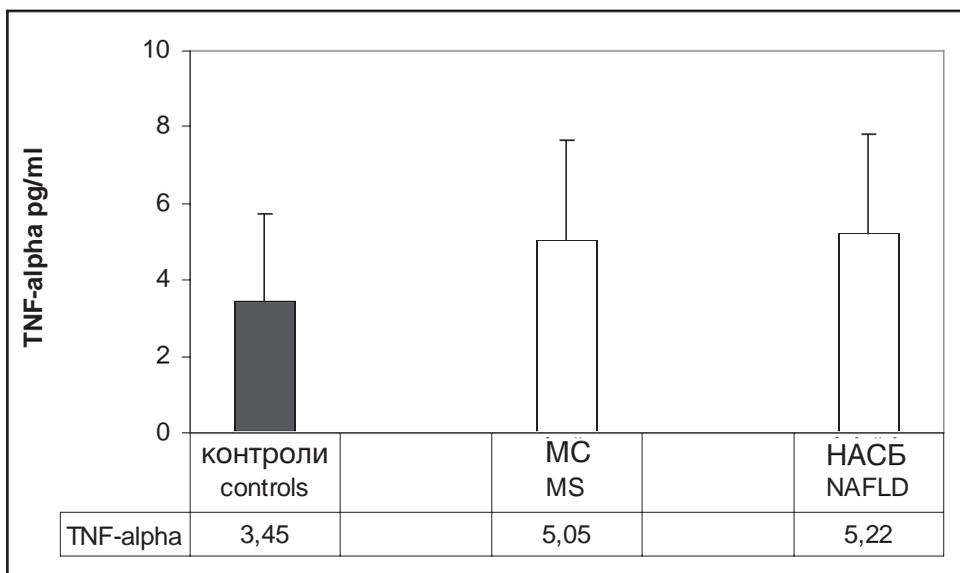
Серумните нива на TNF- α бяха определени с ELISA чрез готови търговски китове (R&D systems, USA). По време на изследването, никой от пациентите и контр-

Таблица 1. Демографски, клинични и биохимични характеристики на пациентите със захарен диабет тип 2 и метаболитен синдром (n=54)

Table 1. Demographic, clinical and biochemical data of type 2 diabetic patients with metabolic syndrome (n=54)

Показател/ <i>Variable</i>	
Възраст (год.)/Age (years)	58,7 ± 9,8
Мъже (%) /жени (%) /Males (%) /Females (%)	26 (48%) / 28 (52%)
Давност на ЗД тип 2 (год.) /Diabetes duration (years)	9,4 ± 8,5 (1- 45)
ИТМ (kg/m ²) /BMI (kg/m ²)	33,8 ± 6,7
Кр. Захар на гладно (mmol/l)/Fasting plasma glucose (mmol/l)	9,1 ± 3,1
Инсулин (μU/ml)/Insulin (μU/ml)	13,8± 12,2
Гликиран хемоглобин А1 С (%) /Glycated haemoglobin A1 C (%)	11,0 ± 2,4
Общ холестерол (mmol/l)/Total cholesterol (mmol/l)	5,9 ± 1,3
LDL-холестерол (mmol/l)/LDL-cholesterol (mmol/l)	4,4 ± 1,3
HDL-холестерол (mmol/l)/HDL-cholesterol (mmol/l)	1,3 ± 0,4
Триглицериди (mmol/l)/Triglycerides (mmol/l)	2,9± 2,1
Артериална хипертония (+)/Hypertension (+)	87%

Стойностите са представени като средни стойности ± SD.



Фигура 1. Плазмени нива на TNF-alpha (pg/ml) при контроли, пациенти със захарен диабет тип 2 и метаболитен синдром и пациенти със захарен диабет тип 2, метаболитен синдром и неалкохолна стеатозна болест.

Figure 1. Plasma levels of TNF-alpha (pg/ml) in controls, type 2 DM patients with MetS and type 2 DM patients with Met Sy and NAFLD.

ролните лица нямаше анамнестични и/или клинични данни за остра бактериална или вирусна инфекция.

Статистически анализ: Всички резул-

тати са представени като средни стойности ± SD. За статистически анализ са използвани дескриптивна статистика, параметрични (t-test) и непараметрични (Mann-Whitney U test, x²-test) тестове.

За да установим дали високите серумни нива на TNF-alpha имат значение за развитието на НАСБ беше използвано отношението на разликите OR (Odds Ratio). Стойностите на OR са представени със съответния 95% доверителен интервал (95% CI) и бяха изчислени използвайки следния достъпен on-line статистически калкулатор <http://spatpages.org/ctab2x2.html>. За ниво на значимост се приема $p \leq 0,05$. Данните са обработени със статистическа програма SPSS, версия 16.

Резултати:

Ехографски данни за НАСБ установихме при 42 (77,8 %) от пациентите със ЗД тип 2 и метаболитен синдром. Средните плазмени нива на TNF-alpha са сигнификантно по-високи при пациентите със ЗД тип 2 и МС ($5,05 \pm 2,6$ pg/ml) и особено при тези от тях - с неалкохолна стеатозна болест ($5,22 \pm 2,6$ pg/ml) в сравнение с контролите ($3,45 \pm 2,3$ pg/ml; $p < 0,05$) (Фиг.1).

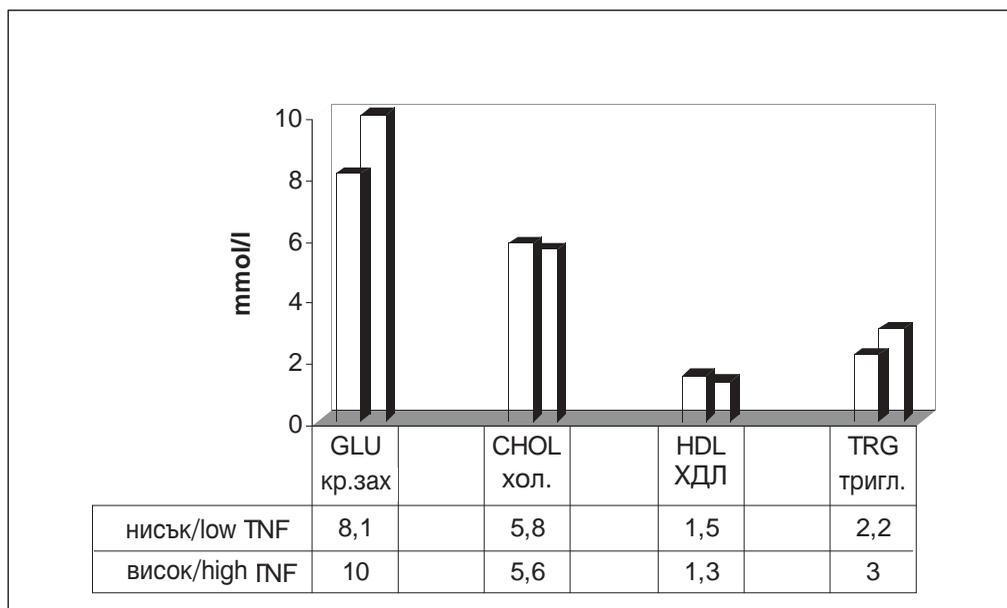
Пациентите с НАСБ бяха разделени на две групи - с високи и ниски стойности на TNF-alpha) според стойността на медианата. Пациентите с високи нива на TNF-alpha в серума показаха сигнификантно повишение на кръвната захар на гладно ($p = 0,012$) и

на чернодробните трансаминази (ALT- $p = 0,090$) (Фиг. 2; Фиг. 3).

При болните с високи серумни нива на TNF-alpha се наблюдава много по-висока честота на НАСБ (76%) в сравнение с болните с ниски серумни нива на TNF-alpha (42%) ($x^2 = 4,84$, $p = 0,028$). Респективно, беше установено, че високите серумни нива на TNF-alpha асоциират с над 4 пъти по-висок риск от развитието на НАСБ (OR= 4,26; 95% CI - 1,16 - 15,54; $p = 0,028$).

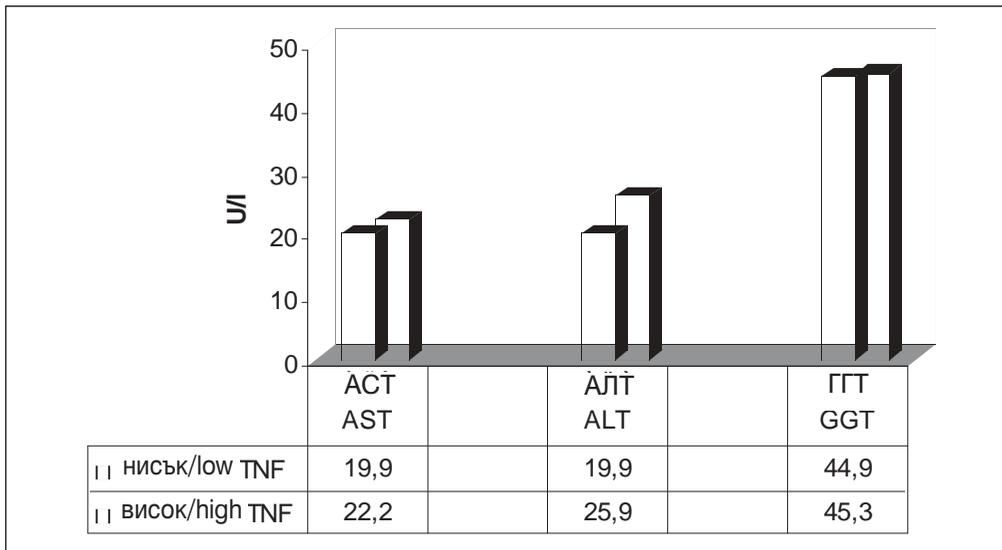
Обсъждане:

В нашето проучване установихме при 77,8 % от пациентите със ЗД тип 2 и метаболитен синдром ехографски данни за НАСБ. Тази честота е по-висока от установената от нас в преходното изследване - наличие на ехографски данни за стеатоза в 46,2 % от изследваните диабетици тип 2 (2). Вероятно това се дължи на проспективния характер на настоящото изследване и таргетната група от пациенти със ЗД тип 2 и метаболитен синдром с лош метаболитен контрол, която е най-високо рисковата група за развитие на чернодробни и сърдечно-съдови усложнения. Нашите резултати са близки до тези на М. Боянов и сътр., които установяват чес-



Фигура 2. Кръвна захар на гладно и липидни показатели при пациенти пациенти със захарен диабет тип 2, метаболитен синдром и неалкохолна стеатозна болест пог-разделени на групи пациенти с ниски и високи серумни нива на TNF-alpha (pg/ml).

Figure 2. Serum fasting glucose and lipid concentrations in type 2 DM patients with Met Sy and NAFLD divided in groups of patients with high and low levels of TNF-alpha (pg/ml).



Фигура 3. Чернодробни трансаминази (U/l) при пациенти с захарен диабет тип 2, метаболически синдром и неалкохолна стеатозна болест, подразделени на групи пациенти с ниски и високи серумни нива на TNF-alpha (pg/ml).

Figure 3. Serum liver transaminases concentrations (u/l) in type 2 DM patients with Met Sy and NAFLD divided in groups of patients with high and low levels of TNF-alpha (pg/ml).

тата на стеатозата с ехографския метод в 75% от изследваните жени със захарен диабет тип 2 и гликиран хемоглобин > 11,0% (1). Л. Матева подчертава значението на метаболитния синдром и захарния диабет като основни фактори довели до развитие на неалкохолна чернодробна мастна инфилтрация (3).

Захарният диабет тип 2 с характерната за него инсулинова резистентност и повишеното натрупване на мазнини интрацелуларно в черния дроб обуславя хепаталните нарушения. Установените от нас сигнификантно по-високи серумни нива на кръвната захар на гладно и тенденцията за по-високи стойности на триглицеридите в групата пациенти с НАСБ и високи серумни нива на TNF-alpha подкрепя тезата за ролята на TNF-alpha в патогенезата и прогресията на НАСБ при захарен диабет тип 2. Ролята на TNF-alpha за развитието на инсулинова резистентност и НАСБ се приема от много изследователи. Процесите са комплексни, определящо значение има баланса между проинфламаторните цитокини – TNF-alpha, IL-6 и резистина от една страна, които увеличават инсулиновата резистентност и антивъзпалителния ефект на адипонектина от друга страна, който води до потискане на синтеза

на TNF-alpha и стимулира освобождаването на цитокини с антагонистично действие – IL-10, IL-1 рецепторни антагонисти (14,17). Ferreira V. и сътр. установяват също високи серумни нива на TNF-alpha при пациенти със захарен диабет тип 2 и НАСБ диагностицирана ехографски. В същата група пациенти е по-висока честота на метаболитния синдром (8). Тези резултати и данните от нашето проучване за наличие на повишени серумни нива на TNF-alpha при пациентите с по-високи нива на кръвната захар на гладно и на чернодробните трансаминази подкрепят хипотезата за участието на TNF-alpha в процесите на чернодробната инсулинова резистентност и за развитието на хепаталните увреждания. Установените в нашето изследване по-високи серумни нива на ALT в кохортата пациенти с високи серумни нива на TNF-alpha в сравнение с групата с ниски нива на TNF-alpha потвърждава тезата на Chang и сътр. за информативността на ALT за развитие на ранни чернодробни нарушения (6).

При пациенти с метаболитен синдром TNF-alpha корелира сигнификантно с белите на инсулинова резистентност и Cirrola-Diaz C. и сътр. изказват хипотезата за въвеждането на TNF-alpha като маркер за

Таблица 2. Демографски, клинични и биохимични характеристики на здравите контроли (n=20)

Table 2. Demographic and clinical data of healthy controls (n=20)

Показател/ <i>Variable</i>	
Възраст (гог.) /Age (years)	53,4 ± 9,5
Мъже (%) /жени (%) /Males (%) /Females (%)	8 (40%) / 12 (60%)
ИТМ (kg/m ²) /BMI (kg/m ²)	31,1 ± 1,8
Кр. Захар на гладно (mmol/l) Fasting plasma glucose (mmol/l)	4,9 ± 0,5
Инсулин (μU/ml) /Insulin (μU/ml)	7,4 ± 1,5
Общ холестерол (mmol/l) Total cholesterol (mmol/l)	5,8 ± 1,3
LDL-холестерол (mmol/l) LDL-cholesterol (mmol/l)	4,3 ± 1,2
HDL-холестерол (mmol/l) HDL-cholesterol (mmol/l)	1,4 ± 0,5
Триглицериди (mmol/l) /Triglycerides (mmol/l)	1,1 ± 0,6
Артериална хипертония (+) /Hypertension (+)	0 %

Стойностите са представени като средни стойности ± SD.

ранна диагноза на заболявания, свързани с възпалителни процеси по типа на метаболитния синдром (10). Но като се има в предвид генетичните различия и хетерогенност на различните популации, влиянието на факторите от околната среда, половите различия, клиничните характеристики на заболяванията, широкия диапазон на стойности на серумни нива на TNF- α в различните изследвани групи, което вероятно определя и различията в резултатите на изследователите, те препоръчват изработване на специфични граници за всяка изследвана група. За създаването на такива референтни граници е необходимо изследване на по-голям брой пациенти и използването на чернодробна биопсия, като единствен метод, приет за „златен стандарт“ за верифициране на хистологичните промени, което е ограничение на нашето проучване.

Капури С. и сътр., в опитна постановка с мишки, доказаха участието на TNF- α в чернодробните процеси на увреда и повишавана на плазмените нива на ALT по нов път на въздействие – чрез фруктозо – индуцираната НАСБ, което доказва ключовото значение на този цитокин за развитието на чернодробните нарушения, по различни патогенетични механизми (11).

Заклучение: TNF- α участва в патогенезата на чернодробните нарушения при захарен диабет тип 2 и и серумната концентрация на TNF- α може да се използва като полезен маркер за ранна диагноза на хепаталните промени, особено в най-рисковата кохорта пациенти – тези от тях, с разгърнат метаболитен синдром. Инхибицията на активността на TNF- α може да бъде нов алтернативен начин на лечение на пациентите със захарен диабет тип 2 и неалкохолна стеатозна болест.

КНИГОПИС/REFERENCES

1. **Боянов М., Д. Бакалов, Г. Шейнкова, А. Везенкова, Г. Проданова, В. Христов.** Неалкохолна стеатозна болест на черния дроб при жени със захарен диабет тип 2 или метаболитен синдром без захарен диабет. *Ендокринология*, XV, 2010, 108-116.
2. **Ваков Л., Д. Димитров, З. Никитов, М. Ангелова, П. Гойчева, Д. Атанасова, Ж. Геренова.** Ехографска диагностика на чернодробната стеатоза при захарен диабет, *Годишен сборник (Научни трудове)*, ИМАБ, том 3, 1997, 55-56.
3. **Матева Л.** Инсулинова резистентност и захарен диабет при хронични чернодробни заболявания. *Дисертация, Медицински Университет, София*, 2009.
4. **Akbar DH, AH Kawther.** Nonalcoholic fatty liver disease in Saudi type 2 diabetic subjects attending a medical outpatient clinic: prevalence and general characteristics. *Diabetes Care*, 26, 2003, 3351-3352.
5. **Aller DE., DA de Luis, L Fernandez, FT Calle, B Velayos, JL Olcos** Influence of insulin resistance and adipokines in the grade of steatosis of nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci* 53, 2008, 1088-1092.
6. **Chang Y., S. Ryu, E. Sung, Y. Jang.** Higher concentrations of alanine aminotransferase within the reference interval predict nonalcoholic fatty liver disease. *Clin. Chem.* 53, 2007, 686-692.
7. **Crespo J, A Cayon, P. Fernandez-Gil, M. Hernandez-Guerra, M. Mayorga, A. Dominguez-Diez, JC Fernandez-Escalante, F. Pons-Romero** Gene expression of tumor necrosis factor and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology*, 34, 2001, 1158-1163.
8. **Ferreira V, R. Pernambuco, E Lopes, C Morais, M Rodrigues, MJ Arruda, L Moura e Silva, L Vilar.** Frequency and risk factors associated with non-alcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 54, 2010, 362-368.
9. **Gupte P, D. Amarapurkar, S. Agal, R. Baijal, P. Kulshrestha, S. Pramanik, N. Patel, A. Madan, A. Amarapurkar, H. Hafeezunnisa** Non-alcoholic steatohepatitis in type 2 diabetes mellitus. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 19, 2004, 854-858.
10. **Gurrola-Diaz C, S. Sanchez-Enriquez, E. Oregon-Romero, P. Garcia-Lopez, P. De la Mora, B. Bastidas-Ramirez, M. Gonzalez-Hita, J. Munos-Valle.** Establishment of a cut-point value of Serum TNF- α levels in the metabolic syndrome. *J. Clin. Lab. Anal.*, 23, 2009, 51-56.
11. **Kanuri G., A. Spruss, S. Wagnerberger SC, I. Bergheim.** Role of tumor necrosis factor alpha (TNF α) in the onset of fructose-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice. *J. Nutr. Biochem.* 2010, Aug., on line (in press)
12. **Kern PA, S. Ranganathan, C. Li, L. Wood, G. Ranganathan** Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 280, 2001, E745-E751.
13. **Kugelmas M, DB Hill, B Vivian, L. Marsano, CJ McClain** Cytokines and NASH: a pilot study of the effects of lifestyle modification and vitamin E. *Hepatology* 38, 2003, 413-419.
14. **Polyzos SA, J. Kountouras, C. Zavos** Nonalcoholic fatty liver disease: the pathogenetic roles of insulin resistance and adipocytokines. *Curr Mol Med* 9, 2009, 299-314.
15. **Porepa L., JG Ray, P Sanchez-Romeu, GL Booth.** Newly diagnosed diabetes mellitus as a risk factor for serious liver disease. *CMAJ*, 2010, June 29 on line.
16. **Romano M, MT Guagnano, G. Pacini, S. Vigneri, A. Falco, M. Marinopiccoli, MR Manigrasso, S. Basili, G. Davi** Association of inflammation markers with impaired insulin sensitivity and coagulative activation in obese healthy women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88, 2003, 5321-5326.
17. **Tilg H.** The role of cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Dig. Dis.* 28, 2010, 179-185.
18. **Wanless IR, JS Lentz** Fatty liver hepatitis (steatohepatitis) and obesity: an autopsy study with analysis of risk factors. *Hepatology* 12, 1990, 1106-1110.

АДРЕС ЗА КОРЕСПОНДЕНЦИЯ

Доц. Жулиета Геренова
Медицински Факултет, Тракийски Университет
Ул. „Армейска“ 11, 6003 гр. Стара Загора,
Тел: 042 600 425
e-mail: j_gerenova@hotmail.com

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

Julieta Gerenova
University Hospital, Armeiska str. 11,
Stara Zagora 6000
Tel: 042 600 425
e-mail: j_gerenova@hotmail.com

Списание
ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ISSN 1310-8131
Българското дружество по
ендокринология (БДЕ)

Адрес на редакционната колегия:

Клиничен център – МБАЛ по ендокринология, „Акад. Иван Пенчев“ ул. „Здраве“ №2, 1431 София;
Проф. Б. Лозанов
тел. (02) 985 6001; факс (02) 987 4145; Мобилен: 0888/680 343 (проф. Лозанов),
E-mail: bojann_lozanov@hotmail.com

Journal
ENDOCRINOLOGIA ISSN 1310-8131
Bulgarian Society
of Endocrinology (BSE)

Editorial Board Address for Correspondence:

Clinical Center of Endocrinology,
2, Zdrave Str., 1431 Sofia, Bulgaria;

Prof. B. Lozanov, Editor in Chief
Tel (+0359) 2-895 6001; Fax C 2-987 4145;
Mobil (+0359) 888 680 343 Lozanov,
E-mail: bojann_lozanov@hotmail.com

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

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

Обемът на предоставените работи не трябва да превишава 10 стандартни страници за оригиналните статии, 12 страници – за обзорните статии, 3-4 страници за казуистичните съобщения, 4 страници за информации относно научни прояви в България и в чужбина, както и за научни дискусии, 2 страници за рецензии на книги (монографии и учебници). В посочения обем се включват книгописът и всички илюстрации и таблици. В същия не се включват резюметата на български и английски, чийто обем трябва да бъде около 200 думи за всяко (25-30 машинописни реда).

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

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

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

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

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

Структурата на статиите трябва да отговаря на следните изисквания:

Титулна страница

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

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

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

Основен текст на статията

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

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

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

Илюстрации и таблици

Илюстрациите към текста (фигури, графики, диаграми, схеми и др. – черно-бели копия с необходимия добър контраст и качество) се представят на отделни листове (без обяснителен текст), в оригинал и две копия за всяка от тях. Текстът към фигурите със съответната им номерация (на български и на английски език) се прилага на отделен лист с описание. На гърба на всяка фигура се надписват с молив съответният номер (с арабски цифри), заглавието на статията и името на водещия автор, като се посочва и мястото (горе, долу). Таблиците се представят с готово написани обяснителни текстове на български и на английски, които са

the principal conclusions. The abstracts should not exceed one standard typewritten page of 200 words.

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

Title page

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

Text of the article

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

Illustrations

The figures, diagrams, schemes, photos should be submitted separately from the text (one original and two copies) in size 9 x 13 cm, all of them described on the back side with: consecutive number (in Arabic figures); titles of the article and name of the first author. These should be listed together with the corresponding and informative text in the legend (title, keys to symbols, etc.) on a separate sheet in consecutive order. The tables should be presented on separate sheets with Arabic numbers and informative text above each table. Please do not leave any empty space in the text for illustrations. Show with an arrow in the left margin of the respective page the recommended space for them.

References

The references should be presented on a separate page at the end of the manuscript. It is recommended that the number of references should not exceed 15-20 titles for the original articles and 30-35 titles for the reviews; 2/3 of them should be published in the last 5 years. References in Cyrillic should be listed first, followed by the Latin ones in the respective alphabetic order. The number of the reference should be followed by the family name of the first author and then his/her initials, names of the second and other authors should start with the initials

разположени над тях; номерацията им е отделна (също с арабски цифри). Посочените в таблицата данни не трябва да се дублират с тези във фигурите. В текста не се остава място за илюстрациите; същото се посочва със стрелка и съответния номер в лявото бяло поле на листа.

Книгопис

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

Примери:

Статия от списание:

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

Глава (раздел) от книга:

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

Адрес за кореспонденция с авторите

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

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

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

followed by the family names. The full title of the cited article should be written, followed by the name of the journal where it has been published (or its generally accepted abbreviation), volume, year, issue, first and last page. Chapters of books should be cited in the same way, the full name of the chapter first, followed by "In:", full full title of the book, editors, publisher, town, year, first and final page number of the cited chapter.

Examples

Reference to a journal article:

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

Reference to a book chapter:

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

Submission of manuscripts

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

Address for sending of manuscripts and other editorial correspondence

Clinical Center of Endocrinology,
2, Zdrave Str., 1431 Sofia, Bulgaria;
Prof. B. Lozanov, Editor in Chief
Tel (+0359) 2-895 6001; Fax C 2-987 4145;
Mobil (+0359) 888 680 343 Lozanov,
E-mail: bojann_lozanov@hotmail.com

ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ENDOCRINOLOGIA



Списание
на Българското дружество
по ендокринология
към СНМД в България

Journal
of the Bulgarian Society
of Endocrinology
(BSE)

Главен редактор
Проф. Боян ЛОЗАНОВ

Научен секретар
Доц. Р. КОВАЧЕВА

Редактор на английски
Д-р Александър ШИНКОВ

Отговорен редактор
Румен НИНОВ

© *Първа корица и графичен дизайн*
Румен НИНОВ

Editor-in-chief
Prof. Bojan LOZANOV

Scientific secretary
Assoc. Prof. R. KOVATCEVA

English editor
Alexander SHINKOV, MD
Art director Rumen NINOV
© *Cover&Design* Rumen NINOV

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, *Ottava*
- 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 (*from 2001*)
- EMBASE
- Bulgarian Citation Index (*from 1996*)