



# Ендокринология

## Endocrinologia

Българско дружество по ендокринология

- Възможности за трансплантация на инсулин-продуциращи  $\beta$ -клетки чрез 3D биопринтиране: ново направление в ендокринологията  
*Transplantation of Insulin-Producing  $\beta$ -Cells Through 3D Bioprinting: a New Direction in Endocrinology*
- Влияние на тиреоидната дисфункция върху молекулярните маркери на костния обмен и WNT инхибиторите SCLEROSTIN и DICKKOPF 1  
*Effect of Thyroid Dysfunction on the Molecular Markers of Bone Metabolism and WNT Inhibitors SCLEROSTIN and DICKKOPF 1*
- Асоциация между някои ехографски параметри и нивата на TSH-рецепторните антитела  
*Association Between Some Ultrasound Parameters and TSH-Receptor Antibodies*
- Витамин B12 статус в българска популация пациенти със захарен диабет тип 2  
*Vitamin B12 Status in a Bulgarian Population with Type 2 Diabetes*
- Сърдечно-съдовият автономен тонус е свързан с инсулиновата резистентност при предиабет  
*Cardiovascular Autonomic Tone is Related to Insulin Resistance in Prediabetes*

3/2019

Bulgarian Society of Endocrinology



# ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ENDOCRINOLOGIA

Списанието се индексирва от/The journal is indexed by:

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

## Editorial Board/Редакционна колегия и съвет

**Editor-in-Chief:** Maria ORBETZOVA

**Главен редактор:** Мария ОРБЕЦОВА

*Honorary Editor-in-Chief: Bojan Lozanov*

*Почетен главен редактор: Боян Лозанов*

**Анелия Томова/Aneliya Tomova**

**Анна-Мария Борисова/**

Anna-Maria Borissova

**Атанаска Еленкова/Atanaska Elenkova**

**Владимир Христов/Vladimir Christov**

**Георги Кирилов/Georgi Kirilov**

**Драгомир Коев/Dragomir Koev**

**Живка Бонева /Zhivka Boneva**

**Жулиета Геренова/Julietta Gerenova**

**Здравко Каменов/Zdravko Kamenov**

**Иван Цинликов/Ivan Tzinlikov**

**Илиана Атанасова/Iliana Atanassova**

**Калинка Коприварова/Kalinka Koprivarova**

**Катя Тодорова/Katia Todorova**

**Кирил Христовов/Kiril Hristozov**

**Лидия Коева/Lidia Koeva**

**Малина Петкова/Malina Petkova**

**Митко Митков/Mitko Mitkov**

**Михаил Боянов/Mihail Boyanov**

**Нарцис Калева/Nartsis Kaleva**

**Пламен Попиванов/Plamen Popivanov**

**Радка Савова/Radka Savova**

**Русанка Ковачева/Roussanka Kovatcheva**

**Сабина Захариева/Sabina Zacharieva**

**Филип Куманов/Philip Kumanov**

**Цветалина Танкова/Tsvetalina Tankova**

## International Scientific Board/Международен научен съвет

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Том XXIV / Volume XXIV

## Съдържание

### Обзори

- **Бояджиева, Надка И., Варадинова, Мирослава Г., Керимов, Спас Д., Методиева, Росица Д.**  
Възможности за трансплантация на инсулин-продуциращи б-клетки чрез 3D биопринтиране:  
ново направление в ендокринологията 119
- **Митева, Мария Ж., Орбецова, Мария М., Нончев, Боян Ив., Давчева, Деяна М.**  
Влияние на тиреоидната дисфункция върху молекулярните маркери на костния обмен и WNT инхибиторите  
SCLEROSTIN и DICKKOPF 1 126

### Оригинални статии

- **Стойнова, Мария А., Шинков, Александър Д., Ковачева, Русанка Д.**  
Асоциация между някои ехографски параметри и нивата на TSH-рецепторните антитела 137
- **Чакърова, Невена Я., Димова, Румяна Б., Минчева, Росица С., Грозева, Грета Г., Тодорова, Ани С., Сердарова, Мина С., Танкова, Цветалина И.**  
Витамин В12 статус в българска популация пациенти със захарен диабет тип 2 147
- **Димова, Румяна Б., Чакърова, Невена Я., Грозева, Грета Г., Кирилов, Георги Г., Даковска, Лилия Н., Танкова, Цветалина И.**  
Сърдечно-съдовият автономен тонус е свързан с инсулиновата резистентност при предиабет 161

### Указания за авторите

172

*Journal* **Endocrinologia** volume XXIV, number 3/2019

## Contents

### Reviews

- **Boyadjieva, Nadka I., Varadinova, Miroslava G., Kerimov, Spas, Metodieva, Rositsa D.**  
Transplantation of Insulin-Producing b-Cells Through 3D Bioprinting: a New Direction in Endocrinology 119
- **Miteva, Maria J., Orbetzova, Maria M., Nonchev, Boyan Iv., Davcheva, Delyana M.**  
Effect of Thyroid Dysfunction on the Molecular Markers of Bone Metabolism and WNT Inhibitors SCLEROSTIN  
and DICKKOPF 1 126

### Original articles

- **Stoynova, Mariya A., Shinkov, Alexander D., Kovatcheva, Roussanka D.**  
Association Between Some Ultrasound Parameters and TSH-Receptor Antibodies 142
- **Chakarova, Nevena Y., Dimova, Romyana B., Mincheva, Rositsa S., Groseva, Greta G., Tododrova, Ani S., Serdarova, Mina S., Tankova, Tsvetalina I.**  
Vitamin B12 Status in a Bulgarian Population with Type 2 Diabetes 154
- **Dimova, Romyana B., Chakarova, Nevena Y., Grozeva Greta G., Kirilov, Georgi G., Dakovska, Lilia, N., Tankova, Tsvetalina I.**  
Cardiovascular Autonomic Tone is Related to Insulin Resistance in Prediabetes 165

### Instructions to authors

172



## Възможности за трансплантация на инсулин-продуциращи $\beta$ -клетки чрез 3D биопринтиране: ново направление в ендокринологията

Бояджиева, Надка И., Варадинова, Мирослава Г., Керимов, Спас Д.,  
Методиева, Росица Д.

Катедра по Фармакология и Токсикология, Медицински факултет,  
Медицински университет, София

## Transplantation of Insulin-Producing $\beta$ -Cells Through 3D Bioprinting: a New Direction in Endocrinology

Boyadjieva, Nadka I., Varadinova, Miroslava G., Kerimov, Spas, Metodieva, Rositsa D.

Department of Pharmacology and Toxicology, Medical Faculty, Medical University – Sofia

### Резюме

Захарният диабет е заболяване, чиято честота продължава да нараства и въпросът за търсене на нови методи и технологии за преодоляване на инсулинова резистентност и/или достъпване на необходимия инсулин в организма е изключително актуален. На основата на разработените през последните години методи за диференциране на  $\beta$ -клетки на панкреас от стволови клетки и тяхното трансплантиране на пациенти със захарен диабет се проучва възможността на нова технология, осигуряваща трансплантация на 3D биопринтирана тъкан, богата на инсулин-продуциращи  $\beta$ -клетки. Три са водещите етапи на този метод: предварителен етап на 3D разработка на модела и принтиране; биопринтиране чрез използване на суспензия от клетки, матрикс и хранителни вещества, която като комплекс се нарича „биомасило“; етап след биопринтиране, който е последният процес на изработване на стабилна структура от биологичен материал.

Представени са различни изследвания, документиращи както специфичните характеристики

### Abstract

The prevalence of diabetes continues to rise and the search for new methods and techniques to overcome insulin resistance and/or deliver the necessary insulin to the body is an extremely topical issue. Based on the methods developed for the differentiation of stem cells into pancreatic beta cells in recent years and their transplantation into patients with diabetes mellitus, the possibility of a new bioprinted tissue transplantation technology, rich in insulin-producing beta cells, is being explored. There are three basic stages involved in this method: pre-processing preliminary stage of 3D model development and printing; bioprinting using a suspension of cells, matrix and nutrients, which as a complex is called „bioink“; post-processing after the bioprinting, which is the last step of making a stable structure of biological material. Various studies have been presented documenting both the specific features of 3D bioprinting of  $\beta$ -cells and the results of studying the anatomical and physiological activity of these

ки на 3D биопринтере на  $\beta$ -клетки, така и резултатите от изследване на анатомичната и физиологична активност на тези клетки да продуцират и секретират инсулин. Важен етап за лечението на пациентите е трансплантиране на конструктите с 3D биопрентирана тъкан, съдържаща  $\beta$ -клетки на панкреас, диференцирани от стволови клетки. На този етап трансплантациите са успешни при работа върху експериментални мишки, при които се установява в продължение на 12 седмици физиологична продукция на инсулин и почти липсващи рискове за имунната система.

**Ключови думи:**

3D биопрентиране,  $\beta$ -клетки, инсулин, захарен диабет.

---

cells to produce and secrete insulin. An important step in the treatment of patients is the transplantation of 3D bioprinted tissue constructs containing pancreatic  $\beta$ -cell differentiated from stem cells. At this stage, 12 week transplants with physiological insulin production and almost no risk to the immune system have been identified as successful in experimental mice.

**Key words:**

3D bioprinting,  $\beta$ -cells, insulin, diabetes mellitus.

---

**Въведение**

Захарният диабет е заболяване, чиято глобална честота прогресивно нараства през последните десетилетия и обхваща все повече хора от всички възрастови групи. Увеличава се броят на пациентите, както със захарен диабет тип 1 (ЗД1), така и със захарен диабет тип 2 (ЗД2) (1). Документирано е увеличаване на броя на пациентите със захарен диабет (ЗД), които имат сериозни усложнения и нарушено качество на живот (2). През последните години се установи развитие на инсулинова резистентност при пациенти от двата типа ЗД. Посоченото постави въпроса пред изследователите да развият и диференцират  $\beta$ -клетки на панкреаса от стволови клетки, и да ги трансплантират на пациенти със ЗД. Дискутирани са възможностите на тази трансплантация и някои незадоволителни резултати, което наложи да се насочат усилията към една нова технология, свързана с 3D биопрентиране на тъкани. Резултатите от изследванията показват, че чрез тази технология може да се трансплантират значим брой функциониращи  $\beta$ -клетки на панкреаса и да се осигури достатъчно инсулин при пациенти с тежки форми на ЗД.

**Диференциране на  $\beta$ -клетки на панкреас от човешки плурипотентни стволови клетки (hPSC) и тяхното трансплантиране**

Заместването на инсулин при пациенти със ЗД се осигурява от различни по продължителност на действие инсулинови лекарствени продукти. Установени са не малък брой пациенти, при които инсулиновата заместителна терапия при продължително лечение намалява своята активност и това наложи разработване на методи за диференциране на  $\beta$ -клетки от човешки плурипотентни стволови клетки (hPSC) (3-6). Успешно диференциране е осъществено и от човешки ембрионални стволови клетки (7, 8). Millman и сътр. (2016) съобщават за развитие на  $\beta$ -клетки на панкреас от стволови клетки, взети от пациенти със ЗД1 (8). Опитът с трансплантация на тези диференцирани от стволови клетки  $\beta$ -клетки се утвърждава през последните години. Анализът на публикуваните изследвания показва, че функционалността на  $\beta$ -клетките е по-голяма и те се запазват и продуцират инсулин по-дълго, когато трансплантацията е извършена в не-панкреатична локация на тялото. Сравнително добри резултати се съобщават през последните години за

случаи със 3D, при които е осъществена трансплантация на  $\beta$ -клетки в черен дроб. Инфузията на *in vitro* създадените от стволови клетки панкреасни островни клетки в черния дроб е стабилизираща тежките форми на инсулинов дефицит и 3D (9). Kroon и сътр. (2008) съобщават за развитие на клетки, които продуцират и секретират инсулин, диференцирани от панкреатична ендодерма (10). Сравнителните проучвания също показват, че когато  $\beta$ -клетките се инжектират интраперитонеално (11, 12) или подкожно (13, 14) се осигурява по-голям брой клетки и възможност те да се запазят във времето като функциониращи инсулин-продуциращи клетки. Това направление на изследвания и заключението, че трябва да се намери подход за трансплантиране на повече клетки, които да са физиологично функциониращи, насочи изследователите към новата технология на 3D биопринтиране на тъкан. Опитът с диференциране на панкреасни  $\beta$ -клетки от стволови клетки е както значим прогрес за науката и база за бъдеща терапия на 3D, така и потенциална възможност за развитие на метода на 3D биопринтиране и създаване на по-ефективен метод за лечение на 3D посредством трансплантиране на тъкан със значим брой функционални  $\beta$ -клетки.

### Основни характеристики на 3D биопринтиране

Основната характеристика на метода на 3D биопринтиране е да се създаде тъкан, богата на функциониращи клетки, но малка по обем, която да замести дефицитна тъкан в човешкото тяло. При този метод се използват стволови клетки. През последните години в хода на адаптация и развитие на 3D биопринтиране, изследователите използват повече стволови клетки от възрастен организъм и по-малко ембрионални стволови клетки. Посоченото се отнася, например, за 3D биопринтиране на неврони и на костна тъкан.

3D биопринтирането се характеризира с 3 основни етапа (15, 16):

- Предварителен етап на визуализиране, 3D разработка на модела и принтиране;
- Биопринтиране чрез използване на суспензия от клетки, матрикс и хранителни вещества, която като комплекс се нарича „биомасило“;
- Етап след биопринтиране, който е послед-

ният процес на изработване на стабилна структура от биологичен материал. През този етап се извършват изследвания върху васкуляризацията на тъканта, способността на трансплантата да се задържи по-дълго в биологична среда, укрепване на създадената тъкан и т.н. Този последен етап е много важен за стабилизиране на биотрансплантата и е свързан с изследвания върху много фактори в биологичната среда.

При 3D биопринтиране се използват три водещи типа на принтери (15). Принтер чрез инжектиране на биоматериала е най-често използваният за бързо продуциране на тъкан. По-рядко се използва и лазерно-асистирано принтиране и принтиране с многократно инфузиране на различни суспензии от клетки. При биопринтирането на  $\beta$ -клетки има 2 основни методични подхода:

А) 3D биопринтиране на стволови клетки и последващо *in vitro* диференциране на съответния фенотип клетки в принтираната тъкан. Така развитата тъкан с диференцирани клетки се трансплантира.

Б) Стартира се с диференциране на  $\beta$ -клетки от стволови клетки, които се принтират с помощта на 3D принтер с последваща кратка инкубация за физиологично възстановяване на клетките и последващо трансплантиране на биопринтираната тъкан.

При развитието на метода за 3D принтиране е разработена система с използване на „скеле“ с poly lactic acid (PLA), която заедно с фибринов хидрогел се оказва подходяща за поддържане в острови на диференцираните от стволови клетки  $\beta$ -клетки. Важен елемент при разработка на устройствата за 3D биопринтиране е установяване размерите на клетъчните клъстери, които да предпазят трансплантираните клетки от хипоксия и последваща смърт. При разработката на метода за биопринтиране на панкреасни острови е създаден макропорест конструкт, осигуряващ условия диференцираните  $\beta$ -клетки да са стабилно функциониращи в порите, защитени от фибринов гел. Фибриновият хидрогел, с който са защитени порите, е подбран като най-подходящ материал поради възможността да деградира и като биологично близък до характеристиките на тъканта. Създаването на конструкт с по-големи пори дава възможност за добро кръвоснабдяване на тъканта, което защитава клетките и тяхната функция, свързана с отговор на глюкозното въздействие (17, 18). При редица разработки с 3D биопринтирани  $\beta$ -клетки, продуциращи инсулин, е установено, че фибриновият гел има защитно въздействие

върху клетките и тяхната функция и помага на васкуляризирането на тъканта (19-23). 3D биопринтирането е метод, който дава възможност да се разработят и изследват сравнително различни подходи. Едно от последните достижения в това направление е на колектив Song и Millman (2017) от Вашингтонския Медицински Университет (24), който публикува резултатите от успешно 3D биопринтиране с материали, които са биологично съвместими, бавно деградирани и не скъпи. Посоченото проучване осигурява бъдещо лечение на пациентите на значимо по-ниска цена от тази на инсулиновите продукти. Изследователите разработват и сравняват конструктите, осигуряващи продукция и секреция на инсулин за повече от 12 седмици.

### **Основни етапи в разработка на 3D биопринтиране на $\beta$ -клетки на панкреас**

Повечето документирани изследвания върху 3D биопринтиране имат близки етапи до посочените по-горе в разработката на метода и ще ги представим, както следва:

#### **1. Моделиране и 3D принтиране на устройството.**

На този етап се определят параметрите на 3D принтера, видът на материала, който ще се използва като база за принтиране на клетките, като целият процес е свързан с компютърно моделиране. Този етап е много важен, защото при определяне на специфичните характеристики на принтера и на генерирания от него конструкт ще може да се осигури създаване на тъкан, богата на  $\beta$ -клетки.

#### **2. Диференциране на $\beta$ -клетки, продуциращи инсулин от стволови клетки.**

Изследванията са в 2 направления: а) диференциране на  $\beta$ -клетки от ембрионални стволови клетки (7) и от hPSC (6). Нашият опит от работа върху стволови клетки показва, че е много важно преди да стартира диференциране те да бъдат *in vitro* култивирани в най-подходящата среда, за да направят клъстери (острови от много стволови клетки). При този подход на нашите проучвания успяхме да диференцираме невронални  $\beta$ -ендорфинови клетки и установихме, че когато в *in vitro* средата стволовите клетки са в острови, процесът на диференциране стартира ефективно, бързо и качествено (25). Ние също установихме, че резултатите от трансплантиране на така развити  $\beta$ -ендорфинови клетки отстранени в острови стволови клетки са по-ефективни в

продукция на  $\beta$ -ендорфин (26, 27).

Има редица протоколи за методи на 3D принтиране на стволови клетки, които са подгържани в специфична среда със съответни растежни фактори, витамини, глюкоза и други фактори на биосредата (24). Диференцирането на  $\beta$ -клетките също изисква подходяща среда, която многократно е публикувана при посочените по-горе изследвания с трансплантация на суспензия на  $\beta$ -клетки, продуциращи инсулин. При 3D биопринтиране протоколите на диференциране на  $\beta$ -клетки от стволови клетки, където в динамика е получено развитието и функционирането на клетките, също са публикувани. Това, което различава протокола за диференциране на  $\beta$ -клетките на панкреас от нашите изследвания при диференциране на  $\beta$ -ендорфинови неврони са добавените към клетъчната среда различни фактори и смяна на средата с нови фактори в периода след 7-ия ден от стартиране на диференцирането. При разработка на метода на 3D биопринтиране на панкреасна тъкан с  $\beta$ -клетки, изследователите сменят четирикратно средата, в която клетките се развиват, както следва: на 7-ми; 13-ти, 20-ти и 35-ти ден. Посочените смени са с разнообразни фактори, необходими за различните етапи на развитие на  $\beta$ -клетките на панкреаса и този протокол е в резултат на много загълбочени изследвания върху функцията на  $\beta$ -клетките. Това определя и заключението ни, че всеки метод за 3D биопринтиране на тъкан изисква специфични детайли за всеки етап на развитие на тъканта в зависимост от фенотипа на клетките. Например: за диференциране на  $\beta$ -ендорфинови неврони при нашите изследвания ние добавяхме цикличен аденозин монофосфат в клетъчната среда с различни растежни фактори, което не се използва в протокола за диференциране на  $\beta$ -клетки на панкреас. Посоченото е логично, защото това са две различни по своите характеристики фенотипни клетки.

#### **3. Загълбочени изследвания за доказване фенотипа на диференцираните клетки.**

При нашите изследвания ние използвахме имунохистохимични, биохимични и генетични методи за доказване на фенотипа на диференцираните неврони, и установихме, че те са  $\beta$ -ендорфинови, продуцират и секретират  $\beta$ -ендорфин (25-27). Посочените подходи са прилагани и при диференциране на  $\beta$ -клетки на панкреас, за да се докаже фенотипът им и тяхната физиологична функционална активност. Чрез имунохистохимия и определяне на концентрации на инсулин в клетъчната среда са документирани  $\beta$ -клетките, които успешно са диференцирани

от стволони клетки. При някои от проучванията са проведени и преброявания на клетките в средата чрез флуоцитометричен метод. Логично е включването на този метод, защото целта на 3D биопринтирането е да се включат в конструкта възможно повече клетки, продуциращи инсулин, за да се осигури успех на този метод в терапията на ЗД.

#### **4. Включване на $\beta$ -клетки в конструкта за 3D принтиране.**

След установяване на фенотипа  $\beta$ -клетки, продуциращи инсулин, се пристъпва към тяхното включване в устройството за 3D биопринтиране. Протоколът е разработен от изследователите (24) и включва няколко етапа на инкубиране на конструкта с клетките, които са вложени в отделните пори чрез специални устройства за запълване на порите.

#### **5. Моделиране на клъстерите с хидрогел.**

В протокола на 3D биопринтиране са посочени изчисленията за достигане на необходимия брой  $\beta$ -клетки в клъстерите и концентрацията на хидрогел в конструкта. Математическите подходи при този модел са свързани и с осигуряване на оптимална кислородна консумация от клетките и достъп до глюкоза, която е важна за индуциране на секрецията на инсулин. 3D биопринтирането на този етап е свързано с много изчисления относно диаметъра на клъстерите. Постигнат е успех при сравнителните експериментални проучвания с диаметър на клъстерите от 100 микрометра. Следващ етап е обработка на клъстерите и инкубирането им при оптимални условия за период от време *in vitro*, след което те се взимат и селектират за трансплантация. Специфично при 3D биопринтиране на панкреасна тъкан е установяването на глюкозо-стимулирана секреция на инсулин от диференцираните  $\beta$ -клетки. Изследват се различни по големина клъстери, взети в различен период на клетъчната диференциация. При повечето протоколи се съобщава, че при клъстери от  $\beta$ -клетки между 25-ия и 34-ия ден от началото на диференциране е установена стабилност и чрез PCR техника са документирани гените, отговорни за продукция на инсулин. Протоколите подробно описват *in vitro* метода за установяване на глюкозо-стимулирана инсулинова секреция на тези  $\beta$ -клетки за трансплантиране, което е специфично и за инсулиновата секреция при хората.

#### **6. Трансплантация**

Последният етап от обсъжданя нов метод за лечение на ЗД включва трансплантиране на 3D биопринтираната тъкан от  $\beta$ -клетки. При експериментални изследвания върху мишки на възраст

10-12 седмици с трансплантирана биопринтирана тъкан от  $\beta$ -клетки са докладвани положителни резултати върху въглехидратната обмяна. Животните, които са получили биопринтираните трансплантанти с максимален размер на клъстерите, са показали наличие на човешки инсулин в кръвта, но не са отговорили с инсулинова секреция на стимулирането с глюкоза. Посоченото от опитите с трансплантация подкрепя установеното от изследователите в хода на проучванията върху клъстерите, а именно, че тези с по-малки размери са по-ефективни за трансплантация. Мишките, които са трансплантирани с конструкти от по-малки клъстери са показали, както наличие на човешки инсулин в кръвта, така и съответен отговор от увеличена концентрация на инсулин след инжектиране на глюкоза. Посоченото показва, че трансплантираните тъкани от 3D биопринтирани конструкти функционират физиологично и имат фенотипа на човешка панкреасна тъкан. Проучванията върху трансплантираните мишки показват също, че в период от 12 седмици 3D принтираните конструкти са активни и поддържат структура и функция, свързана с продукция и секреция на инсулин.

### **Предимства на 3D биопринтиране на $\beta$ -клетки от панкреас като метод за бъдещо лечение на захарен диабет**

При изучаване на 3D биопринтиране на тъкан с  $\beta$ -клетки, продуциращи инсулин, се съобщават следните предимства, които са и надежда за ефективно и по-безрисково, не скъпо лечение на пациенти с тежки форми на ЗД. Ще посочим някои от предимствата на метода, както следва:

- ▶ Диференцираните клетки от човешки плурипотентни стволони клетки дават възможност да се създадат нови клетки, които при трансплантация да не влязат до промени в имунната система (28). Доказаните  $\beta$ -клетки, диференцирани от човешки стволони клетки, взети от индивидуален пациент, на който ще се извърши трансплантация, осигуряват продължителното им функциониране след трансплантация без риск от т.нар. „алогенно“ отхвърляне (7). Посоченият факт е важен за пациентите със ЗД1, при които има доказан автоимунен процес, защото след трансплантация на 3D биопринтирани устройства с  $\beta$ -клетки няма риск от реакция на имунната система (29-31).

- ▶ Значимо предимство на 3D биопринтиране на панкреасни  $\beta$ -клетки е възможността да се въведе голям брой клъстери, съответно клетки, в подходящ конструкт, който да съхрани и поддържа функционалните и анатомични характеристики на  $\beta$ -клетките (32). В това направление изследваните и разработени материали за 3D биопринтиране и разработката на устройството е голям прогрес в ендокринологията, който съчетан и с почти липсващия риск за имунната система прави този метод надежден за бъдещо лечение на ЗД. Установените формули и протоколи за изработка на устройството и целият подход на 3D биопринтиране за целите на лечение на ЗД са предложени на FDA и има надежда за бъдещ прогрес и разрешение за изработка на тези конструкти и тяхното трансплантиране (11, 33).
- ▶ Предимство на 3D биопринтиране е, че при изработване на конструктите може да се използват алтернативни хидрогелове, които да заместят посочените по-горе с PLA и да имат същите или по-добри качества при формиране на порите, в резултат на което да могат да задържат по-дълго стабилни трансплантанти.
- ▶ През последните години се работи за усъвършенстване на 3D биопринтиране на ниво намаляване до елиминиране на времето между трансплантиране и васкуларизиране на тъканта чрез разработка на материали, които да осигуряват освобождаване на про-ангиогенни компоненти (34) или васкуларизиращи вещества/тъкан (35).

### Заклучение

През последните години се постигна прогрес в изследване и разработка на 3D биопринтирани конструкти от клъстери от функциониращи  $\beta$ -клетки на панкреас, продуциращи човешки инсулин и физиологично отговарящи с увеличена секреция на инсулин под влияние на повишени глюкозни нива. Разработените конструкти са трансплантирани експериментално на мишки и резултатите от изследванията показват, че те са функционални до 12 седмици от трансплантацията, през което време се поддържа секреция на човешки инсулин, запазват се структурата и

функцията на  $\beta$ -клетките. Разработената нова технология на 3D принтирани  $\beta$ -клетки, тяхното ефективно трансплантиране и функциониране е значим напредък в усилията да се създаде терапия на ЗД чрез трансплантация на  $\beta$ -клетки във физиологична тъкан. Тази технология има предимства пред разработена и внедрена клетъчна терапия, основно чрез по-значимата ефективност, брой на клетки, които се трансплантират и близки до физиологичните параметри на инсулинова секреция, както и по-малък риск от реакции на имунната система.

## References

1. Botushanov N, Orbetzova M. Bone Mineral Density in Patients with Type 1 Diabetes Mellitus. *Endocrinologia* 2014; 2: 92-99.
2. Levterova B, Orbetzova M, Dimitrova D, Levterov G. Impact of long-term complications on health-related quality of life in patients with type 2 diabetes mellitus. *Endocrinologia* 2018; 23(1): 48-53.
3. Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med* 2006; 355:1318-1330.
4. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343:230-238.
5. Qi M, Kinzer K, Danielson KK, Martellotto J, Barbaro B, Wang Y, et al. Five-year follow-up of patients with type 1 diabetes transplanted with allogeneic islets: the UIC experience. *Acta Diabetol* 2014; 51:833-843.
6. Bellin MD, Barton FB, Heitman A, Harmon JV, Kandaswamy R, Balamurugan AN, et al. Potent induction immunotherapy promotes long-term insulin independence after islet transplantation in type 1 diabetes. *Am J Transplant* 2012; 12:1576-1583.
7. Pagliuca FW, Millman JR, Gurtler M, Segel M, Van Dervort A, Ryu JH, et al. Generation of functional human pancreatic beta cells in vitro. *Cell* 2014; 159:428-439.
8. Millman JR, Xie C, Van Dervort A, Gurtler M, Pagliuca FW, Melton DA. Generation of stem cell-derived beta-cells from patients with type 1 diabetes. *Nat Commun* 2016; 7:11463.

9. Hesse UJ, Sutherland DE, Gores PF, Sitges-Serra A, Najarian JS. Comparison of splenic and renal subcapsular islet autografting in dogs. *Transplantation* 1986; 41:271–274.
10. Kroon E, Martinson L, Kadoya K, Bang A, Kelly O, Eliazar S, et al. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nature biotechnology* 2008; 26:443–495.
11. Vegas AJ, Veiseh O, Gurtler M, Millman JR, Pagliuca FW, Bader AR, et al. Long-term glycemic control using polymer-encapsulated human stem cell-derived beta cells in immune-competent mice. *Nat Med* 2016; 22:306–311.
12. Veiseh O, Doloff JC, Ma M, Vegas AJ, Tam HH, Bader AR, et al. Size- and shape-dependent foreign body immune response to materials implanted in rodents and non-human primates. *Nature materials* 2015; 14:643–651.
13. Lacy PE, Hegre OD, Gerasimidi-Vazeou A, Gentile FT, Dionne KE. Maintenance of normoglycemia in diabetic mice by subcutaneous xenografts of encapsulated islets. *Science (New York, NY)*. 1991; 254:1782–1784.
14. Motte E, Szepessy E, Suenens K, Stange G, Bomans M, Jacobs-Tulleneers-Thevissen D, et al. Beta Cell Therapy Consortium E-F. Composition and function of macroencapsulated human embryonic stem cell-derived implants: comparison with clinical human islet cell grafts. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014; 307:E838–E846.
15. Shafiee A, Atala A. Printing technologies for medical applications. *Trends Mol Med* 2016; 22: 254–265.
16. Ozbolat IT. Bioprinting scale-up tissue and organ constructs for transplantation. *Trends Biotechnol* 2015; 33: 395–400.
17. Colton CK. Oxygen supply to encapsulated therapeutic cells. *Adv Drug Deliv Rev* 2014; 67–68:93–110.
18. Avgoustiniatos ES, Colton CK. Effect of external oxygen mass transfer resistances on viability of immunoisolated tissue. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 831:145–167.
19. Beattie GM, Montgomery AM, Lopez AD, Hao E, Perez B, Just ML, et al. A novel approach to increase human islet cell mass while preserving beta-cell function. *Diabetes* 2002; 51:3435–3439.
20. Riopel M, Li J, Trinder M, Fellows GF, Wang R. Fibrin supports human fetal islet-epithelial cell differentiation via p70(s6k) and promotes vascular formation during transplantation. *Lab Invest* 2015; 95:925–936.
21. Mason MN, Mahoney MJ. A novel composite construct increases the vascularization potential of PEG hydrogels through the incorporation of large fibrin ribbons. *J Biomed Mater Res* 2010; 95:283–293.
22. Kim JS, Lim JH, Nam HY, Lim HJ, Shin JS, Shin JY, et al. In situ application of hydrogel-type fibrin-islet composite optimized for rapid glycemic control by subcutaneous xenogeneic porcine islet transplantation. *J Control Release* 2012; 162:382–390.
23. Lim JY, Min BH, Kim BG, Han HJ, Kim SJ, Kim CW, et al. A fibrin gel carrier system for islet transplantation into kidney subcapsule. *Acta Diabetol* 2009; 46:243–248.
24. Song J, Millman JR. Economic 3D-printing approach for transplantation of human stem cell-derived -like cells. *Biofabrication* 2016; 9(1): 015002.
25. Sarkar DK, Zhang C, Murugan S, Boyadjieva N, Reuhl KR, Mojtehdzadeh S. Transplantation of  $\beta$ -endorphin neurons into the hypothalamus promotes immune function and restricts the growth and metastasis of mammary carcinoma. *Cancer Research* 2011; 71 (19), 6282–6291.
26. Sarkar DK, Murugan S, Zhang C, Boyadjieva N. Regulation of cancer progression by  $\beta$ -endorphin neuron. *Cancer Research* 2012; 72 (4), 836–840.
27. Murugan S, Boyadjieva N, Sarkar DK. Protective effects of hypothalamic beta-endorphin neurons against alcohol-induced liver injuries and liver cancers in rat animal models, Alcoholism: *Clinical and Experimental Research* 2014; 38 (12), 2988–2997.
28. Rong Z, Wang M, Hu Z, Stradner M, Zhu S, Kong H, Yi H, et al. An effective approach to prevent immune rejection of human ESC-derived allografts. *Cell stem cell* 2014; 14:121–130.
29. Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, Gitelman SE, Gupta S, Hellerstein MK, et al. Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med* 2015; 7:315ra189.
30. Grimm AJ, Kontos S, Diaceri G, Quaglia-Thermes X, Hubbell JA. Memory of tolerance and induction of regulatory T cells by erythrocyte-targeted antigens. *Sci Rep* 2015; 5:15907.
31. Serr I, Furst RW, Achenbach P, Scherm MG, Gokmen F, Haupt F, et al. Type 1 diabetes vaccine candidates promote human Foxp3(+)Treg induction in humanized mice. *Nat Commun* 2016; 7:10991.
32. Pedraza E, Brady AC, Fraker CA, Molano RD, Sukert S, Berman DM, et al. Macroporous three-dimensional PDMS scaffolds for extrahepatic islet transplantation. *Cell Transplant* 2013; 22:1123–1135.
33. Vegas AJ, Veiseh O, Doloff JC, Ma M, Tam HH, Bratlie K, et al. Combinatorial hydrogel library enables identification of materials that mitigate the foreign body response in primates. *Nature biotechnology* 2016; 34:345–352.
34. Kolesky DB, Homan KA, Skylar-Scott MA, Lewis JA. Three-dimensional bioprinting of thick vascularized tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016; 113:3179–3184.
35. Ferreira LS, Gerecht S, Fuller J, Shieh HF, Vunjak-Novakovic G, Langer R. Bioactive hydrogel scaffolds for controllable vascular differentiation of human embryonic stem cells. *Biomaterials* 2007; 28:2706–2717.

### Address for correspondence:

● Проф. д-р Надка Бояджиева, дмн

● Катедра по фармакология и  
 ● токсикология, Медицински факултет,  
 ● Медицински университет, София  
 ● ул. „Здраве“ № 2, София 1431, България  
 ● e-mail: nadkaboyadjieva@gmail.com

● Prof. Nadka Boyadjieva, MD, PhD,

● Department of Pharmacology and toxicology,  
 ● Medical Faculty, Medical University, Sofia  
 ● 2 Zdrave Str., Sofia 1431, Bulgaria  
 ● e-mail: nadkaboyadjieva@gmail.com

## Влияние на тиреоидната дисфункция върху молекулярните маркери на костния обмен и WNT инхибиторите SCLEROSTIN и DICKKOPF 1

Митева, Мария Ж.<sup>1</sup>, Орбецова, Мария М.<sup>1</sup>, Нончев, Боян Ив.<sup>1</sup>, Давчева, Деляна М.<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Св. Георги“, Медицински факултет;

<sup>2</sup> Катедра по Клинична лаборатория, Фармацевтичен факултет, Медицински Университет, Пловдив

## Effect of Thyroid Dysfunction on the Molecular Markers of Bone Metabolism and WNT Inhibitors SCLEROSTIN and DICKKOPF 1

Miteva, Maria J.<sup>1</sup>, Orbetzova, Maria M.<sup>1</sup>, Nonchev, Boyan Iv.<sup>1</sup>, Davcheva, Delyana M.<sup>2</sup>

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

<sup>1</sup> Department of Clinical laboratory, Pharmaceutical Faculty, Medical University of Plovdiv

### Резюме

Молекулярните механизми на действие на тиреоидните хормони (ТХ) върху костта са комплексни и само от части изяснени. Взаимодействието на различни тиреоид рецепторни (ТР) изоформи медира ефектите на ТХ върху костта. ТХ изграят основна роля за ендохондралната осификация, за растежа и развитието на скелета и за поддържане на костната маса. Установи се, че ТСХ действа като директен регулатор на костното ремоделиране чрез активиране диференциацията на остеобластите и инхибиране на костната резорбция. Wnt сигналният път се разглежда като основен регулатор на костното формиране и регенерация и участва в асоциираната от тиреоидните хормони костна загуба. В скорошни проучвания се изследва регулацията на Wnt сигналния път, в частност неговите инхибитори, Dickkopf 1 и склеростин, при тиреоид-асоциираната костна болест. Представяме преглед на действието на ТХ върху костта и влиянието на тиреоидната дисфункция върху скелета с акцент върху молекулярните взаимодействия между ТХ и костните клетки.

### Abstract

The molecular mechanisms of actions of thyroid hormones (TH) on the skeleton are complex and only partially understood, occurring in both a direct and indirect manner. The interaction of different thyroid receptors (TR) isoforms mediates the effects of TH on bone tissue. TH play a fundamental role in endochondral ossification, in skeletal development and growth and in the maintenance of bone mass. However, recent studies have provided evidence that TSH acts as a direct regulator of bone remodelling and TSH has been shown to activate osteoblast differentiation and inhibit bone resorption. The Wingless-type MMTV integration site (Wnt) pathway has emerged as a crucial regulator of bone formation and regeneration and Wnt signaling has been implicated in thyroid hormone-associated bone loss. The regulation of the Wnt signaling pathway, in particular its inhibitors Dickkopf 1 and sclerostin, in thyroid hormone induced bone disease has been recently evaluated. We present here a review of the action

of TH on bone and of the impact of thyroid disorders on the skeleton with the focus on the molecular interactions between TH and skeletal cells.

### Ключови думи:

тиреоидна дисфункция, тиреоид-асоцирана костна болест, Wnt сигнален път, Dickkopf 1, склеростин

### Key words:

thyroid dysfunction, thyroid hormone induced bone disease, Wnt signaling pathway, Dickkopf 1, sclerostin

### Въведение

Тиреоидните хормони (ТХ) играят ключова роля в скелетното развитие, растежа и костната хомеостаза в зряла възраст. Дефицитът им при деца забавя съзряването на костите и спира растежа (1), което може да бъде частично компенсирано със заместително лечение с L-тироксин (2). От друга страна, хипертиреоидизмът при децата води до ускорено скелетно развитие, но също така и до нисък ръст поради преждевременно затваряне на растежната плака (3). В зряла възраст и хипотиреоидизмът, и хипертиреоидизмът водят до намалена здравина на костите и склонност към фрактури по различни механизми. Въпреки че хипотиреоидизмът увеличава продължителността на костния ремоделиращ цикъл с резултат понижен костен търновър и ускорена минерализация (4), популационни проучвания показват, че пациентите с хипотиреоидизъм са с повишен риск от фрактури (5). Излишъкът от ТХ ускорява костното ремоделиране чрез активиране функцията на остеобластите и остеокластите, благоприятства костния обмен и загубата на костна маса, което повишава склонността към фрактури (6, 7).

Двата ТХ – 3,5,3',5'-тетрайод-L-тиронин (тироксин или  $T_4$ ) и 3,5,3'-трийодотиронин ( $T_3$ ) се синтезират в щитовидната жлеза и принадлежат към група ендокринни молекули, медиращи ефектите си чрез ядрени рецептори -  $TR\alpha$  и  $TR\beta$  в различни изоформи, в зависимост от тъканното разпределение и от възрастта. Различават се  $TR\alpha 1$ ,  $TR\alpha 2$ ,  $TR\beta 1$ ,  $TR\beta 2$  рецептори (8). Изоформите  $TR\beta 1$  и  $TR\alpha 1$  се експресират в стромални клетки на костен мозък, хондроцити, остеобласти и остеокласти. Количествените проучвания с RT-PCR намират, че експресията на  $TR\alpha 1$  е поне 10 пъти по-висока от експресията на  $TR\beta 1$ , което показва, че  $TR\alpha 1$  е основният функциона-

лен посредник на действията на  $T_3$  в скелета (9,10).

В хондроцитите ТХ инхибират клетъчната пролиферация и индуцират диференциация и апоптоза, като по този начин играят централна роля в линеарния растеж (11). Те стимулират остеобластната диференциация и синтеза на костния матрикс чрез повишаване експресията на остеокалцин, колаген тип 1 и алкална фосфатаза (12-14). Действието на ТХ върху остеобластите повлиява също активността и формирането на остеокласти чрез стимулиране експресията на рецепторния активатор на NF- $\kappa$ B лиганда (RANKL) и други цитокини, които участват в остеокластогенезата (15). Предполагаемите преки ефекти на ТХ върху остеокластогенезата са предмет на текущи проучвания.

Остеобластогенезата и костното формиране са под контрола на Wnt сигнален път (16). Wnt протеините провеждат своите сигнали чрез различни пътища, включително каноничния –  $\beta$ -катенин зависим път (17). Каноничният  $\beta$ -катенинов път се активира при свързването на Wnt протеините към рецепторен комплекс, състоящ се от Frizzled протеин и неговия ко-рецептор, LDL рецептор-свързан протеин (LRP) 5 или 6. Взаимодействието им води до стабилизация и нуклеарна транслокация на  $\beta$ -катенина, което индуцира транскрипцията на остеобластните гени. Wnt сигнализирането се регулира от ендогенни инхибитори, включително DKK-1, склеростин и секретирани Frizzled-свързани протеини 1. Благодарение на мощното инхибиране на костното формиране и в случая със склеростин, кост-специфичната му експресия в остеоцитите, са разработени моноклонални антитела срещу DKK1 и склеростин и понастоящем се оценяват в клинични изпитвания относно тяхната ефикасност за подобряване на костната маса и здравина при хора (18,19).

Въпреки че е ясно, че  $T_3$  пряко повлиява костното ремоделиране, основните молекулярни механизми на това му действие не са напълно установени и са обект на текущи проучвания. Тъй като Wnt сигнализацията е основен регулатор на костната хомеостаза и остеобластната биология, регулацията на Wnt сигналния път, по-специално на неговите инхибитори DKK1 и склеростин, играе важна роля за тиреоид-асоцираната костна болест *in vivo*. Към днешна дата са известни малко, предимно *in vitro* проучвания по темата. Данните при хора за промени в нивата на склеростин и DKK1 при състояния на хипер-и/или хипотиреоидизъм са оскъдни, но резултатите до момента сочат, че DKK1 и склеростин могат да имат определена и необходима роля в регулацията на костното ремоделиране.

### Нормално костно ремодулиране – ремодулиращ цикъл

Костното ремоделиране е динамичен процес, характеризиращ се с тясна връзка между остеокластната резорбция и остеобластното костно формиране. Процесът се иницира чрез активиране на остеокластните прекурсори, които се превръщат в зрели остеокласти чрез пролиферация и диференциация (20). Остеокластите резорбират костта до достигане на определена дълбочина. В последствие остеобластите нахлуват в областта и започва формиране на нова кост. Последователността от събития в процеса на ремоделиране, т.е. активиране – резорбция – формиране (ARF последователност), се демонстрира най-добре в кортикалната кост (21). Честотата на активиране показва колко често гаден участък от костната повърхност претърпява резорбция и последващо формиране. Трабекуларната кост поради своята анатомична структура има по-висока метаболитна активност от кортикалната (21). Освен от паракринни и локални фактори, ремоделиращият цикъл се регулира от редица калцитропни хормони; паратиреоиден хормон (PTH), 1,25(OH)2D, растежен хормон. ТХ увеличават честотата на активиране, а кортикостероидите, половите стероиди и калцитонинът (последният с по-малко значение) я намаляват.

Костното ремоделиране се осъществява в участъка, наречен от Фрост *Basic Multicellular Unit (BMU)*, който се състои от остеокласти, остеобласти и остеоцити, взаимодействащи в костната ремоделираща кухня. В трабекуларната кост ремоделирането се осъществява на повърхността на трабекулите и нормално продължава около 200 дни. Цикълът на ремоделира-

не може да бъде по-кратък от 100 дни при тиреотоксикоза и първичен хиперпаратиреоидизъм и да превишава 1000 дни при състояния с нисък костен turnover като тежък хипотиреоидизъм и след лечение с бифосфонати (20). Ремоделирането се иницира от остеокластната резорбция. Остеокластът образува резорбционна лакуна с дълбочина, която варира между 60  $\mu\text{m}$  при млади индивиди и 40  $\mu\text{m}$  при по-възрастни индивиди. Времето на резорбция има средна продължителност 30-40 дни и е последвано от период на костно формиране от 150 дни (21). В здравата кост резултатът от ремоделиращия цикъл е цялостно запълване на резорбционната лакуна с новообразувана кост. При болестни състояния като остеопороза основният дефект е, че остеобластите не са в състояние да запълнят резорбционната лакуна, което води до нетна костна загуба при всеки ремоделиращ цикъл (22). Ремоделиращият цикъл в кортикалната кост е по-кратък, отколкото в трабекуларната със средна продължителност от 120 дни (23). Общата повърхност на трабекуларната кост е напълно ремоделирана за период от 2 години.

### Клетъчни механизми на костното ремоделиране

#### Остеокласти и костна резорбция

Остеокластите произхождат от хематопетичните стволови клетки и са тясно свързани с моноцити и макрофаги. Диференцирането от остеокластните прекурсори до напълно активирани мултинуклеарни остеокласти зависи от наличието на рецепторния активатор на NF- $\kappa\text{B}$  лиганда (RANKL), член на фамилията TNF, и от M-CSF. RANKL се експресира от остеобластите, както и от стромални клетки на костния мозък, от T- и B- лимфоцити. RANKL се свързва и активира своя рецептор RANK, експресиран върху мононуклеарните остеокластни прекурсори. След RANKL-индуцираната RANK стимулация се повишават редица ключови регулаторни транскрипционни фактори и ензими, за да се стимулира диференциацията, пролиферацията, мултинуклеацията, активирането и преживяването на остеокластите. В резултат на това се активира костната резорбция. Остеопротегеринът (OPG) представлява естествен антагонист на RANKL, рецептор-примамка, който също се произвежда от остеобластите. OPG е цитокин, който регулира остеокластната диференциация и функционира като ключов фактор за активиране на остеокластите чрез инхибиране на тяхната апоптоза (24).

## Остеобласти и костно формиране

Остеобластите са мезенхимни клетки с произход от съответните прогениторни клетки на мезодермата и невралния гребен. Тяхната диференциация преминава през пролифериращи преостеобласти, остеобласти, които произвеждат костния матрикс и завършва в остеоцити или подпорни клетки. Най-ранният маркер на остеобластното формиране е Runt-related transcription factor 2 (Runx2), който е необходим за диференциране на прогениторните клетки в остеобластната клетъчна линия (25). Runx2 регулира експресията на гени, кодиращи остеокалцин, VEGF, RANKL, склеростин и dentin matrix protein 1 [DMP1] (26). Osterix е друг транскрипционен фактор, който е от съществено значение за диференциацията на остеобластите (27). Напълно диференцираният остеобласт се характеризира с ко-експресия на алкална фосфатаза и колаген тип I, от значение за синтеза на костния матрикс и последващата минерализация (28). Зрелите остеобласти също произвеждат регулатори на матриксната минерализация като остеокалцин, остеоопонтин и остеоонектин, RANKL, необходим за диференциацията на остеокластите, както и рецептора за PTH (PTHr1). В края на живота им, остеобластите се трансформират в остеоцити, които се възраждат в минерализирания матрикс или в покривни клетки, които се разполагат по цялата костна повърхност.

**Функцията на остеоцитите** дълго остава неясна и се приема, че те са относително инертни клетки. Изследванията през последните две десетилетия показваха, че това въобще не е така и, че остеоцитите играят ключова роля в регулацията на костното моделиране и ремоделиране и в минералната обмяна (29). Остеоцитите са най-многобройната популация костни клетки, съставляващи 90-95% от общата клетъчна маса на костта. Посредством своите дендритни израстъци те се свързват в мрежа, както помежду си, така и с клетките по ендосталната и перисталната повърхност на костта (30). По този начин остеоцитите осигуряват интегритета и опосредстват пряка комуникация между клетките в костната микросреда. Остеоцитите секретират разнообразни неколагенови белтъци и паракринни фактори като остеокалцин, остеопротегерин, остеоопонтин, дентинен матриксен протеин 1. Остеоцитите са източник на RANKL, FGF23 и склеростин които контролират костното формиране и фосфатния метаболизъм (31).

Голям брой паракринни, автокринни и ендокринни фактори влияят върху развитието и зрелостта на остеобластите. Редица сигнални пътища, включващи bone morphogenetic proteins

(BMPs), растежни фактори като FGF и IGF, ангиогенни фактори като ендотелин-1, хормони като PTH и простагландинови агонисти, стероидни хормони, инсулиноподобни растежни фактори регулират зрелостта на остеобластите (32), но фамилията от лиганди Wnt (Wingless-type MMTV integration site) предизвиква най-голям интерес през последните години. Действието на PTH и BMPs е тясно свързано с активирането на Wnt сигналните пътища (33).

## Wnt сигнални пътища и остеобластна диференциация

Wnt сигналният път се явява съществен регулатор в процесите на костното формиране и регенериране. Wnts са богати на цистеин, секретирани гликопротеини, които активират клетъчно-повърхностни, рецептор-медицирани сигнални пътища, отговорни за контрола на генната експресия, клетъчния жизнен цикъл, пролиферацията и миграцията. Wnts участват в процесите на ембриогенеза и органогенеза, постнаталното развитие и регенерацията на тъканите, включително на лимфоцити, кожа, дебело черво, космени фоликули и кости (33). Известни са 19 Wnts при хора и мишки, които иницират сигналната каскада чрез свързване с екстрацелуларните фрагменти на трансмембранен рецепторен комплекс, състоящ се от един от 10 мембранни Frizzled (Fzd) рецептори, съвместно с един от двата – LDL receptor-related protein (LRP) 5 или 6 ко-рецептори. Свързването води до down-регулация на активността на гликоген синтазната киназа-3 (GSK-3). Въз основа на способността им да инхибират гликоген синтазната киназа (GSK) 3, фосфорилирането на  $\beta$ -катенина и последващото му разграждане, Wnts са класифицирани като „канонични“ (например Wnt 1, 3a, 8, 10b) или „неканонични“ (напр. Wnt 4, 5a, 11), когато не засягат нивата на  $\beta$ -катенин (34).  $\beta$ -катенин представлява вторичен посредник, който съществува в клетката в две състояния – фосфорилирано и нефосфорилирано. При липса на активиране на Wnt пътя  $\beta$ -катенин се фосфорилира, което води до протеолитичното му елиминиране от цитоплазмата. Активирането на Wnt пътя потиска фосфорилирането на  $\beta$ -катенин и води до нарастване на концентрацията му в цитоплазмата и пренос към ядрото. В резултат на това се включват специфични за клетката транскрипционни пътища.

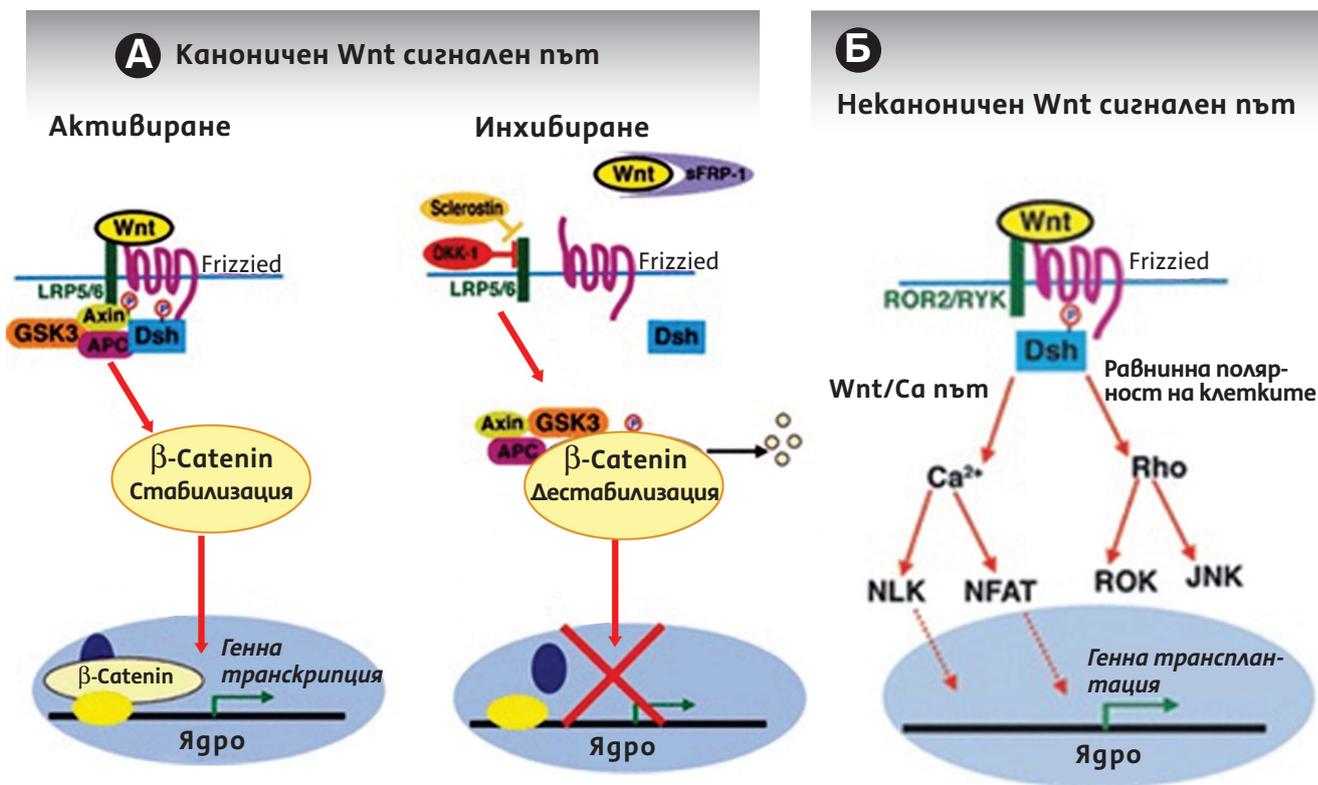
Каноничният Wnt сигнален път е активен в множество класове клетки, включително всички клетки на остеобластната клетъчна линия и включва стабилизиране на  $\beta$ -катенина. Сигнализа-

цията на Wnt/ $\beta$ -катенин е от значение и за механотрансдукцията, заздравяването на фрактури и зрелостта на остеокластите. Интегритетът на Wnt сигнален път е от ключово значение за диференциацията, узряването и преживяването на остеобластите.  $\beta$ -катенин освен това участва в регулацията на купелуването на остеобластите и остеокластните предшественици чрез контрол на експресията на остеопротегерин. Потискането на Wnt пътя в мезенхимните клетки-предшественици насочва диференциацията към адипоцитен, а не към остеобластен фенотип (35). Дефектите в Wnt сигналните пътища с абнормно натрупване на  $\beta$ -катенин се свързват с канцерогенезата и различни костни диспластични заболявания (36). Мутации в LRP5/6 се асоциират с конституционално ниска (инактивиращи мутации) или висока (активиращи мутации) костна маса.

Wnt сигналният път се регулира от голям брой извънклетъчни и вътреклетъчни протеини. Екстрацелуларните протеини, които взаимодействат с този път, включват членовете на фамилията Dickkopf и склеростин и секретирани Frizzled свързани протеини (sFRPs), които регулират сигнализацията при взаимодействието Wnt/Frizzled/Lrp (37-38) (Фиг. 1).

**Dickkopf1 (DKK1)** е прототип на 4-членна генна фамилия. Dkk1 инхибира Wnt/ $\beta$ -катенинното сигнализиране чрез свързване с LRP5 и LRP6 и блокира способността на Wnt лигандите да взаимодействат с LRP5 и LRP6 (39). Изследвания при миши модели потвърждават ключовата роля на Dkk1 за костното развитие. Проучвания при мишки, хетерозиготни за инактивираща мутация в Dkk1, показват висока костна маса, свързана със значително увеличена скорост на костно формиране (40). Те демонстрират, че само 25% понижение в нивата на Dkk1 е достатъчно за увеличаване на трабекуларната и кортикалната костна маса. Няколко колектива са изследвали Dkk1-неутрализиращи антитела при различни животински модели и съобщават обещаващи резултати по отношение на костната плътност. Въпреки че разработването на лекарствени средства с анаболен ефект върху костта, които инхибират Dkk1, е в ранен стадий на проучване, предварителните резултати при мишки показват, че Dkk1 е привлекателна терапевтична цел за индукциране на костно формиране. Към настоящия момент усилията са фокусирани върху създаването на Dkk1-неутрализиращи моноклонални антитела.

**Фигура 1.** Каноничен (А) и неканоничен (В) Wnt сигнален път.



**Склеростинът** е секреторен гликопротеин, продуцент на SOST гена, разположен върху хромозома 17. Склеростин се експресира предимно от зрелите остеоцити, но и от тъкани извън костта като миокард, бъбреци, черен дроб, епидидим, каротиди, пилор (41). Мутации в SOST причиняват автозомно рецесивна склеростеоза, която се характеризира с прогресивно нарастване на скелета, костно задебеляване и скелетна хиперостоза. Болестта на Van Buchem е друго свързано автозомно рецесивно заболяване, с висока костна маса, с хомозиготна делеция в регион, тясно свързан със SOST гена. Болестта на Van Buchem протича с по-леки симптоми от тези, наблюдавани при склеростеозата. SOST knockout мишки са с повишена костна минерална плътност, костен обем, костно формиране и костна здравина, докато трансгенни мишки, свръхекспресиращи SOST, са остеопенични. Тези факти показват, че вероятно склеростин е негативен регулатор на костното формиране.

### Механизъм на действие на склеростин

Склеростинът се експресира в костната тъкан, предимно от остеоцити също и от пре-остеокласти. Подобно на Dkk1, склеростинът се свързва с Lrp5/6 и антагонизира каноничното Wnt сигнализиране, но за разлика от DKK1 се свързва с различен регион на LRP5/6 и не медутира рецепторната интернализация (38). Според етапа от развитие на клетката, блокирането на Wnt пътя от склеростин води до различни резултати. При мезенхимните клетки-предшественици ефектът е насочване на диференциацията към адипоцитен фенотип. При зрелите остеобласти резултатът е по-ниска преживяемост, активиране на апоптотичните каскади и намаляване на продукцията на остеобласт-специфични белтъци. Намалява секрецията на остеопротегерин и нараства тази на RANKL, т.е. косвено се стимулира остеокластното узряване и активност. По този начин е възможно склеростин да осъществява своеобразна отрицателна обратна връзка, контролираща остеобластната популация (42).

Склеростин оказва и автокринно действие върху остеоцита. Сходно на наблюдаваното при остеобластите, блокирането на Wnt пътя в остеоцитите увеличава експресията на RANKL и намалява тази на остеопротегерин, т.е. транслира се в привличане и активиране на остеокластните предшественици и зрелите остеокласти.

По този начин остеоцитите едновременно дирижират формирането, преживяемостта и активността и на двата типа ефекторни костни

клетки. В наскоро публикувано проучване Koide M. и сътр. демонстрират, че склеростиновата продукция се потиска от фактори, секретирани от активираните остеокласти, и по-конкретно от LIF (левкемия-инхибиращ фактор) (43).

Редица локални и системни фактори регулират продукцията на склеростин. Механичното натоварване и интермитентното приложение на PTH потискат експресията на склеростин в остеоцитите, докато RANKL и Macrophage colony stimulating factor 1 (CSF1) намаляват продукцията му от преостеокласта. Друг фактор в регулацията на склеростин са половите стероиди. Естрогените намаляват продукцията на склеростин. След менопаузата при жените склеростиновите нива нарастват паралелно с маркерите на костното разграждане.

Тъй като инактивиращите мутации в SOST водят до заболявания с висока костна маса при хора и животински модели и експресията на склеростин изглежда ограничена в костните клетки, инхибирането му се очертава като атрактивна изследователска цел, която понастоящем напредва чрез предклинични изпитвания (44). Предварителни проучвания с хуманизирано моноклонално антитяло срещу склеростин показват костен анаболизъм при животни и хора.

### Тиреоидни хормони и костен метаболизъм

Действията на  $T_3$  в костта са комплексни и само частично разбрани. Съществуват данни за преките и непреки пътища на въздействие във всички фази на костния ремоделиращ цикъл, стимулиране както на формирането, така и на резорбцията (45). По време на костното формиране  $T_3$  стимулира пролиферацията на остеобластите, тяхната диференциация и апоптоза и увеличава експресията на остеокалцин, колаген тип 1, алкална фосфатаза, металопроотеинази, IGF-1 и неговия рецептор (IGF-1R). Впоследствие, по време на костната резорбция,  $T_3$  увеличава експресията на важни фактори на диференциация в остеокластната клетъчна линия като интерлевкин 6 и простагландин E2 (46).  $T_3$  действа синергично с остеокластогенните хормони като PTH (47) и Витамин D. Известно е също, че  $T_3$  увеличава експресията на RANKL-мРНК в остеобластите, който активира RANK в остеокластните прекурсори, ключов етап в остеокластогенезата (45).

Проучванията, използващи животински модели, генетично модифицирани за TR и D2 и с вроген хипотиреоидизъм, са допринесли значително за разбиране на остеоминаралните ефекти на TH. Резултатите сочат, че мишките с мутация

на TR $\beta$  или и на двата рецептора  $\alpha$  и  $\beta$ , имат същия фенотип с изоставяне в растежа, забавена осификация, постнатален растеж и костна минерализация, забавено затваряне на черепните шевове в ранен стадий на живота и повишена минерализация при възрастните, както се наблюдава при хипотиреоидизъм, но с по-малка тежест. Обратно, мишките с мутация в TR $\beta$  гена показват тиреотоксичен скелетен фенотип с повишена минерализация и напреднала осификация, което води до нисък ръст и краниосиностоза в детска възраст, намалена минерализация и ниска костна маса в зряла възраст (48). T $_3$  регулира хондрогенезата и костната минерализация (49). Въпреки това, по-малката тежест на промените в скелетния фенотип на TR мутанти, сравнена с мишки с дефицит или излишък от TX, предполага значително припокриване на действието на тези два рецептора по отношение на контрола върху развитието на костите. По този начин, TR $\beta$  и TR $\alpha$  са взаимозаменяеми, въпреки че компенсаторните ефекти са непълни, като някои от тях са изоформ-специфични.

Съществуват множество литературни данни относно *in vitro* ефектите на TX върху костното ремоделиране, както резорбция, така и формиране. От друга страна, Gothe S. и сътр. доказват, че няма декулпиране на ремоделирането при мишки, които нямат TR $\alpha$ 1 и TR $\beta$  (50). Вместо това тези мишки показват скелетна морфогенеза, характеризираща се с изоставяне в растежа и аномалии в растежните плаки. Фактът, че дефицитът на  $\alpha$ 1/ $\beta$  TR по същество не произвежда ремоделиращ фенотип, принуждава изследователите да спекулират, че остеопорозата и повишената костна маса, наблюдавани съответно при хипер- и хипотиреоидизъм, могат да бъдат обяснени от промените нива на TSH (50).

### **Ролята на TSH върху костта**

Експресия на TSH рецептора (TSHR) е доказана в остеобласти и остеокластни предшественици, което предполага, че TSH може да има директен ефект върху тези клетки (51). Идентифицирането на TSHR в различни тъкани, включително мозъка, хипофизата, тестисите, бъбреците, сърцето, тимуса, лимфоцитите, мастната тъкан, фибробластите и костите, предполага, че TSH може да играе по-широка роля от традиционно познатата стимулация на тиреоидните фоликулни клетки (52). Установено е влиянието на TSH върху костта, което е независимо от действията на TX (53). Abe E. и сътр. (51) публикуват доказателства за преките ефекти на TSH върху двата компонентна скелетното ремоделиране,

остеобластно костно формиране и остеокластна костна резорбция, медируани чрез TSH рецептора. Това е подкрепено от проучвания с използване на TSHR (null) негативни мишки. Дори 50% намаление на експресията на TSHR предизвиква тежка остеопороза (костна загуба) и фокална остеоосклероза (локализирано костно образуване). Заместителната терапия с тиреоидни хормони при тези животни не възстановява костната маса, но коригира растежния дефицит (54). Изглежда, че TSHR самостоятелно модулират резорбцията и формирането. Тези TSHR knockout мишки имат фокална склероза в допълнение към високо ремоделиращата остеопороза, което предполага, че остеобластната активност е автономна и е частично пространствено дисоциирана от резорбцията. Костообразуването се появява в места, които не са били резорбирани преди това, което води до фокален склеротичен фенотип, придружаващ остеопеничното състояние. Това е в съответствие с демонстрираното, че *in vitro* ефектите на TSH възникват отделно върху остеобластите и остеокластните прекурсори. Така, TSH инхибира и остеокластогенезата, и остеобластогенезата чрез различни и несвързани механизми.

Друго изследване предполага, че TSH, свързан с неговия рецептор в костните клетки, инхибира остеокластогенезата чрез атенюване на JNK N-терминална киназа (JNK) и NF- $\kappa$ B сигнализация. В съответствие с това, Ma R. и сътр. (53) установяват, че при болестта на Базедов-Грейвс тиреоид-рецепторното антитяло (TRAb) намалява костната загуба и противодейства на катаболните ефекти на високите нива на TX в кръвообращението.

Остеокласт-инхибиторните действия на TSH са частично медируани и чрез ефекти върху продукцията на тумор некрозис фактор (TNF)- $\alpha$ , както е видно при миши модели (51). Мишките, при които липсва TSHR, развиват остеопороза рано в ембриогенезата, поради повишено образуване на остеокласти (51, 54). Тези наблюдения не са потвърдени при двойно негативните мишки – за TSHR и TNF- $\alpha$ , потвърждаващи ролята на TNF- $\alpha$  при повишената остеокластогенеза (51-54). Yamashita K. и сътр. (55) описват RANKL отговорни елементи върху TNF- $\alpha$  гена, което води до нови аспекти в регулирането на TNF транскрипцията при образуването на остеокласти. Ролята на TSH върху RANKL остава спорна, тъй като е доказано, че прилагането на екзогенен рекомбинантен TSH при едни от животинските модели и хора увеличава серумните нива на RANKL, а в други серии – ги понижава. Ролята на TSH в остеобластогенезата изглежда е медируана чрез

инхибиране на Wnt и VEGF сигнализирането (51). Установено е, че експресията на LDL receptor-related protein (LRP) 5, Wnt ко-рецептор и Flk-1 протеин, рецептор за VEGF, са намалени значително в отговор на TSH в първичните остеообласти (51). Експресията на тези рецептори, но не и на рецепторите на остеообластните транскрипционни фактори, се инхибира от rhTSH. Тези наблюдения показват, че TSH модулира негативен костния обмен, но са необходими допълнителни проучвания, за да се изяснят по-добре регулаторните пътища.

Новите доказателства за преките ефекти на TSH върху костта дават основание за търсене на допълнителни механизми за появата на тиреоид-асоцираната костна болест. Изследователите предоставят убедителни аргументи относно регулиране на костното ремоделиране от TSH и TSHR, както и на скелетната морфогенеза от тиреоидните хормони. Ще бъде предизвикателство да се определи приносът на TSH и TX при първичните нарушения на щитовидната жлеза. Независимо от това, са необходими допълнителни изследвания, за да се установи дали костният катаболизъм е синергично стимулиран от потиснатите нива на TSH в серума при първичен хипертиреозидизъм и обратното, ако TSH има защитни скелетни ефекти при първичен хипотиреозидизъм. Във връзка и със скорошното откриване на експресията на RANKL и OPG в тиреоидните фоликули (56) би могло да се предположи, че щитовидната жлеза е в състояние да регулира скелетната морфогенеза и ремоделиране по необичайни начини, които изискват по-нататъшни изследвания.

### Плазмени нива на остеопротегерин при тиреоидна дисфункция

Остеопротегерин (OPG), член на фамилията на рецептора на TNF, е идентифициран като регулатор на костната резорбция (57). OPG, освен от костите, се произвежда от различни тъкани, като сърдечно-съдовата система (съдови клетки, включително коронарни гладкомускулни клетки и ендотелни клетки *in vitro* (58)), белодробни, бъбречни и имунни клетки, клетките в кожа, стомах, плацентата (57). OPG протектира големите кръвоносни съдове от калцификация, въз основа на наблюдението за наличие на бъбречни и аортни калцификати, възникващи при OPG knockout мишки. Беше показано, че OPG дефицитните мишки развиват тежка остеопороза и калцификации на аортата и бъбречните артерии (59) и че OPG имунореактивността може да бъде демонстрирана при атеросклеротични лезии в човешките тъкани. Съществуват и проучвания, показващи

връзка между високи плазмени нива на OPG и сърдечно-съдови заболявания, захарен диабет и хронична бъбречна недостатъчност, включително има данни повишен серумен OPG като рисков фактор за сърдечно-съдова смъртност (60). Плазмените нива на OPG при пациенти с хипертиреозидизъм или с хипотиреозидизъм са изследвани в няколко проучвания, показващи непоследователни резултати. Високи базови нива на OPG са наблюдавани при тиреоидна дисфункция в насока и на хипо- и на хипертиреозидизъм, както и понижено ниво на OPG при лечение на двете състояния. Nagasaki T. и сътр. (61) демонстрират значима връзка между повишения серумен OPG и наличието и тежестта на коронарната сърдечна болест. Те съобщават, че дебелината на интима-медия слоя (IMT) в общата каротидна артерия, показател за сърдечно-съдови събития, се увеличава при пациенти с хипотиреозидизъм и повишената IMT се нормализира след една година заместителна терапия с левотироксин (L-T4). В друго проучване на същите автори е демонстрирано, че серумното ниво на OPG е значително по-високо при пациенти с хипотиреозидизъм, отколкото при нормални контроли и че повишеният серумен OPG след нормализиране на тиреоидната функция се връща до нормалните нива, които са поддържани в този диапазон в продължение на 1 година. Тези данни съвпадат с данните от предишен доклад, показващ, че серумните нива на остеопротегерин корелират с дебелината интима-медия в каротидните артерии при здрави жени в постменопауза (62).

Освен това се предполага, че повишаването на серумните нива на OPG при пациенти с хипотиреозидизъм независимо се асоциира с васкуларното увреждане, което се дължи на повишените плазмени нива на vWF, но не и на тежестта на хипотиреозидизма. Наблюдавана е значима положителна корелация между изходните OPG и изходните vWF или TSH при пациенти с хипотиреозидизъм. Тъй като vWF е надежден параметър за ендотелно съдово увреждане, особено при пациенти с хипотиреозидизъм (63), авторите подкрепят идеята, че повишаването на серумните нива на OPG също е надежден маркер за съдово увреждане при хипотиреозидизъм.

Шинков А. и сътр. (64) изследват нивата на OPG и остеокалцин при лица с явен и субклиничен хипотиреозидизъм. Те установяват, че нивата на OPG са значително по-високи както при клиничния хипотиреозидизъм, така и при субклиничния хипотиреозидизъм, корелиращи с по-висока честота на ИБС, но не и на артериална хипертония и захарен диабет. Остеокалцин не следва зависимостта на OPG, вероятно в резултат на други

регулаторни механизми. Авторите посочват необходимостта от разширяване на изследването и лонгитудинално проследяване за изясняване на значението на установените закономерности в еволюцията на заболяването (64).

### Модулиране на Wnt сигналния път от тиреоидните хормони

Регулацията на Wnt сигналния път от тиреоидните хормони е изследвано *in vivo* в скорошни проучвания. O,Shea P.J. и сътр. откриват Wnt сигнализиране в костната тъкан на TR $\beta$  мутантни мишки, които са с ускорено скелетно развитие поради високите нива на ТХ, възникнали от нарушена хипофизо-тиреоидна ос в резултат на доминиращата отрицателна мутация в TR $\beta$  гена (65). Авторите установяват, че стимулирането на Т<sub>3</sub> в остеогенните клетки *in vitro* инхибира Wnt сигнализирането. По-нататъшен анализ разкрива, че несвързаният с лиганд TR $\beta$  стабилизира  $\beta$ -катенина в цитозола, докато Т<sub>3</sub>, свързан с неговия рецептор, се конкурира със свързването на  $\beta$ -катенин, което го прави достъпен за протеозомно разграждане (65). Това проучване предоставя първото доказателство за връзка между тиреоидната ос и сигнализацията Wnt. В друго проучване Tsourdi E. и сътр. (66) изследват влиянието на хипертиреоидизма и хипотиреоидизма при мишки върху плазмените нива на DKK-1 и склеростин, два инхибитора на Wnt сигнализирането. Те установяват, че серумните концентрации на DKK1 са понижени при хипертиреоидните мишки, които имат повишено костно формиране и са повишени при хипотиреоидните мишки, които имат намалена скорост на костно формиране. Серумните концентрации на склеростин са повишени и при двата модела, независимо от скоростта на костобразуване. Тъй като склеростинът е продукт на остеоцитите и поради това е зависим от костната маса и наличието на остеоцити, авторите отнасят серумните

концентрации на склеростин към костната минерална плътност (КМП) и установяват, че хипертиреоидните мишки, поради ниската КМП, имат дори по-високи нива на склеростин, докато хипотиреоидните мишки с тяхната по-висока КМП, имат сходни концентрации на склеростин в сравнение с еутиреоидните мишки. По този начин, въпреки че серумните концентрации на DKK1 индиректно отразяват повишената скорост на костно формиране при хипертиреоидните мишки, серумните нива на склеростин биха могли да се явят компенсаторен механизъм за ограничаване на по-нататъшното стимулиране на остеобластите.

При корелационните анализи, които съпоставят склеростин и DKK1 с КМП и параметрите на костното ремоделиране, склеростин корелира положително основно с КМП при еутиреоидни мишки, DKK1 корелира с маркерите за костен turnover във всички проследявани групи. Тези данни са в съответствие с проучванията при хора и показват, че склеростинът корелира с КМП, докато DKK1 би могъл да се използва за оценка на костния обмен. Друга важна констатация са разликите в серумните им концентрации и отрицателната зависимост между тях.

**В заключение** регулацията на костната обмяна е сложен процес, в който участват клетките на костта, костния мозък и разнообразни локални и системни хуморални фактори. През последните десетилетия се натрупаха много нови данни за взаимодействието между клетките в костната тъкан. Подробното опознаване на молекулярните и клетъчни механизми създаде нова концепция за костната патофизиология. Тиреоидните хормони са ключови регулатори на костната хомеостаза. Модулацията на основни сигнални пътища от тиреоидните хормони може да допринесе за тиреоид-асоциираната костна болест и промяната в експресията на определени молекули се явява потенциален терапевтичен таргет.

1. Gogakos AI, Duncan Bassett JH, Williams GR. Thyroid and bone. *Arch Biochem Biophys* 2010;503(1):129-136.
2. Rivkees SA, Bode HH, Crawford JD. Long-term growth in juvenile acquired hypothyroidism: the failure to achieve normal adult stature. *N Engl J Med* 1988; 318(10): 599-602.
3. Segni M, Leonardi E, Mazzoncini B, Pucarelli I, Pasquino AM. Special features of Graves, disease in early childhood. *Thyroid* 1999;9(9):871-877.
4. Mosekilde L, Eriksen EF, Charles P. Effects of thyroid hormones on bone and mineral metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1990;19(1):35-63.
5. Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Influence of hyper- and hypothyroidism, and the effects of treatment with antithyroid drugs and levothyroxine on fracture risk. *Calcif Tissue Int* 2005; 77(3):139-144.
6. Abrahamsen B, Jørgensen HL, Laulund AS, Nybo M, Brix TH, Hegedüs L. Low serum thyrotropin level and duration of suppression as a predictor of major osteoporotic fractures-the OPENTHYRO register cohort. *J Bone Miner Res* 2014;29(9):2040-2050.
7. Vestergaard P, Mosekilde L. Hyperthyroidism, bone mineral, and fracture risk—a meta-analysis. *Thyroid* 2003;13(6):585-593.
8. Forrest D, Sjöberg M, Vennström B. Contrasting developmental and tissue-specific expression of alpha and beta thyroid hormone receptor genes. *EMBO J* 1990;9(5):1519-1528.
9. Bassett JH, Williams GR. The skeletal phenotypes of TRalpha and TRbeta mutant mice. *J Mol Endocrinol* 2009;42(4):269-282.
10. Abu EO, Bord S, Horner A, Chatterjee VK, Compston JE. The expression of thyroid hormone receptors in human bone. *Bone* 1997;21(2):137-142.
11. Robson H, Siebler T, Stevens DA, Shalet SM, Williams GR. Thyroid hormone acts directly on growth plate chondrocytes to promote hypertrophic differentiation and inhibit clonal expansion and cell proliferation. *Endocrinology* 2000;141(10):3887-3897.
12. Banovac K, Koren E. Triiodothyronine stimulates the release of membrane-bound alkaline phosphatase in osteoblastic cells. *Calcif Tissue Int* 2000;67(6): 460-465.
13. Gouveia CH, Schultz JJ, Bianco AC, Brent GA. Thyroid hormone stimulation of osteocalcin gene expression in ROS 17/2.8 cells is mediated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Endocrinol* 2001 Sep;170(3):667-75.
14. Varga F, Rumpler M, Luegmayer E, Fratzl-Zelman N, Glantschnig H, Klaushofer K. Triiodothyronine, a regulator of osteoblastic differentiation:depression of histone H4, attenuation of c-fos/c-jun, and induction of osteocalcin expression. *Calcif Tissue Int* 1997;61(5):404-411.
15. Siddiqi A, Burrin JM, Wood DF, Monson JP. Triiodothyronine regulates the production of interleukin-6 and interleukin-8 in human bone marrow stromal and osteoblast-like cells. *J Endocrinol* 1998;157(3):453-461.
16. Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* 2006;116(5):1202-1209.
17. Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, MacDougald OA. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(9):3324-3329.
18. Glantschnig H, Hampton RA, Lu P, Zhao JZ, Vitelli S, Huang L et al. Generation and selection of novel fully human monoclonal antibodies that neutralize Dickkopf-1 (DKK1) inhibitory function in vitro and increase bone mass in vivo. *J Biol Chem* 2010;285(51):40135-40147.
19. Costa AG, Bilezikian JP, Lewiecki EM. Update on romosozumab: a humanized monoclonal antibody to sclerostin. *Expert Opin Biol Ther* 2014;14(5):697-707.
20. Eriksen EF. Normal and pathological remodeling of human trabecular bone: three dimensional reconstruction of the remodeling sequence in normals and in metabolic bone disease. *Endocr Rev* 1986;7(4):379-408.
21. Eriksen EF, Melsen F, Mosekilde L. Reconstruction of the resorptive site in iliac trabecular bone: a kinetic model for bone resorption in 20 normal individuals. *Metab Bone Dis Relat Res* 1984;5(5):235-242.
22. Eriksen EF, Hodgson SF, Eastell R, Cedel SL, O'Fallon WM, Riggs BL. Cancellous bone remodeling in type I (postmenopausal) osteoporosis: quantitative assessment of rates of formation, resorption, and bone loss at tissue and cellular levels. *J Bone Miner Res* 1990;5(4):311-319.
23. Agerbaek MO, Eriksen EF, Kragstrup J, Mosekilde L, Melsen F. A reconstruction of the remodelling cycle in normal human cortical iliac bone. *Bone Miner* 1991;12(2):101-112.
24. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997 Apr 18;89(2):309-19.
25. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997;89(5):755-764.
26. Lian JB, Stein GS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, et al. Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord* 2006; 7(1-2):1-16.
27. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002;108(1):17-29.
28. Murshed M, Harmey D, Millán JL, McKee MD, Karsenty G. Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes Dev* 2005;19(9):1093-104.
29. Schaffler MB, Cheung WY, Majeska R, Kennedy O. Osteocytes: master orchestrators of bone. *Calcif Tissue Int* 2014;94(1):5-24.
30. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* 2006;235(1):176-190.
31. Bonewald L. Osteocytes as multifunctional cells. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006; 6(4):331-333.
32. Qin L, Qiu P, Wang L, Li X, Swarthout JT, Soteropoulos P, Tolias P, Partridge NC. Gene expression profiles and transcription factors involved in parathyroid hormone signaling in osteoblasts revealed by microarray and bioinformatics. *J Biol Chem* 2003;278(22):19723-31
33. Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* 2004;341:19-39.
34. van Amerongen R, Mikels A, Nusse R. Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Sci Signal* 2008;1(35):re9.
35. Ukita M, Yamaguchi T, Ohata N, Tamura M. Sclerostin Enhances Adipocyte Differentiation in 3T3-L1 Cells. *J Cell Biochem* 2016;117(6):1419-1428.
36. Monroe DG, McGee-Lawrence ME, Oursler MJ, Westendorf JJ. Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. *Gene* 2012;492(1):1-18.
37. Ellies DL, Viviano B, McCarthy J, Rey JP, Itasaki N, Saunders S, Krumlauf R. Bone density ligand, Sclerostin, directly interacts with LRP5 but not LRP5G171V to modulate Wnt activity. *J Bone Miner Res* 2006;21(11):1738-1749.
38. Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, et al. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* 2005;280(20):19883-19887.
39. Mao B, Wu W, Li Y, Hoppe D, Stanek P, Glinka A, Niehrs C. LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* 2001;411(6835):321-325.
40. Morvan F, Boulukos K, Clément-Lacroix P, Roman Roman S, Suc-Royer I, Vayssière B. Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *J Bone Miner Res* 2006; 21(6):934-945.
41. Weivoda MM, Youssef SJ, Oursler MJ. Sclerostin expression and functions beyond the osteocyte. *Bone* 2017;96:45-50.
42. ten Dijke P, Krause C, de Gorter DJ, Löwik CW, van Bezooijen RL. Osteocyte-derived sclerostin inhibits bone formation: its role in bone morphogenetic protein and Wnt signaling. *J Bone Joint Surg Am* 2008;90 Suppl 1:31-35.
43. Koide M, Kobayashi Y, Yamashita T, Uehara S, Nakamura M, Hiraoka BY, et al. Bone Formation Is Coupled to Resorption Via Suppression of Sclerostin Expression by Osteoclasts. *J Bone Miner Res* 2017;32(10):2074-2086.

43. Koide M, Kobayashi Y, Yamashita T, Uehara S, Nakamura M, Hiraoka BY, et al. Bone Formation Is Coupled to Resorption Via Suppression of Sclerostin Expression by Osteoclasts. *J Bone Miner Res* 2017;32(10):2074-2086.
44. Li X, Ominsky MS, Warmington KS, Morony S, Gong J, Cao J et al. Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *Bone Miner Res*. 2009 Apr;24(4):578-88.
45. Nicholls JJ, Brassill MJ, Williams GR, Bassett JH. The skeletal consequences of thyrotoxicosis. *J Endocrinol* 2012;213(3):209-221.
46. Bassett JH, Williams GR. The skeletal phenotypes of TRalpha and TRbeta mutant mice. *J Mol Endocrinol* 2009;42(4):269-282.
47. Gu WX, Stern PH, Madison LD, Du GG. Mutual up-regulation of thyroid hormone and parathyroid hormone receptors in rat osteoblastic osteosarcoma 17/2.8 cells. *Endocrinology* 2001;142(1):157-164.
48. O'Shea PJ, Bassett JH, Srisankarajah S, Ying H, Cheng SY, Williams GR. Contrasting skeletal phenotypes in mice with an identical mutation targeted to thyroid hormonereceptor alpha1 or beta. *Mol Endocrinol* 2005;19(12):3045-3059.
49. Wexler JA, Sharretts J. Thyroid and bone. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2007; 36(3):673-705.
50. Gothe S, Wang Z, Ng L, Kindblomm JM, Barrosm AC, Ohlssonm C, et al. Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes Dev* 1999;13: 1329-1341.
51. Abe E, Marians RC, Yu W, Wu XB, Ando T, Li Y et al. TSH is a negative regulator of skeletal remodeling. *Cell*. 2003 Oct 17;115(2):151-62.
52. Davies T, Marians R, Latif R. The TSH receptor reveals itself. *J Clin Invest* 2002;110(2):161-164.
53. Ma R, Morshed S, Latif R, Zaidi M, Davies TF. The influence of thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor antibodies on osteoclastogenesis. *Thyroid* 2011;21(8):897-906.
54. Hase H, Ando T, Eldeiry L, Brebene A, Peng Y, Liu L et al. TNFalpha mediates the skeletal effects of thyroid-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(34):12849-54.
55. Yamoah K, Oashi T, Sarikas A, Gazdoiu S, Osman R, Pan ZQ. Autoinhibitory regulation of SCF-mediated ubiquitination by human cullin 1,s C-terminal tail *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:12230-12235.
56. Hofbauer LC, Kluger S, Kühne CA, Dunstan CR, Burchert A, Schoppet M et al. Detection and characterization of RANK ligand and osteoprotegerin in the thyroid gland. *J Cell Biochem*. 2002;86(4):642-650.
57. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89(2):309-319.
58. Hofbauer LC, Shui C, Riggs BL, Dunstan CR, Spelsberg TC, O'Brien T. Effects of immunosuppressants on receptor activator of NF-kappaB ligand and osteoprotegerin production by human osteoblastic and coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280(1):334-339.
59. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998;12(9):1260-1268.
60. Kiechl S, Schett G, Wenning G, Redlich K, Oberhollenzer M, Mayr A et al. Osteoprotegerin is a risk factor for progressive atherosclerosis and cardiovascular disease. *Circulation* 2004; 109(18):2175-2180.
61. Nagasaki T, Inaba M, Henmi Y, Kumeda Y, Ueda M, Tahara H, et al. Decrease in carotid intima-media thickness in hypothyroid patients after normalization of thyroid function. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003 Nov;59(5):607-12.
62. Nagasaki T, Inaba M, Henmi Y, Kumeda Y, Ueda M, Tahara H, et al. Change in von Willebrand factor and carotid intima-media thickness in hypothyroid patients with normal thyroid function after levothyroxine replacement therapy. *Eur J Endocrinol*. 2004 Feb;150(2):125-31.
63. Erdogan B, Aslan E, Bagis T, Gokcel A, Erkanli S, Bavbek M, Altinors N. Intima-media thickness of the carotid arteries is related to serum osteoprotegerin levels in healthy postmenopausal women. *Neurol Res* 2004;26(6):658-661.
64. Shinkov A, Atanassova I, Borissova A-M, Kovatcheva R, Vlahov J, Aslanova N, et al. Increased Serum Osteoprotegerin But not Osteocalcin in Subjects with Hypothyroidism. *Endocrinologia* 2008,13 (1), pp. 5-15.
65. O'Shea PJ, Kim DW, Logan JG, Davis S, Walker RL, Meltzer PS, Cheng SY, Williams GR. Advanced bone formation in mice with a dominant-negative mutation in the thyroid hormonereceptor beta gene due to activation of Wnt/beta-catenin protein signaling. *J Biol Chem*. 2012 May 18;287(21):17812-22.
66. Tsoardi E, Rijntjes E, Köhrle J, Hofbauer LC, Rauner M. Hyperthyroidism and Hypothyroidism in Male Mice and Their Effects on Bone Mass, Bone Turnover, and the Wnt Inhibitors Sclerostin and Dickkopf-1. *Endocrinology*. 2015 Oct;156(10):3517-27.

## Address for correspondence:

- Д-р Мария Митева,
- Клиника по Ендокринология и болести на
- обмяната, УМБАЛ „Св. Георги“,
- ул. „Васил Априлов“ №15А, Пловдив, 4000,
- e-mail: m\_miteva@yahoo.com
- Dr Maria Miteva,
- Clinic of Endocrinology and metabolic diseases,
- „Sv. Georgy“ University Hospital,
- 15A „Vassil Aprilov“ Str., 4000 Plovdiv
- e-mail: m\_miteva@yahoo.com

## Асоциация между някои ехографски параметри и нивата на TSH-рецепторните антитела

Стойнова, Мария А., Шинков, Александър Д., Ковачева, Русанка Д.

Катедра по Ендокринология, Медицински Университет, София, УСБАЛЕ „Акад. Иван Пенчев“

### Адрес за кореспонденция:

Д-р Мария Стойнова,  
УСБАЛЕ „Акад. Иван Пенчев“, ул. „Здраве“ № 2, София 1431,  
e-mail: mariya.stoynova@abv.bg

### Резюме

**Цел:** Базедовата болест е аутоимунно заболяване, в чиято диагноза важна роля играят ехографското изследване и определянето на TSH-рецепторните антитела (TRAb). TRAb имат отношение и към прогнозата на заболяването – негативизирането им в хода на тиреостатичното лечение се свързва с по-нисък риск от рецидиви.

**Цел** на настоящето изследване е да се проучи връзката между някои ехографски параметри и нивата на TRAb при пациенти с Базедова болест.

**Материал и методи:** В изследването са включени 66 пациента (52 жени, 14 мъже) с Базедова болест под тиреостатично лечение, средна възраст – 49,5 години (23-79 г.), продължителност на заболяването – 19,5 месеца (4-58 мес.). Пациентите са разделени в две групи: Група 1 – с позитивни TRAb (n=34); Група 2 – с негативни TRAb (n=32). При всички пациенти са изследвани TSH, FT<sub>4</sub>, TRAb и е проведена ехография на щитовидната жлеза с определяне на обема, ехогенността, кръвотока на паренхима и наличието на нодозни промени.

**Резултати:** Обемът на щитовидната жлеза е значимо по-голям при пациентите от Група 1 (15 ml срещу 10,5 ml, p=0,047). Сред тях значимо по-често се открива хипоехогенност от II и III ст. (p=0,047) и повишен кръвоток (p<0,001). Честотата на нодозните промени в Група 1 е 35%, докато в Група 2 е 44% (p=0,62).

**Заключение:** Увеличеният обем на щитовидната жлеза, повишеният кръвоток и изразената хипоехогенност се срещат по-често при пациентите с Базедова болест с персистираща имунологична активност, явявайки се негативни прогностични фактори за постигане на имунологична ремисия.

**Ключови думи:** Базедова болест, TSH-рецепторни антитела (TRAb), тиреоиден обем, кръвоток, ехогенност.

## Въведение

Базедовата болест е автоимунно заболяване и преобладаваща причина за хипертиреозидизъм с честота приблизително 5-10/1000 души. Основна роля в патогенезата ѝ играят TSH-рецепторните антитела (TRAb), които стимулират хормоналното производство и пролиферацията на тиреоцитите. Нивата на TRAb обикновено са най-високи при изявата на заболяването и намаляват в хода на тиреостатично лечение. Основна цел на тиреостатичното лечение е постигането на хормонална и последваща имунологична ремисия с негативизиране на TRAb. Последното е важно условие при вземане на решение за преустановяване на тиреостатичната терапия и е свързано с възможно най-нисък риск от рецидив на заболяването (1).

Ултразвукът изследване е един от основните методи за диагностика на Базедовата болест. То помага за разграничаването ѝ от други форми на тиреотоксикоза и е особено полезно при невъзможност за изследване на TRAb, както и в редките случаи на TRAb-негативна Базедова болест. Обичайна находка при диагностициране на заболяването е увеличен обем на щитовидната жлеза, повишена васкуларизация, нехомогенност на паренхима и намалена ехогенност (2). Връзката между тези ехографски параметри и имунологичния статус не е достатъчно проучена.

Целта на настоящето изследване е да се потърси връзка между някои ехографски параметри и нивата на TRAb при пациенти с Базедова болест под тиреостатична терапия.

## Материали и методи

За периода от февруари до юни 2019 г. в Трета клиника на Университетска специализирана болница за активно лечение по ендокринология (УСБАЛЕ) са хоспитализирани общо 98 пациента с тиреотоксикоза. В настоящето проучване са включени 66 пациента с Базедова болест (52 жени, 14 мъже), средна възраст – 42,3 години, под тиреостатично лечение и средна продължителност на заболяването – 21,3 месеца, които отговарят на следните включващи и изключващи критерии:

**Включващи критерии** – пациенти с Базедова болест, диагностицирана на базата на хормонална констелация за тиреотоксикоза и позитивни TRAb, в еутиреоидно състояние на фона на тиреостатична терапия към момента на изследването.

**Изключващи критерии** – пациенти с рецидив на Базедовата болест след проведено оперативно лечение или радиоидотерапия; пациенти с хипертиреозидизъм и негативни TRAb при диагностицирането на заболяването; пациенти с Базедова болест, които приемат или са приемали в последната година глюкокортикоиди или други имуномодулиращи средства; пациенти с други форми на хипертиреозидизъм – ногозна базедовицирана струма, токсичен аденом, йод-Базедов и др.

В проучването са включени и 20 здрави контроли (18 жени, 2 мъже; средна възраст 34 г.) без хормонални, имунологични и ехографски данни за заболяване на щитовидната жлеза, за оценка на кръвотока на тиреоидния паренхим.

При всички пациенти са изследвани тиреоидни хормони (TSH, FT<sub>4</sub>) и TRAb. Определянето на TSH и FT<sub>4</sub> е осъществено чрез радиоимунологичен метод, а измерването на TRAb – чрез радио-рецепторен анализ с китове на BRAHMS GmbH. Информацията относно давността на заболяването и изходния имунологичен статус (TRAb, anti-TPO, TAT) е набавена от предоставената медицинска документация.

При всички пациенти и при здравите контроли е проведено ехографско изследване с ултразвуков апарат ALOKA ProSound Alpha 6, с линейна сонда (13,3 MHz), от един изследовател преди получаване на резултатите относно настоящия хормонален и имунологичен статус. Оценени са следните ехографски параметри – обем, ехогенност, кръвоток и наличие на ногозни промени.

**Определяне на обема:** Чрез ехографско изследване са измерени диаметрите на двата лоба – надлъжен (l), предно-заден (d) и трансверзален (w). В случай на надлъжен диаметър >4 см, за измерването му е използвана техниката „two-image“ или трапецовиден прозорец. Обемите на двата лоба са изчислени по формулата за елипсоид –  $V [ml] = 0,479 \times d \times w \times l [cm]$ . Общият обем на щитовидната жлеза е представен като сума от обемите на двата лоба, без да се включва истмусът.

**Определяне на ехогенността:** Ехогенността на тиреоидния паренхим е оценена чрез съпоставянето ѝ с тази на други шийни структури и е категоризирана като:

- 1) нормална – еднаква с тази на подкожието;
- 2) хипоехогенност I ст. – по-ниска от тази на подкожната тъкан, но по-висока от тази на шийните мускули;
- 3) хипоехогенност II ст. – равна на тази на шийните мускули;
- 4) хипоехогенност III ст. – по-ниска от тази на шийните мускули. При анализа на резултати-

те ехогенността е разделена в две обобщени категории: а) норма- и хипоехогенност I ст. и б) изразена хипоехогенност, включваща хипоехогенност от II и III ст.

**Определяне на кръвотока:** При изследване с Color Doppler е определен броят на интрапаренхимните съдове на квадратен сантиметър тиреоиден паренхим. За дефиниране на нормалния кръвоток изследвахме 20 здрави контроли, като при 19 от тях (95%) броят на интрапаренхимните съдове не надвишаваше 4/см<sup>2</sup>. При оценката на кръвотока на щитовидната жлеза на двете групи пациенти приемаме, че той е нормален при наличие на ≤4 интрапаренхимни съда/см<sup>2</sup> и повишен – при >4 интрапаренхимни съда/см<sup>2</sup>.

**Определяне на наличието на нодозни промени:** При всички пациенти е описана структурата на жлезата и наличието или липсата на нодозни промени в нея. Анализът на възлите (брой, размер, форма, ехогеност и др.) не е предмет на настоящето проучване.

Пациентите с Базедова болест са разделени в две групи според имунологичната активност към момента на изследването:

**Група 1** – с повишена имунологична активност (TRAb >2 mIU/ml, n=34);

**Група 2** – без имунологична активност (TRAb ≤2 mIU/ml, n=32).

**Статистически методи.** В проучването са използвани подходящи за поставените цели и

адекватни на свойствата на данните статистически методи: описателен анализ; графичен анализ; проверка на хипотези (параметрични и непараметрични методи). За изследване на честотите на разпределение на категориите променливи е използван Chi-square тест. За анализа на числовите променливи в зависимост от нормалността на разпределение са използвани съответно T-test или Mann-Whitney U test. Проверката на хипотези е извършена след предварително зададено ниво на значимост 0,05 (p<0,05). Данните са обработени със статистически пакет SPSS 19 за Windows (SPSS Inc. Chicago, IL).

## Резултати

### Сравнение на основните клинични показатели

Основните клинични характеристики на изследваните пациенти от двете групи са представени в Таблица 1.

Между двете изследвани групи пациенти липсва значима разлика по отношение на възрастта, половото разпределение, продължителността на заболяването, наличието на тиреоид-асоциирана офталмопатия (ТАО) и настоящите хормонални нива. При сравнение на цялостния имунологичен статус установяваме значимо по-високи изходни и актуални нива на TRAb, както и по-висока честота на позитивни anti-TPO средна пациентите от Група 1.

**Таблица 1.** Общи характеристики на пациентите от двете групи

	Група 1	Група 2	P
Средна възраст (гог.)	49 (23-72)	52,5 (30-79)	0,434
Жени:мъже (%)	79:21	78:22	0,950
Възраст при диагнозата (гог.)	45 (21-69)	48 (27-78)	0,555
Продължителност на заболяването (мес.)	19,5 (4-38)	20 (5-58)	0,859
Съпътстваща ТАО (%)	62	56	0,625
TSH (mIU/l)	3,0±1,1	2,25±1,3	0,256
FT <sub>4</sub> (pmol/l)	14,6±4,2	16,5±3,0	0,412
Изходни TRAb	11,2 (2,3-40)	5,89 (2,2-30)	0,012
Актуални TRAb	6,4 (2,1-40)	1 (1,0-1,9)	<0,001
Anti-TPO+ (%)	77,4	51,6	0,034
TAT+ (%)	48,4	32	0,205
Доза тиреостатик (табл/г.)	2,6±1,5	1,4±0,7	<0,001

**Таблица 2.** Сравнение на ехографските показатели на пациентите от двете групи Общи характеристики на пациентите от двете групи

Ехографски параметри	Група 1	Група 2	p
Обем на щитовидната жлеза (ml)	15,0 (5,9-63,5)	10,5 (4,7-30,0)	0,047
Ехогенност (%)			
нормо-/хипоехогенност I ст.	41,2	65,6	0,047
хипоехогенност II-III ст.	58,8	34,4	
Кръвоток (%)			
нормален	20,6	75	<0,001
повишен	79,4	25	
Нодозни промени (%)			
да	35,3	43,8	0,62
не	64,7	56,2	

Липсва значима разлика между честотата на позитивни ТАТ при двете групи. Пациентите от Група 2 приемат значимо по-ниска дневна доза тиреостатик (1.4 табл. срещу 2.6 табл.).

**Сравнение на ехографските параметри**

Двете групи пациенти са сравнени по следните ехографски параметри – обем на щитовидната жлеза, ехогенност, кръвоток и наличие на нодозни промени. Резултатите са представени в Таблица 2.

При пациентите от Група 1 се наблюдава значимо по-голям обем на щитовидната жлеза, по-голяма честота на изразена хипоехогенност (II и III ст.) и повишен кръвоток на паренхимата. Между двете групи няма разлика по отношение на наличието на възли. Установяваме и значима позитивна корелация между обема на щитовидната жлеза и повишения кръвоток на паренхимата ( $p=0,01$ ), както и гранична корелация между обема и наличието на изразена хипоехогенност ( $p=0,07$ ).

**Обсъждане**

Струмата е един от основните диагностични критерии за Базедова болест, въпреки че при част от пациентите щитовидната жлеза е с нормални размери (3). Основна роля за увеличаване тиреоиден обем играят TRAb, които стимулират не само хормоналната продукция, но и пролиферацията на тиреоцитите. Повишеният кръвоток и в по-малка степен лимфоцитната инфилтрация допринасят за увеличаването на размерите на жлезата (4). Ултразвуковото изследване е достъпен и сравнително точен метод за

определяне на обема на щитовидната жлеза. В редица проучвания е анализирана връзката между обема и вероятността за трайна ремисия (5, 6). Пациентите с ехографски по-голям обем на щитовидната жлеза, определен рано в хода на заболяването, са с по-висока честота на рецидиви след преустановяване на тиреостатичното лечение. От друга страна, честотата на рецидивите е в позитивна корелация с нивата на TRAb (7, 8). Нашите резултати показват наличие на значима корелация между имунологичната активност и обема на щитовидната жлеза, като той е значимо по-голям при пациентите с повишени TRAb на фона на тиреостатично лечение. Този факт индиректно се асоциира и с по-голямата вероятност за рецидиви при наличието на двата фактора едновременно.

Дифузно намалената ехогенност е един от ехографските критерии за диагноза на аутоимунно заболяване на щитовидната жлеза. Докато при тиреоидита на Хашимото хипоехогенността се свързва с дифузната лимфоцитна инфилтрация, при Базедовата болест намалената ехогенност се дължи на намаленото съдържание на колоид, повишаването на релативния или абсолютния клетъчен брой, лимфоцитната инфилтрация и повишения кръвоток (9). Някои автори откриват корелация между степента на хипоехогенност и нивата на циркулиращите TRAb (10, 11), което е в съответствие с резултатите от настоящето проучване. Ние установяваме изразена хипоехогенност по-често при пациентите с позитивни TRAb, докато при тези с негативизирани TRAb в хода на тиреостатичното лечение преобладава нормо- или хипоехоген-

ност I ст. Асоциацията между имунологичната активност от една страна, ехогенността и обема на щитовидната жлеза от друга, определя ролята на тези ехографски параметри като допълнителни прогностични фактори за постигането на имунологична ремисия.

При диагностициране на Базедовата болест кръвотока на щитовидната жлеза по правило е значително увеличен (12). В хода на заболяването, при адекватна тиреостатична терапия, интрапаренхимният кръвоток намалява значимо (12–14). Известно е, че подобна тенденция се наблюдава и по отношение на TRAb (1). Патогенетичният механизъм, по който интрапаренхимният кръвоток се повишава при Базедова болест, не е напълно уточнен. Повишен кръвоток рядко се открива и при аутоимунен хипотиреозизъм, което изключва високите нива на периферните тиреоидни хормони като директна причина. Възможно е хиперваскуларитетът да е проявление на аутоимунното възпаление на щитовидната жлеза. Ендотелният растежен фактор и хемокиният CXCL 10 вероятно играят роля в активирането на тиреоидната неоангиогенеза, стимули за която са съответно повишеният TSH при аутоимунния тиреоидит и TRAb при Базедова болест (15). Предполагаемата патогенетична връзка между TRAb и интрапаренхимния кръвоток се потвърждава и от настоящето проучване, което показва силна асоциация между повишения кръвоток и наличието на позитивни TRAb. Много автори считат, че кръвотока е добър маркер за терапевтична ефективност, въпреки че промените в него обичайно настъпват след нормализиране на хормоналния и имунологичния статус (16). Оценката на кръвотока би могла да служи за ориентир по отношение на ефекта от тиреостатичното лечение, което е особено ценно при невъзможност за изследване на TRAb. Методиката, използвана за оценка на кръвотока в настоящето проучване, е полуколичествена и отразява субективната преценка на ехографиста. Без да претендира за прецизност, методът е подходящ за начална оценка на кръвния ток при дифузни заболявания на щитовидната жлеза. По-точен количествен метод е оценката на скоростта на кръвния ток.

Установена е позитивна корелация между скоростта на кръвния ток и нивата на TRAb, както и сходна динамика на двата показателя в хода на заболяването (17–19). Според Saleh и сътр. количествената оценка на кръвотока е с добра предиктивна стойност по отношение на вероятността за рецидив на Базедовата болест (чувствителност

71%, специфичност 100%) (20). Vita и сътр. установяват, че при пациенти с Базедова болест повишеният интрапаренхимен кръвоток корелира с увеличен тиреоиден обем, наличие на изразена хипоехогенност и повишени нива на TRAb (21), което потвърждаваме и ние. Възможно е комбинирането на тези три ехографски параметъра, всеки от тях асоцииращ се с имунологично активно заболяване, допълнително да намалява вероятността за постигане на трайна ремисия.

В литературата липсват данни относно връзката между TRAb и наличието на нодозните промени в щитовидната жлеза. Ние не установяваме различия в честотата на възлите при пациенти с и без имунологична активност.

При оценката на имунологичния статус на пациентите с Базедова болест в съображение влиза и нивото на anti-TPO и TAT. Мекова и сътр. съобщават, че новодиагностицираните пациенти с Базедова болест и позитивни anti-TPO и/или TAT са с по-високи изходни нива на FT4 и TRAb и по-голям обем на щитовидната жлеза (22). Ние установяваме по-високи изходни нива на TRAb и по-висока честота на позитивни anti-TPO сред пациентите с персистираща имунологична активност.

Нашето проучване има някои ограничения. На първо място, изследваният брой пациенти е относително малък, което е характерно и за повечето проучвания в тази област. На второ място, дизайнът е напречно-срезов и обхванатите пациенти са с постигната терапевтична ремисия. Липсва оценка на анализирани ехографски параметри при диагностицирането на заболяването. По-нататъшно проследяване на изследваната кохорта би могло да даде информация относно динамиката на ехографските параметри в хода на заболяването.

### Заклучение

При пациентите с Базедовата болест увеличеният обем на щитовидната жлеза, повишеният кръвоток и изразената хипоехогенност се асоциират с повишена имунологична активност на заболяването. Тези ехографски параметри следва да се оценяват и проследяват в хода на тиреостатичното лечение с оглед на комплексна оценка за постигането на ремисия.

*Тази публикация е подкрепена от Министерство на образованието и науката по Националната програма за научни изследвания „Млади учени и постдокторанти“.*

## Association Between Some Ultrasound Parameters and TSH-Receptor Antibodies

Stoynova, Mariya A., Shinkov, Alexander D., Kovatcheva, Roussanka D.

Department of Endocrinology, Medical University, Sofia, University Hospital of Endocrinology „Acad. Ivan Penchev“

### Address for correspondence:

Mariya Stoynova, MD,  
University Hospital of Endocrinology „Acad. Ivan Penchev“, 2 Zdrave Str., Sofia 1431,  
e-mail: mariya.stoynova@abv.bg

### Abstract

**Introduction:** Graves' disease is an autoimmune disorder and both ultrasound examination and determination of TSH receptor antibodies (TRAb) play an important role in its diagnosis. TRAb levels are also relevant to the prognosis of the disease – their negativization in the course of antithyroid drug therapy is associated with lower risk of relapses.

**The aim** of this study is to investigate the association between some ultrasound parameters and TRAb levels in patients with Graves' disease.

**Material and methods:** The study included 66 patients (52 women, 14 men) with Graves' disease on antithyroid drugs of mean age 49,5 years (23-79 years) and disease duration of 19,5 months (4-58 months). The patients were divided into two groups: Group 1 - with positive TRAb (n=34); Group 2 - with negative TRAb (n=32). TSH, FT<sub>4</sub>, TRAb were examined in all patients and thyroid ultrasound was performed to determine the volume, echogenicity, parenchymal blood flow and nodularity of the thyroid gland.

**Results:** Thyroid volume was significantly higher in Group 1 patients (15 ml vs 10,5 ml, p=0,047). Among them marked hypoechogenicity (p=0,047) and increased blood flow (p<0,001) were found significantly more frequently. The incidence of thyroid nodules in Group 1 was 35%, while in Group 2 it was 44% (p=0,62).

**Conclusion:** Enlarged thyroid volume, increased blood flow and marked hypoechogenicity are more common in patients with Graves' disease and together with persistent immunological activity appear to be negative prognostic factors for achieving immunologic remission.

**Key words:** Graves' disease, TSH-receptor antibodies (TRAb), thyroid volume, blood flow, echogenicity.

### Introduction

Graves' disease is an autoimmune disorder and the most common form of hyperthyroidism with an incidence of approximately 5-10/1000. TSH-receptor antibodies (TRAb) play a major role in its pathogenesis by stimulating the hormonal production and proliferation of thyrocytes. TRAb levels are usually highest at the

onset of the disease and gradually decrease during the therapy with antithyroid drugs. The main goal of the treatment is to achieve hormonal and subsequent immunological remission with TRAb disappearance from circulation. The latter is an important prerequisite when considering discontinuation of antithyroid drugs and is associated with lower risk of relapses (1).

Ultrasound is one of the diagnostic tests applied

for establishing the diagnosis of Graves' disease. It helps differentiate Graves' disease from other forms of thyrotoxicosis and is especially useful when evaluation of TRAb is not possible, as well as in rare cases of TRAb-negative Graves' disease. Common ultrasound findings at the time of diagnosis of Graves' disease are enlarged thyroid volume, increased vascularization, parenchymal heterogeneity and hypoechogenicity (2). The relationship between these ultrasound parameters and the immunological status has not been sufficiently studied.

The aim of the present study was to investigate the association between some ultrasound parameters and TRAb levels in patients with Graves' disease on antithyroid drug therapy.

## Material and method

From February to June 2019, 98 patients with thyrotoxicosis were admitted to the Department of Thyroidology of the University Hospital of Endocrinology (USBALE). The present study enrolled 66 patients with Graves' disease (52 women, 14 men), median age 42,3 years, on antithyroid drugs with median disease duration 21,3 months, meeting the following inclusion and exclusion criteria:

**Inclusion criteria** – patients with Graves' disease with thyrotoxicosis and positive TRAb at the onset of the disease, currently euthyroid on antithyroid drug therapy.

**Exclusion criteria** – patients with recurrent Graves' disease after surgery or radioiodine therapy; patients with hyperthyroidism and negative TRAb at the time of diagnosis; patients with Graves' disease treated currently or within the past year with glucocorticoids or other immunomodulating medication; patients with other forms of hyperthyroidism – toxic nodular goiter, toxic adenoma, Jod-Basedow, etc.

Twenty healthy subjects (18 females, 2 males; mean age 34 years) without hormonal, immunological and ultrasound features of thyroid disease served as a control group to define the normal thyroid parenchymal blood flow.

Thyroid hormones (TSH, FT<sub>4</sub>) and TRAb were measured in all patients. The evaluation of TSH and FT<sub>4</sub> was performed by radioimmunoassay and the measurement of TRAb by radioreceptor analysis with BRAHMS GmbH kits. Information on disease duration and baseline immunological status (TRAb, anti-TPO, TAT) was obtained from the medical records provided.

In all patients and in the healthy controls an ultrasound examination was performed with an ALOKA ProSound Alpha 6 ultrasound machine using a linear probe (13,3 MHz) by one investigator before obtaining the results on the current hormonal and immunological status. The following ultrasound parameters were evaluated – volume, echogenicity, blood flow and presence of nodules.

**Determination of thyroid volume:** The diameters of the two lobes - longitudinal (l), anteroposterior (d) and transverse (w), were measured by ultrasound. In case of longitudinal diameter > 4 cm, a two-image or a trapezoidal window technique were used. The volumes of the two lobes were calculated using the formula for ellipsoid –  $V [mL] = 0,479 \times d \times w \times l [cm]$ . The total thyroid volume was calculated as the sum of the volumes of both lobes; the isthmus was not included.

**Determination of the echogenicity:** Thyroid parenchyma echogenicity was compared with that of other cervical structures and categorized as follows:

- 1) *normal* - similar to that of subcutaneous tissue;
- 2) *hypoechoic I degree* – lower than that of subcutaneous tissue, but higher than that of the cervical muscles;
- 3) *hypoechoic II degree* – equal to that of the cervical muscles;
- 4) *hypoechoic III degree* – lower than that of the cervical muscles. The echogenicity categories were summarized into two general groups: a) normo- and hypoechogenicity I degree and b) marked hypoechogenicity, including II and III degree hypoechoic structure.

**Determination of the blood flow:** The number of intraparenchymal vessels per square centimeter of thyroid parenchyma was determined using Color Doppler. To define normal blood flow we examined 20 healthy controls – in 19 of them (95%) the number of intraparenchymal vessels did not exceed 4/cm<sup>2</sup>. When evaluating the thyroid blood flow of the studied groups, we assumed that it was normal if ≤4 intraparenchymal vessels/cm<sup>2</sup> were visible and increased if >4 intraparenchymal vessels/cm<sup>2</sup> were observed.

**Determination of thyroid nodularity:** In all patients the structure of the gland and the presence of thyroid nodules were described. Assessment of nodules' characteristics (number, size, shape, echogenicity, etc.) was not the subject of this study.

Patients with Graves' disease were divided into two groups according to the immunological activity at the time of the study:

**Group 1** – with increased immunological activity (TRAb>2 mIU/mL, n=34);

**Group 2** – without immunological activity (TRAb≤2 mIU/mL, n=32).

**Statistical methods:** The statistical methods used were suitable for the goals and the properties of the data: descriptive analysis; graphical analysis; hypothesis testing (parametric and non-parametric methods). A Chi-square test was used to investigate the frequency distribution of categorical variables and a T-test or a Mann-Whitney U test was applied to analyze the continuous variables according to the normality of distribution. Hypothesis testing was performed with a predetermined significance level of 0,05 (p <0,05). The SPSS 19 statistical package for Windows (SPSS Inc. Chicago, IL) was used.

## Results

### Comparison of baseline clinical characteristics

The main clinical characteristics of the patients from the two groups are presented in *Table 1*.

There was no significant difference between the two studied groups in terms of age, sex, disease duration, presence of thyroid-associated ophthalmopathy (TAO) and current hormonal levels. We found significantly higher baseline and current TRAb levels, as well as a higher incidence of anti-TPO positivity among patients in Group 1. There was no significant difference in TAT positivity between the two groups. Patients in Group 2 took a significantly lower daily dose of antithyroid drugs (1,4 tablets vs 2,6 tablets).

### Comparison of ultrasound parameters

The following ultrasound parameters of the two studied groups were compared – thyroid volume, echogenicity, blood flow and presence of thyroid nodules. The results are presented in *Table 2*.

The patients in Group 1 had significantly higher thyroid volume, higher incidence of marked hypoechogenicity (II and III degree) and increased parenchymal blood flow. There was no difference in the prevalence of nodules between the two groups. We also found significant positive correlation between the enlarged thyroid volume and increased parenchymal blood flow ( $p=0,01$ ), as well as marginal correlation between the volume and the hypoechogenicity ( $p=0,07$ ).

## Discussion

The presence of goitre is one of the main characteristics of Graves' disease, although in some patients the thyroid gland size remains normal (3). A major role for the enlargement of thyroid volume is played by TRAb, which stimulate both the hormonal production and the thyrocyte proliferation. Increased blood flow and lymphocytic infiltration also contribute to the enlargement of the thyroid (4). Ultrasound is an affordable and relatively accurate method used to determine thyroid volume. A number of studies have analysed the relationship between the volume and the likelihood of achieving sustained remission (5, 6). Patients with increased thyroid volume assessed early in the course of the disease, have a higher recurrence rate after discontinuation of antithyroid therapy. On the other hand, the recurrence rate is positively correlated with TRAb levels (7,8). Our results show a significant correlation between the immunological activity and thyroid volume, the latter being significantly higher in patients with persistently elevated TRAb. This fact is indirectly associated with greater likelihood of recurrence in the presence of both factors (high volume and elevated TRAb) at the same time.

Diffuse hypoechogenicity is one of the ultrasound criteria for diagnosis of autoimmune thyroid disease. While in Hashimoto's thyroiditis hypoechogenicity is associated with diffuse lymphocytic infiltration, in Graves' disease decreased echogenicity is due to decreased colloid content, increased relative or absolute cell number,

**Table 1.** Baseline clinical characteristics of the patients from the two groups.

	Group 1	Group 2	P
Age (years)	49 (23-72)	52,5 (30-79)	0,434
Females:males (%)	79:21	78:22	0,950
Age at diagnosis (years)	45 (21-69)	48 (27-78)	0,555
Disease duration (months)	19,5 (4-38)	20 (5-58)	0,859
TAO (%)	62	56	0,625
TSH (mIU/l)	3,0±1,1	2,25±1,3	0,256
FT <sub>4</sub> (pmol/l)	14,6±4,2	16,5±3,0	0,412
Baseline TRAb	11,2 (2,3-40)	5,89 (2,2-30)	0,012
Current TRAb	6,4 (2,1-40)	1 (1,0-1,9)	<0,001
Anti-TPO positivity (%)	77,4	51,6	0,034
TAT positivity (%)	48,4	32	0,205
Antithyroid drug dose (tablets/day)	2,6±1,5	1,4±0,7	<0,001

**Table 2.** Comparison between the ultrasound parameters of the patients from the two groups.

Ultrasound parameter	Group 1	Group 2	P
Thyroid volume (ml)	15,0 (5,9-63,5)	10,5 (4,7-30,0)	0,047
Echogenicity (%)			
normo-/hypoechoogenicity I degree	41,2	65,6	
hypoechoogenicity II-III degree	58,8	34,4	0,047
Blood flow (%)			
normal	20,6	75	
increased	79,4	25	<0,001
Presence of nodules (%)			
yes	35,3	43,8	
no	64,7	56,2	0,62

lymphocytic infiltration and increased vascularization (9). Some authors have found a correlation between the degree of hypoechoogenicity and the levels of circulating TRAb (10, 11), which is consistent with the results of the present study. Marked hypoechoogenicity was more prevalent in patients with positive TRAb, while normo- and hypoechoogenicity I degree - in those with negative TRAb. The association between the immunological activity on one hand, and echogenicity and thyroid volume on the other, determines the possible role of these ultrasound parameters as additional prognostic factors for achieving immunological remission.

In general, thyroid blood flow is significantly increased at the time of diagnosis of Graves' disease (12). Intraparenchymal blood flow decreases significantly during the course of antithyroid drug therapy (12-14). A similar trend is usually observed for TRAb (1). The pathogenetic mechanism of the increased vascularization in Graves' disease is not fully understood. Increased blood flow is often also found in autoimmune hypothyroidism, which excludes high levels of peripheral thyroid hormones as a direct cause. Hypervascularity is likely to be a manifestation of the autoimmune inflammation of the thyroid gland. Endothelial growth factor and the chemokine CXCL 10 probably play a role in the activation of thyroid neoangiogenesis, which is primarily stimulated by the increased TSH in autoimmune thyroiditis and TRAb in Graves' disease (15). The presumable pathogenetic link between TRAb and intraparenchymal blood flow is further supported by the present study, which shows a strong association between the increased blood flow and the presence of positive TRAb. Some authors consider blood flow to be a good marker of therapeutic efficacy, although it does not significantly change before restoration of normal hormonal and immunological status (16). Assessment

of blood flow could serve as an indicator of the effect of antithyroid drug therapy, which is of particular value in cases where measurement of TRAb is not possible. The methodology used to evaluate blood flow in this study is semi-quantitative and reflects the subjective judgment of the ultrasonographer. Without claiming high precision, the method is suitable for initial assessment of the blood flow in diffuse thyroid diseases. A more accurate quantitative method is measurement of thyroid blood flow velocity. A positive correlation has been found between thyroid artery blood flow velocity and TRAb levels, and they appear to have a similar dynamic during the course of the disease (17-19). According to Saleh et al. quantitative assessment of blood flow has a good predictive value with regard to the likelihood of recurrence of Graves' disease (sensitivity 71%, specificity 100%) (20). Our findings are in accordance with the results published by Vita et al., who found that in patients with Graves's disease increased intraparenchymal blood flow correlates with increased thyroid volume, the presence of marked hypoechoogenicity and elevated levels of TRAb (21). The combination of these three ultrasound parameters, each of which is associated with an immunologically active disease, might further reduce the likelihood of achieving sustainable remission.

To our knowledge, there are no data in the literature regarding the association between TRAb levels and thyroid nodularity. We did not find any difference in the prevalence of thyroid nodules in patients with and without immunological activity.

Anti-TPO and TAT are also evaluated when assessing the immunological status of patients with Graves' disease. Mekova et al. reported that newly diagnosed patients with Graves' disease and positive anti-TPO and/or TAT have higher baseline FT<sub>4</sub> and TRAb levels and higher thyroid volume (22). We found higher baseline

levels of TRAb and higher prevalence of anti-TPO positivity among patients with persistent immunological activity.

Our study has several limitations. First, the number of patients studied is relatively small, which is typical for most of the published studies in this field. Second, the design is cross-sectional and the patients enrolled have already achieved a therapeutic remission. We have no systematic record of the studied ultrasound parameters at the onset of the disease. Further follow-up of the cohort might provide information on the dynamic of the ultrasound parameters during the course of the disease.

## Conclusions

In patients with Graves' disease enlarged thyroid volume, increased blood flow and marked hypoechogenicity are associated with increased immunological activity. These ultrasound parameters should be evaluated and monitored in the course of antithyroid drug therapy and might improve the prognostic precision when the likelihood of achieving remission is assessed.

*This work is supported by the Bulgarian Ministry of Education and Science under the National Program for Research „Young Scientists and Postdoctoral Students“.*

## References

1. Okamoto Y, Tanigawa S, Ishikawa K, Hamada N. TSH Receptor Antibody Measurements and Prediction of Remission in Graves' Disease Patients Treated with Minimum Maintenance Doses of Antithyroid Drugs. *Endocr J* 2006; 53(4):467-472.
2. Varadhan L, Varughese GI, Sankaranarayanan S. Hyperthyroidism and Graves' disease: Is an ultrasound examination needed? *Indian J Endocrinol Metab* 2016; 20(6):866-869.
3. Hegedus L, Hansen JM, Kartstrup S. High Incidence of Normal Thyroid Gland Volume in Patients With Graves' Disease. *Clin Endocrinol* 1983; 19(5):603-607.
4. Brent GA. Graves' Disease. *N Engl J Med* 2008; 358(24):2594-605.
5. Struja T. Can we predict relapse in Graves' disease? Results from a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol* 2017; 176(1):87-97.
6. Liu LIN, Lu H, Liu Y, Liu C, Xun CHU. Predicting relapse of Graves' disease following treatment with antithyroid drugs. *Exp Ther Med* 2016; 11(4):1453-1458.
7. Cappelli C, Gandossi E, Castellano M, Pizzocaro C, Agosti B, Delbarba A, et al. Prognostic Value of Thyrotropin Receptor Antibodies (TRAb) in Graves' Disease: A 120 Months Prospective Study. *Endocr J* 2007; 54(5):713-720.
8. Orgiazzi J, Madec A-M. Reduction of the Risk of Relapse After Withdrawal of Medical Therapy for Graves' Disease. *Thyroid* 2003; 12(10):849-853.
9. Vitti P. Grey scale thyroid ultrasonography in the evaluation of patients with Graves' disease. *Eur J Endocrinol* 2000; 142(1):22-24.
10. Vitti P, Rago T, Mancusi F, Pallini S, Tonacchera M, Santini F, et al. Thyroid hypoechogenic pattern at ultrasonography as a tool for predicting recurrence of hyperthyroidism after medical treatment in patients with Graves' disease. *Acta Endocrinologica* 1992; 126(2):128-131.
11. Schiemann U, Gellner R, Riemann B, Schierbaum G, Menzel J. Standardized grey scale ultrasonography in Graves' disease: correlation to autoimmune activity. *Eur J Endocrinol* 1999; 141(4):332-336.
12. Inferno T, Rails PW, Lee KP, Colletti M, Randall D. Color-Flow Doppler Sonography Graves' Disease. *Am J Roentgenol* 1988; 150(1):781-784.
13. Castagnone D, Rivolta R, Baldini MI, Tozzi R, Cantalamessa L. Color Doppler Sonography in Graves' Disease: Value in assessing activity of disease and predicting outcome. *Am J Roentgenol* 1996; 166(1):203-207.
14. Baldini M, Castagnone D, Rivolta R, Meroni L, Pappalè M, Cantalamessa L. Thyroid Vascularization by Color Doppler Ultrasonography in Graves' Disease. Changes Related to Different Phases and to the Long-Term Outcome of the Disease. *Thyroid* 1997; 7(6):823-828.
15. Wu CC. Duplex Doppler Ultrasonography for the Functional Evaluation of Diffuse Thyroid Diseases. *J Med Ultrasound* 2009; 17(4):183-186.
16. Sponza M, Fabris B, Bertolotto M, Ricci C AL. Role of Doppler color ultrasonography and of flowmetric analysis in the diagnosis and follow-up of Grave's disease. *Radiol Med* 1997; 93(4):405-409.
17. Caruso G, Attard M, Caronia A, Lagalla R. Color Doppler measurement of blood flow in the inferior thyroid artery in patients with autoimmune thyroid diseases. *Eur J Radiol* 2000; 36(1):5-10.
18. Liu G, Huang L, Zheng H, Liang X, Zhao Y. Prediction of relapse after antithyroid drug therapy of hyperthyroidism through assessment of peak systolic velocity of superior thyroid artery. *Hainan Med J* 2018; 24(5):76-79.
19. Hiraiwa T, Tsujimoto N, Tanimoto K, Terasaki J, Amio N, Hanafusa T. Use of Color Doppler Ultrasonography to Measure Thyroid Blood Flow and Differentiate Graves' Disease from Painless Thyroiditis. *Eur Thyroid J* 2013; 2(2):120-126.
20. Adler T, Rodrigues R, Otavio R, Pina G, Taliberti M, Souza P De, et al. Graves' Disease Thyroid Color-Flow Doppler Ultrasonography Assessment. *Health* 2014; 12(6):1487-1496.
21. Saleh A, Cohnen M, Feldkamp J. Prediction of Relapse after Antithyroid Drug Therapy of Graves' Disease: Value of Color Doppler Sonography. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2004; 112(9):510-513.
22. Vita R, Di F, Perelli S, Capodicasa G, Benvenga S. Thyroid vascularization is an important ultrasonographic parameter in untreated Graves' disease patients. *J Clin Transl Endocrinol* 2019; 15(2):65-69.
23. R. Mekova, Boyanow M. Clinical, hormonal and ultrasound characteristics of patients with newly diagnosed Graves' disease and different thyroid antibody profiles. *Acta Medica Bulg* 2019; 46(2):5-12.

## Витамин В12 статус в българска популация пациенти със захарен диабет тип 2

Чакърова, Невена Я.<sup>1</sup>, Димова, Румяна Б.<sup>1</sup>, Минчева, Росица С.<sup>2</sup>, Грозева, Грета Г.<sup>1</sup>, Тодорова, Ани С.<sup>1</sup>, Сердарова, Мина С.<sup>1</sup>, Танкова, Цветалина И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Катедра по Ендокринология, Клиника по Диабетология, Медицински Университет, София

<sup>2</sup> Клинична лаборатория, МБАЛ Самоков

### Адрес за кореспонденция:

Д-р Невена Чакърова  
Клиника по Диабетология, УСБАЛЕ „Акад. Ив. Пенчев“,  
1431 София, ул. Здраве № 2  
veni\_chakarova@abv.bg

### Резюме

**Целта** на проучването е да се изследва нивото на витамин В12 в българска популация пациенти със захарен диабет тип 2.

**Материал и методи:** Изследвани са 308 пациенти (170 мъже и 138 жени), на средна възраст  $60,3 \pm 10,4$  г. и среден ИТМ  $32,0 \pm 5,9$  кг/м<sup>2</sup>. Витамин В12 е изследван в серум по ензимносвързан имуносорбентен метод.

**Резултати:** Дефицит на витамин В12 се установява при 34% от изследваната популация, ниско-нормални нива – при 28%, и нормални нива – при 38%. С дефицит на витамин В12 са 37,7% от пациентите, приемащи метформин и 18% от неприемащите метформин. Средното ниво на витамин В12 в групата с прием на метформин е 178 pmol/l, а в групата без прием – 235 pmol/l ( $p=0,006$ ). Нивото на витамин В12 корелира със средната доза на метформин ( $r=-0,18$ ,  $p=0,005$ ) и не корелира с продължителността на прием. Всяко покачване на дозата на метформин с 250 мг, увеличава риска за В12 дефицит с 15% ( $p=0,005$ ).

**Изводи:** Около една трета от пациентите със захарен диабет тип 2 са с дефицит на витамин В12, а друга една трета е с ниско-нормални нива, което не изключва дефицит. Дефицитът на витамин В12 е два пъти по-чест при пациентите, приемащи метформин. Основният фактор, свързан с дефицит на витамин В12, е дозата на метформин.

**Ключови думи:** витамин В12, метформин, захарен диабет тип 2

### Въведение

Терапията с метформин е сред утвърдените рискови фактори за дефицит на витамин В12 (1). Механизмът, по който се развива дефицитът, е свързан с нарушаване на резорбцията на витамин В12 в тънките черва (2). Метформин и понастоящем е първоетапно и базисно средство в лечението на захарен диабет тип 2 и присъства в терапията на преобладаващата част от пациентите на всички етапи от еволюцията на заболяването (3). Изключение правят пациентите, които не толерират медикамента поради

гастро-интестинални странични ефекти или имат контраиндикации, като тези пациенти съставляват малък сегмент от популацията със захарен диабет тип 2. По този причина пациентите със захарен диабет тип 2 са основна рискова група за дефицит на витамин В12 и в последните години се препоръчва мониториране на нивата на В12 при всички пациенти със захарен диабет тип 2, провеждащи лечение с метформин (3).

**Целта** на настоящото проучване е да се изследва нивото на витамин В12 в българска популация пациенти със захарен диабет тип 2.

### Материали и методи

В настоящото крос-секционно изследване участват 308 пациента със захарен диабет тип 2, преминали през Клиника по Диабетология на УСБАЛЕ „Акад. Ив. Пенчев“. Основните характеристики на изследваната популация са представени в Таблица 1. Изследването е одобрено от Етичната комисия на Медицински Университет, София.

На всички пациенти са снети подробна анамнеза и пълен физикален статус. Витамин В 12 е изследван в серум по ензимносвързан имуносорбентен метод (Roche). За дефицит са приети нива под 150 рmol/l, а за ниско-нормални нива – диапазон 150-221 рmol/l.

В изследването не са включени пациенти с известна пернициозна анемия, възпалително чревно заболяване, резекции на стомаха или тънкото черво, пациенти, провеждащи лечение с В12 или приемащи мултивитаминни препарати, както и такива с вегетариански тип на хранене.

**Таблица 1.**

Основни характеристики на изследваната популация.

Мъже/жени	170/138
Възраст (години)	60,32 ± 10,46
ИТМ (кг/м <sup>2</sup> )	32,04 ± 5,99
Давност на заболяването (години)	12,87 ± 8,34

Статистическият анализ на данните е извършен със статистически пакет SPSS 18. Приложени са дескриптивен анализ, корелационен анализ и логистичен регресионен анализ. Анализът е направен след логаритмично трансформиране поради разпределение на изследваната променлива, различно от нормалното, и резултатите са представени като медиани. Нормалността на разпределението е анализирана със стандартни хистограми и крива на нормално разпределение на променливите. За ниво на значимост е прието  $p < 0,05$  (two-tailed).

### Резултати

#### Анализ на витамин В12 статус в изследваната популация

Дефицит на витамин В12 (ниво  $<150$  рmol/l) се установява при 34% от изследваната популация, ниско-нормални нива (150-221 рmol/l) – при 28% и нормални нива ( $>221$  рmol/l) – при 38% (Фиг. 1).

#### Анализ на витамин В12 ниво и статус в групите с и без прием на метформин

В изследваната популация пациенти 16,2% ( $n=50$ ) не приемат метформин. Установява се значима разлика в нивото на витамин В12 между двете групи съответно с и без прием на метформин ( $p=0,006$ ) (Фиг. 2).

Дефицит на витамин В12 се установява при 18% от пациентите в групата без прием на метформин и при 37,7 % в групата с прием на метформин (Фиг. 3).

#### Анализ на В12 ниво и статус според приеманата доза метформин

В изследваната популация пациенти със захарен диабет тип 2 7,4% приемат дневна доза до 1000 mg метформин, 33,7% – доза между 1000 и 2000 mg и 58,9% – доза над 2000 mg (Фиг. 4), като няма значима разлика в нивото на В12 между трите групи, приемащи различна доза ( $p=0,312$ ).

Дефицит на витамин В12 се установява при 26,3%, 34,5% и 40,8% в групите с прием на метформин съответно под 1000 mg, 1000-2000 mg и над 2000 mg (Фиг. 5). В групата с дефицит на витамин В12 5% от пациентите приемат доза под 1000 mg, 31% – доза между 1000 и 2000 mg и 64% – доза над 2000 mg. В групата с ниво на витамин В12  $>150$  рmol/l съответните проценти са 9%, 35% и 56%, като няма значима разлика между двете групи в процентното разпределение по доза (Фиг. 6).

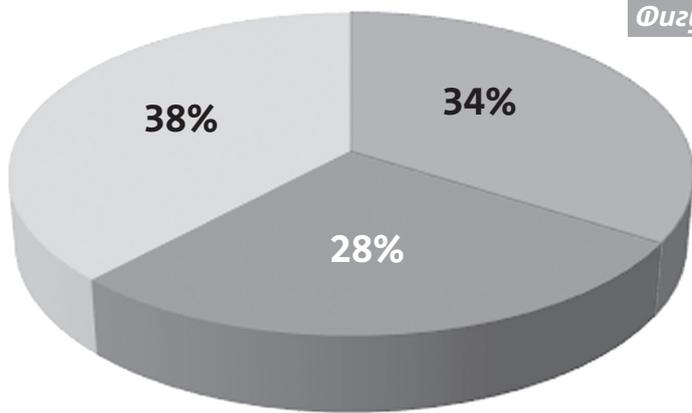
#### Анализ на В12 ниво и статус според продължителността на терапията с метформин

В изследваната популация пациенти, 11,5% са приемали метформин до 1 година, 20,1% – между 1 и 5 години и 68,4% – над 5 години. Дефицит на витамин В12 се установява при 33,3%, 23,1% и 42,9% в групите с продължителност на прием на метформин съответно под 1 година, между 1 и 5 години над 5 години (Фиг. 7).

Значима разлика в нивото на витамин В12 се установява между групите с прием на метформин между 1 и 5 години и над 5 години ( $p=0,042$ ) (Фиг. 8).

#### Анализ на връзката между нивото на витамин В12 и дозата и продължителността на терапията с метформин

При парциален корелационен анализ с контролиране по възраст, нивото на витамин В12 показва значима негативна корелация със средната доза

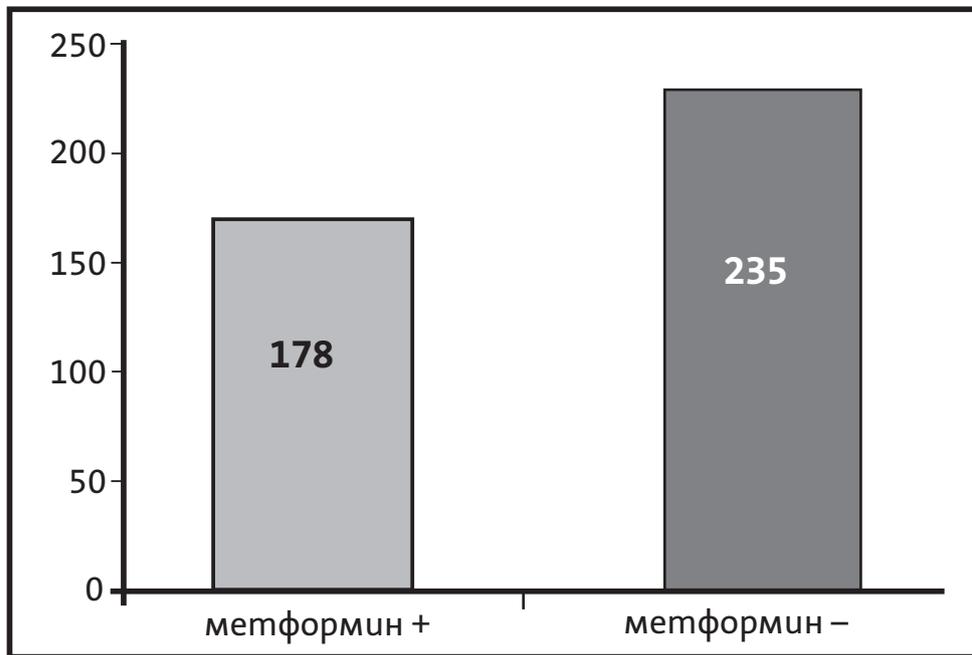


**Фигура 1.** Категории на витамин В12 статус в изследваната популация.

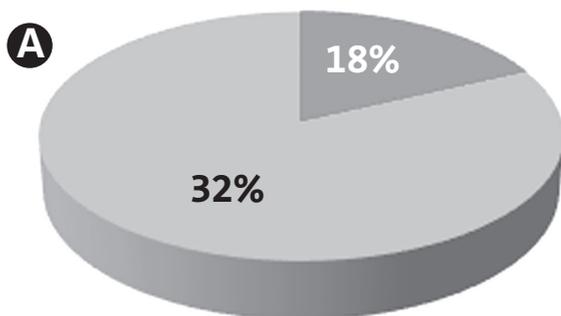
- гефицит
- ниско-нормални нива
- нормални нива

**Фигура 2.**

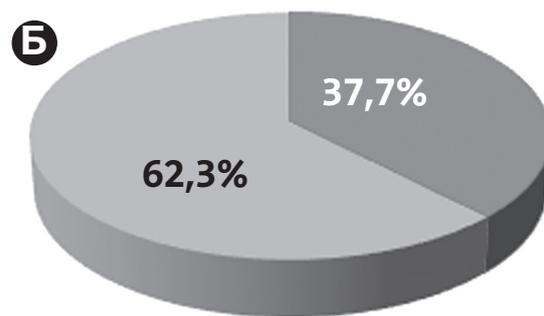
Ниво на В12 в групите с прием на метформин (метформин +) и без прием на метформин (метформин -)



**Фигура 3.** Категории на В12 статус в групите с прием (А) и без прием (В) на метформин.

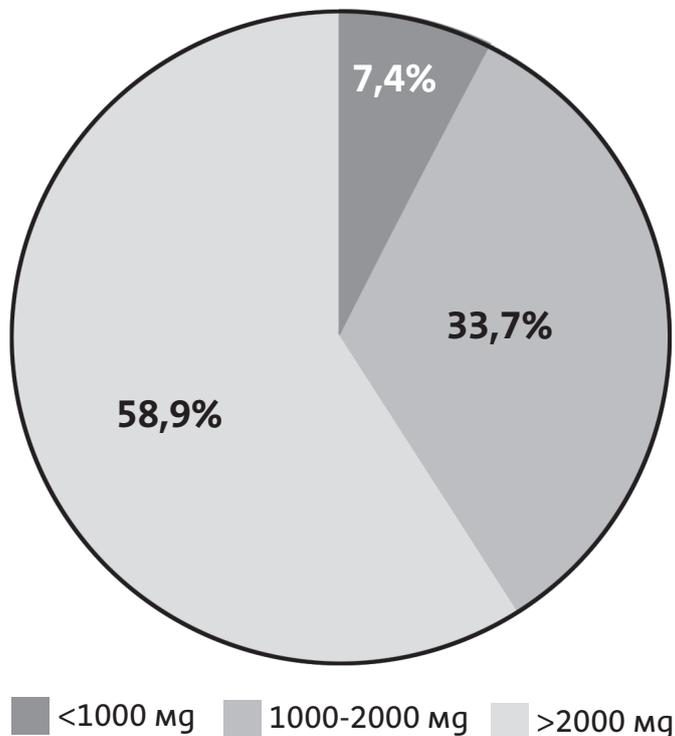


- гефицит
- нормални нива

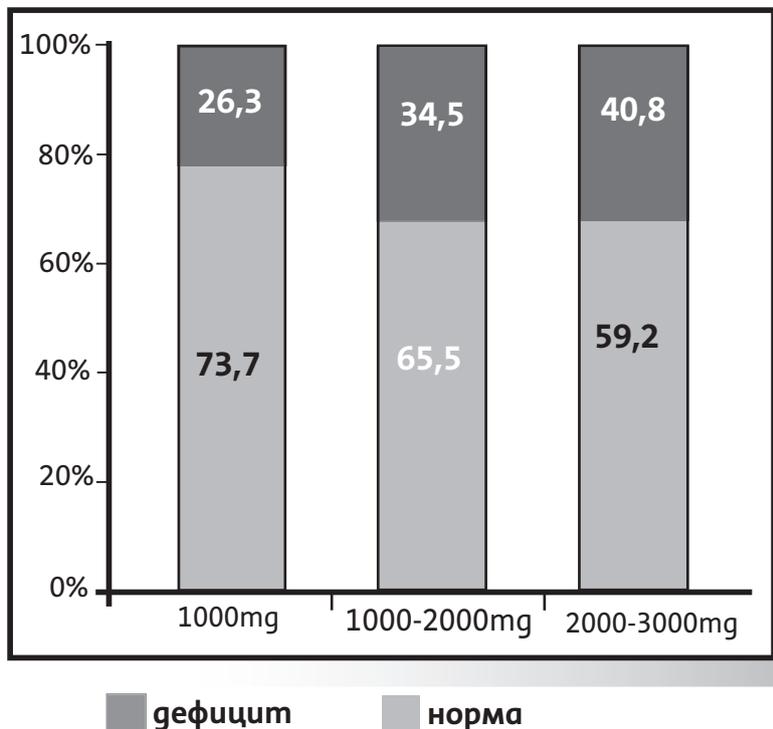


- гефицит
- нормални нива

**Фигура 4.** Категории според приеманата доза метформин.



**Фигура 5.** В12 статус в групите с прием на различна доза метформин.



на метформин ( $r=-0,18$ ,  $p=0,005$ ) и липса на корелация с продължителността на прием на метформин.

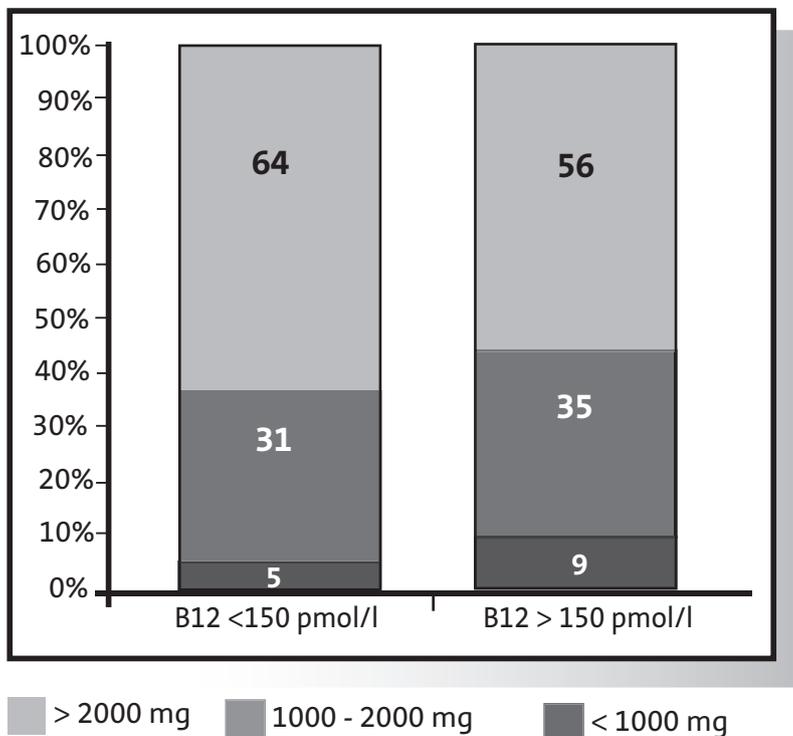
Данните от логистичния регресионен анализ показват, че всяко покачване на дозата на метформин с 250 мг, увеличава риска за В12 дефицит с 15% ( $p=0,005$ ).

**Обсъждане**

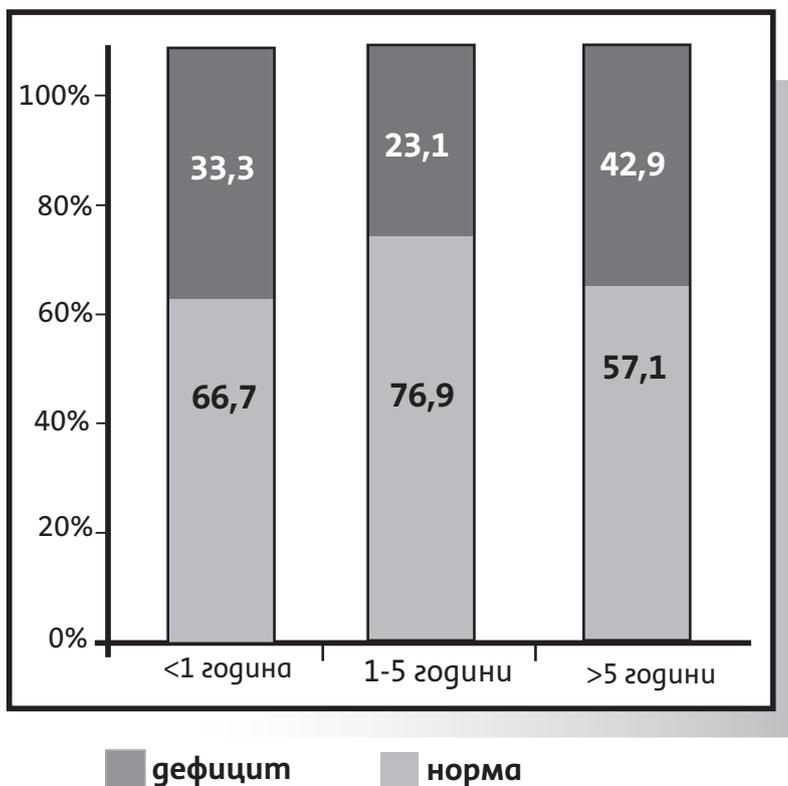
Настоящото изследване дава информация относно витамин В12 статуса в българска популация пациенти със захарен диабет тип 2.

Получените резултати показват наличие на дефицит на витамин В12 при около една трета (34%) от изследваните пациенти. Публикуваните в литературата резултати за дефицит на В12 в тази популация варират широко – между 5,8% и 33%, което отчасти е свързано с използването на различни стойности, дефиниращи дефицита (2). Резултатът от настоящото проучване попада в горната граница на съобщаваните резултати и очертава проблема В12 дефицит в българска популация пациенти със захарен диабет тип 2 като значим – на практика всеки трети пациент попада в тази категория. В достъпната литература към момента липсват данни за дефицита на В12 както за българска популация пациенти със захарен диабет тип 2, така и за общата българска популация. Това до известна степен ограничава цялостния анализ на получените данни, тъй като не позволява съпоставяне с данни на други колективи относно честотата на дефицита при пациентите със захарен диабет тип 2 в България и най-вече не позволява оценка и съпоставяне спрямо този в общата българска популация. Може да се предполага, че дефицитът на витамин В12 за общата популация в България е съпоставим с този, докладван за някои други популации – САЩ, Финландия, поради липса на съществени различия в основните рискови фактори, определящи дефицит – вегетариански тип на хранене, честота на стомашно-чревни заболявания и прием на антиацидни средства.

**Фигура 6.** Разпределение по приемана доза метформин в групите с и без дефицит на витамин В12.



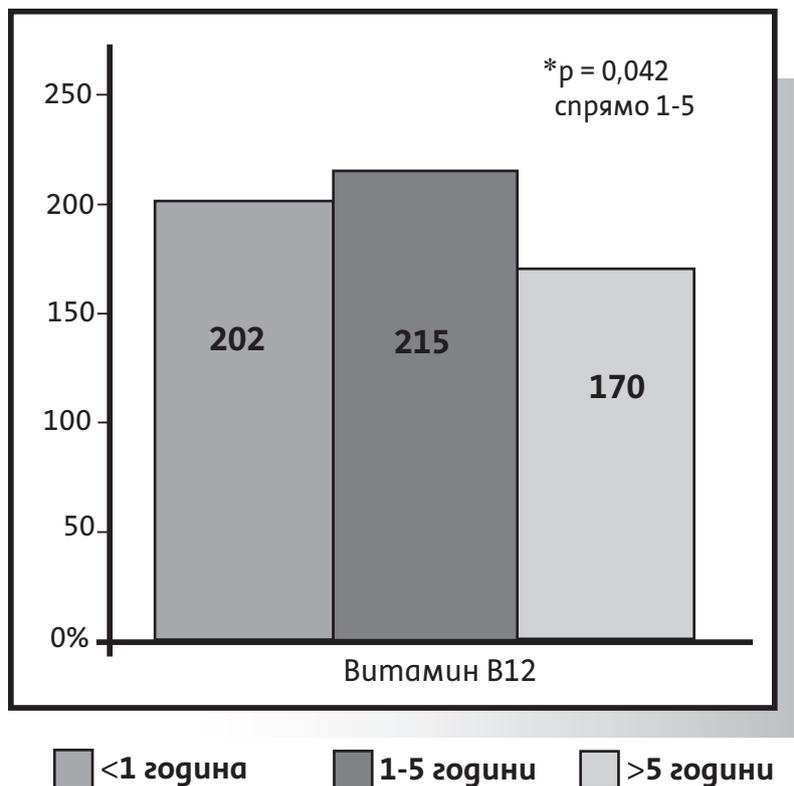
**Фигура 7.** В12 статус според продължителността на терапия с метформин.



Данните от проучването NHANES в САЩ посочват честота на В12 дефицит около 6% за общата популация и около 20% за лицата над 60 години (1). В Европа има публикувани данни за Финландия, където дефицитът на В12 в популацията на възраст над 65 години е 12,1% (2). В страни като Индия, където преобладава вегетарианският тип на хранене, дефицитът при възрастната популация достига до 70% (1,2). На базата на тези данни може да се приеме, че полученият от нас резултат е в съответствие с публикуваните данни, които показват по-висок дял на В12 дефицит при пациентите със захарен диабет спрямо този в общата популация (4).

Освен данните за дефицита на В12, с важно значение за клиничната практика е и полученият резултат относно ниско-нормалните нива на показателя, които не изключват дефицит. В тази сива зона попада група около една трета (28%) от изследваната популация, при която се налага допълнително уточняване на витамин В12 статуса с изследване на свързани метаболити. Дефицит на витамин В12 се приема и при нормални серумни нива на показателя, но при наличие на повишени нива на свързани метаболити като например метилмалоновата киселина, т.е. реалният дефицит на витамин В12 е по-висок от явния, оценен само със серумното му ниво (1,5). Следва да се отбележи, че в литературата няма общоприета граница за ниско-нормално ниво на витамин В12 (4). Посочват се различни прагове – 221, 248 и 295 pmol/l (1,4). В настоящото изследване е използван най-ниският праг – 221pmol/l, което би могло допълнително да подценява сегмента пациенти с потенциален дефицит, нуждаещи се от допълнително уточняване. По отношение на прага за явен дефицит на витамин В12 също има известни разминавания – 111, 148 и 150 pmol/l, като най-общоприет е прагът 150 pmol/l, който е и използваният в настоящото изследване (1,4,5).

**Фигура 8.** Нива на витамин В12 в групите с различна продължителност на прием на метформин.



Сумарно при така използваните прагове, над половината от пациентите със захарен диабет тип 2 в изследването (62%), имат или биха могли да имат дефицит на витамин В12, или може да се приеме, че имат по-ниски от категорично нормалните стойности на витамин В12.

Витамин В12 статуса при пациентите със захарен диабет тип 2 е свързан с терапията с метформин [6-8]. Метформин е основен медикамент в лечението на захарен диабет тип 2 и остава средство от първа линия в алгоритъма за терапевтично поведение и в настоящите препоръки за лечение на захарен диабет тип 2 [3]. В съответствие с терапевтичния алгоритъм, болшинството от пациентите в настоящото изследване приемат метформин – 83.8%. Останалите 16.2% не приемат метформин поради странични прояви от страна на гастроинтестиналния тракт, наличие на контраиндикации или са с новооткрит, нелекуван до момента, захарен диабет.

Резултатите от настоящото изследване показват значима разлика в средното ниво на витамин В12 в групите с и без лечение с метформин в полза на групата, която не провежда такава терапия, както и с ва пъти по-висока честота на явния дефицит – 18% спрямо 37.7%, при лечение с метформин. Тези резултати са в пълно съзвучие и в подкрепа на общоприетата роля на метформин като рисков фактор за В12 дефицит, както и за необходимостта от мониториране на серумното му ниво в рутинната клиничната практика

при пациентите със захарен диабет тип 2, провеждащи такава терапия [7-11].

Докато каузалната роля на метформин за дефицита на витамин В12 е безспорна, значението на дозата и продължителността на терапията, определящи риск и необходимост от скрининг, все още е обект на дискусия. В литературата има множество данни подкрепящи връзката и на дозата, и на продължителността на терапията с метформин с дефицита на В12, както и такива, в които се посочва значението само на дозата [7-13].

В настоящото изследване е направен анализ на влиянието и на дозата, и на продължителността на терапията с метформин, като са използвани три дозови групи – под 1000 mg, между 1000 и 2000 mg и над 2000 mg и три групи според продължителността на терапия – до 1 година, между 1 и 5 години и над 5 години. Следва да се отбележи, че повече от половината от пациентите попадат в групите с най-висока доза и най-голяма продължителност на терапията – съответно 58.7% приемат между 2000 и 3000 mg метформин и 68.4% се лекуват с него над 5 години.

Получените от нас резултати са в подкрепа на ролята на дозата на метформин и връзката ѝ с нивото и дефицита на В12 и не подкрепят значението на продължителността на терапията.

Независимо, че при анализа на нивото на В12 в групите с прием на различна доза метформин, не се установява наличие на значима разлика, получените резултати показват ясно нарастване на процента пациенти с явен дефицит на витамин В12 с увеличаване на дозата на метформин – 22% в групата с доза под 1000 mg, 32.7% в групата с доза между 1000 и 2000 mg и 43.5% в групата, приемащи над 2000 mg метформин. Също така в групата с явен дефицит на витамин В12 процентът на пациентите, приемащи най-високата доза метформин – над 2000 mg,

е по-висок от този в групата без явен дефицит – 64% спрямо 56%, независимо, че отново не се достига статистически значима разлика. Категорично в подкрепа на ролята на дозата на метформин за нивото и дефицита на витамин В12 са данните, получени от парциалния корелационен анализ, които показват значима зависимост единствено между нивото на В12 и дозата на метформин, като зависимостта е обратнопропорционална – нарастването на дозата води до намаление в нивото. Данните се допълват от регресионния анализ, който показва, че всеки 250 мг увеличение в дозата на метформин, повишава риска от В12 дефицит с 15%. Анализът е направен с контролиране по възраст, тъй като възрастта е утвърден рисков фактор за дефицит на В12. По този начин се елиминира влиянието на фактора върху резултата и се оценява чистият ефект на променливите, които са обект на интерес – доза и продължителност на терапията.

Анализът на другата променлива, свързана с терапията с метформин – продължителността на лечение, като цяло не показва значима връзка с нивото и дефицита на витамин В12. Подобни резултати са докладвани и от други колективи [14]. Процентът на дефицит на В12 в групите с най-кратък и най-продължителен прием на метформин е на практика сходен – съответно 42.9% и 41.2%. Значима разлика в нивото на В12 се установява между групите с продължителност на терапията между 1 и 5 години и над 5 години, като нивото е по-ниско в последната. Независимо от този резултат, данните от корелационния анализ не показват връзка между нивото на В12 и продължителността на прием на метформин.

### **Предимства на изследването**

Настоящото изследване дава първите към момента данни за витамин В12 статус в българска популация пациенти със захарен диабет тип 2. Резултатите са с практическо значение и клинична приложимост, тъй като посочват ясно необходимостта от скрининг на витамин В12 статуса при пациентите, които провеждат лечение с метформин, а това реално обхваща почти цялата популация пациенти със захарен диабет тип 2.

### **Недостатъци на изследването**

Основен недостатък на изследването е липсата на допълнително определяне на В12 свързан метаболит, с който да се прецизира статуса на пациентите, които попадат в сивата зона на ниско-нормални нива на В12 и биха могли да имат дефицит.

Друг недостатък е липсата на информация и анализ на субгрупата пациенти, приемащи антиацитиди, които са рисков фактор за В12 дефицит. В изследваната популация със сигурност има известен процент такива пациенти – това са основно пациентите със захарен диабет с прекаран сърдечно-съдов инцидент, които приемат антиагрегантна терапия, налагаща и прием на антиацидно средство.

Като недостатък на изследването може да се разглежда и броят на изследваните пациенти. При изследване на по-голяма популация, очертаните тенденции вероятно биха достигнали статистическа значимост.

### **Извогу**

- Около една трета от пациентите със захарен диабет тип 2 са с дефицит на витамин В12, а друга една трета попада в сивата зона на ниско-нормални нива, която не изключва дефицит и налага допълнително уточняване на витамин В12 статуса с изследване на свързани метаболити.
- Дефицитът на витамин В12 е два пъти по-чест при пациентите, приемащи метформин.
- Основният фактор, свързан с наличието на В12 дефицит, е дозата на метформин, като за всеки 250 мг увеличение на дозата, рискът от дефицит нараства с 15%.

### **Финансиране**

*Изследването е изцяло финансирано от Медицински Университет София – Договор № Д-238 от конкурс „Стимулиране на научните изследвания в области с високи постижения“ – 2017.*

## Vitamin B12 Status in a Bulgarian Population with Type 2 Diabetes

Chakarova, Nevena Y.<sup>1</sup>, Dimova, Romyana B.<sup>1</sup>, Mincheva, Rositsa S.<sup>2</sup>, Groseva, Greta G.<sup>1</sup>, Tododrova, Ani S.<sup>1</sup>, Serdarova, Mina S.<sup>1</sup>, Tankova, Tsvetalina I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Endocrinology, Division of Diabetology, Medical University, Sofia

<sup>2</sup>Laboratory Department, MHAT,

---

### Address for correspondence:

Nevena Chakarova, MD, PhD

Clinic of Diabetology, University Hospital of Endocrinology „Acad. Ivan Penchev“.

1431 Sofia, 2 Zdrave Str.

veni\_chakarova@abv.bg

### Abstract

**The aim** of the study was to assess vitamin B12 levels in a Bulgarian population of patients with type 2 diabetes.

**Material and methods:** 308 type 2 diabetes patients (170 males, 138 females), of mean age 60,3±10,4 years and mean BMI 32,0±5,9 kg/m<sup>2</sup>, were enrolled. Serum levels of vitamin B12 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay.

**Results:** B12 deficiency is present in 34% of the studied population, 28% have low-normal levels and 38% - normal levels. B12 deficiency is present in 37,7% of the patients taking metformin and in 18% of those not on metformin. The mean level of B12 is 178 pmol/l in the group receiving metformin, and 235 pmol/l in the group not taking metformin (p=0,006). The B12 level correlates with the mean dose of metformin (r=-0,18, p=0,005) and does not correlate with the duration of the therapy. Each 250 mg increase in metformin dose increases the risk of B12 deficiency by 15%. (p=0,005).

**Conclusions:** About one third of patients with type 2 diabetes have B12 deficiency and another third have low-normal levels that do not exclude deficiency. B12 deficiency is twice as common in patients receiving metformin. The main determinant of B12 deficiency appears to be the metformin dose.

---

**Key words:** vitamin B12, metformin, type 2 diabetes

### Introduction

Metformin therapy is among the established risk factors for vitamin B12 deficiency (1) with the underlying mechanism being impaired absorption in the small intestine. (2) Currently metformin remains the standard and primary agent in the treatment of type 2 diabetes and most patients take metformin at each stage of the disease. (3) Patients who do not take metformin

due to gastrointestinal side effects or contraindications comprise a small segment of the diabetic population. Thus type 2 diabetes patients are a major risk group for B12 deficiency and monitoring of B12 levels has been recommended in recent years for all patients on metformin therapy. (3)

**The aim** of the present study was to assess vitamin B12 levels in a Bulgarian population of patients with type 2 diabetes.

## Material and methods

The present study is a cross-sectional one and consists of 308 enrolled patients with type 2 diabetes at the Department of Diabetology of the University Hospital of Endocrinology „Acad. Ivan Penchev“. The main characteristics of the study population are presented in *Table 1*.

The study was approved by the Ethics Committee of the Medical University, Sofia. For each patient a detailed medical history and physical examination was undertaken.

Serum levels of vitamin B12 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (Roche). Deficiency was defined as a serum level of B12 below 150 pmol/l while levels in the range of 150-221 pmol/l were considered low-normal.

The following groups of patients were excluded from the study – patients with pernicious anemia, patients with inflammatory bowel disease, patients with surgical resections of the stomach and the small intestine, patients taking B12 or multivitamins as well as vegetarians.

Statistical analysis of the data was performed with SPSS 18 using descriptive analysis, correlations and logistic regression. Analyses were performed after logarithmic transformation because of the abnormal distribution of the variable and the results were presented as medians. Distribution was analyzed with standard histograms and a normal distribution curve of the variables. P value of less than 0,05 two-tailed was considered significant.

**Table 1.**

Main characteristics of the studied population

<b>Males/females</b>	170/138
<b>Age (years)</b>	60,32 ± 10,46
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	32,04 ± 5,99
<b>Diabetes duration (years)</b>	12,87 ± 8,34

## Results

### **Analysis of B12 status in the studied population**

B12 deficiency (<150 pmol/l) is present in 34% of the study population, 28% are with low-normal levels (150-221 pmol/l) and 38% - with normal levels (>221 pmol/l) (*Fig. 1*).

### **Analysis of B12 level and status according to metformin therapy**

16,2% (n=50) of the study population are not taking metformin. A significant difference in B12 level is found between the groups with and without metformin therapy (p=0,006) (*Fig. 2*).

B12 deficiency is found in 18% of the patients in the group not taking metformin and in 37% of the patients on metformin (*Fig. 3*).

### **Analysis of B12 level and status according to metformin dose**

7,4% of the studied patients have been taking metformin in up to 1000 mg daily dose, 33,7% - between 1000 and 2000 mg and 58,9% - over 2000 mg (*Fig. 4*). There is no significant difference in B12 level between the three dose groups. (p=0,312).

Vitamin B12 deficiency is found in 26,3%, 34,5% and 40,8% of the patients in the dose groups ≤1000 mg, 1000-2000 mg and ≥2000 mg of metformin, respectively (*Fig. 5*).

In the group with B12 deficiency 5% of the patients have been taking a dose of up to 1000 mg metformin, 31% a dose between 1000-2000 mg and 64% - a dose over 2000 mg. In the group with B12 level >150 pmol/l the corresponding percentages are 9%, 35% and 36% respectively. There is no significant difference in the percentage distribution according to metformin dose between the two groups (*Fig. 6*).

### **Analysis of B12 level and status according to the duration of metformin therapy**

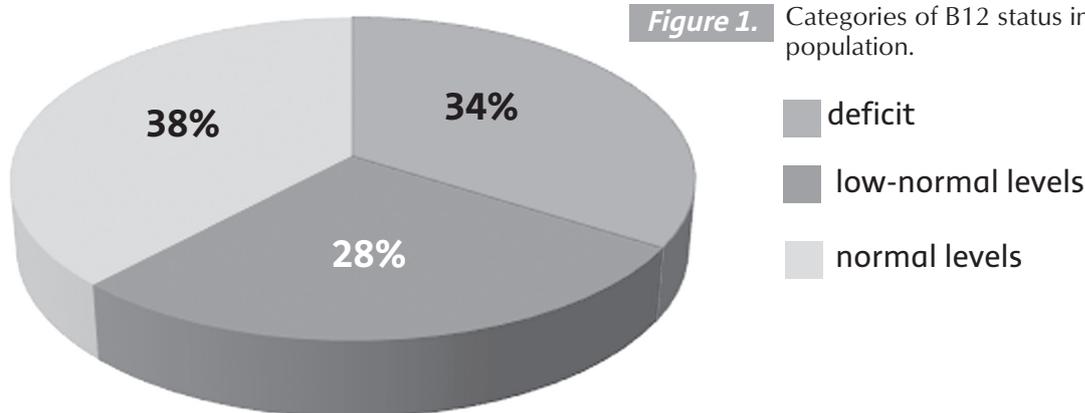
11,5% of the patients in the studied population have been taking metformin for up to 1 year, 20,1% - between 1 and 5 years and 68,4% - over 5 years. B12 deficiency is found in 33,3%, 23,15% and 42,9% of the patients in the groups with duration of metformin therapy up to 1 year, between 1-5 years and over 5 years, respectively (*Fig. 7*).

A significant difference in B12 level is found between the groups with metformin therapy for 1-5 years and over 5 years (*Fig. 8*).

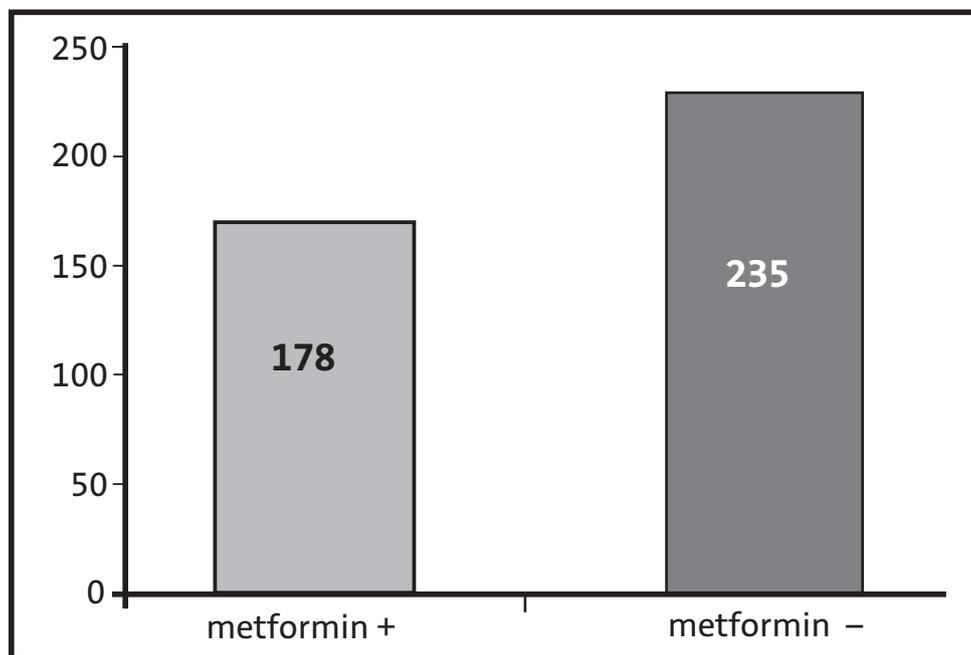
### **Analysis of the relationship between B12 level and dose and duration of metformin therapy**

In partial correlation analysis controlling for age, B12 level demonstrates a significant negative correlation with the mean dose of metformin (r=-0,18, p=0,005) and no correlation with the duration of metformin therapy.

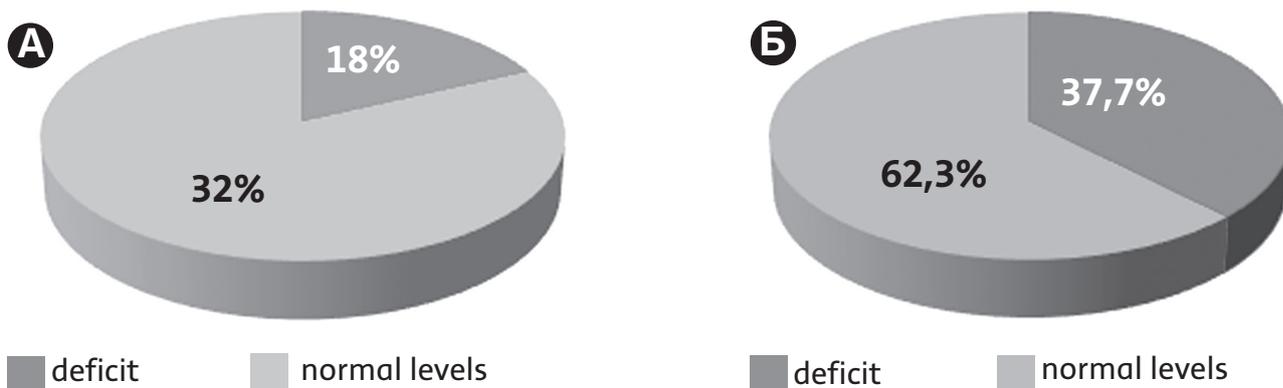
In logistic regression analysis each 250 mg increase in metformin dose is associated with a 15% increased risk of B12 deficiency (p=0,005).



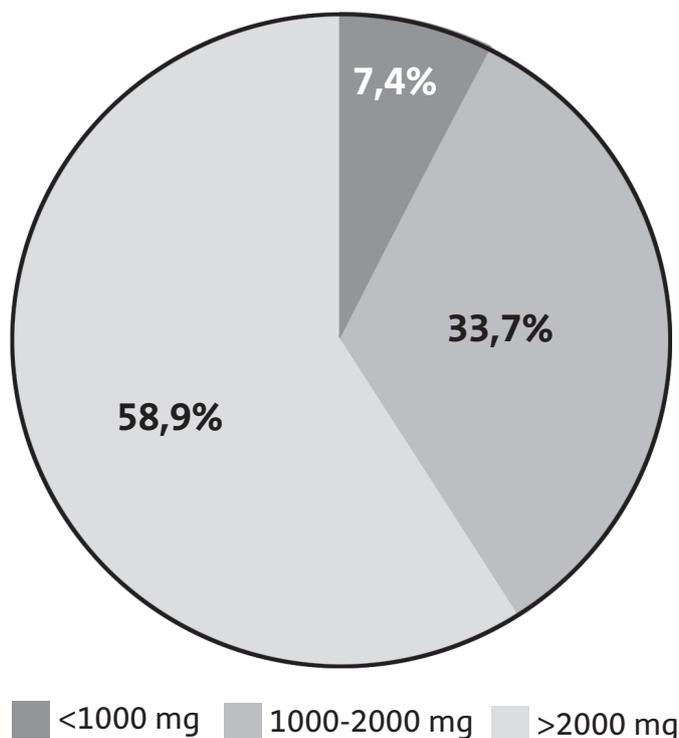
**Figure 2.** B12 levels in the groups on metformin (metformin +) and not on (metformin-) therapy.



**Figure 3.** Categories of B12 status in the groups on (A) and not on (B) metformin therapy.



**Figure 4.** Categories according to metformin dose.



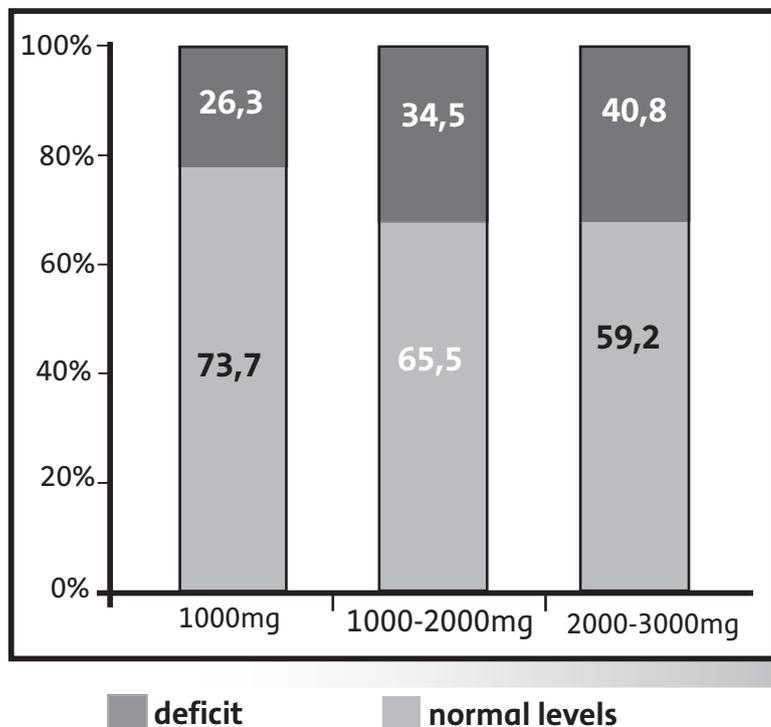
## Discussion

The present study provides data about vitamin B12 status in a Bulgarian population with type 2 diabetes.

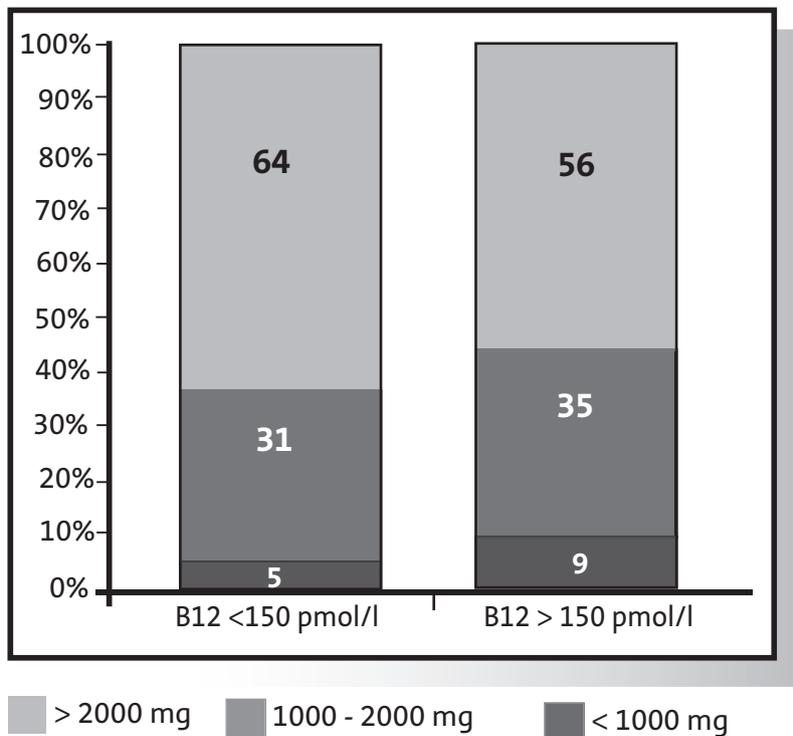
Our results show vitamin B12 deficiency in approximately one third (34%) of the studied patients. The published data on B12 deficiency in such a population vary a lot – between 5,8% and 33%, and this is in part due to the different cut-offs used for defining deficiency (2). The result from this study is in the upper range of the available data and points out the significance of the problem of B12 deficiency in a Bulgarian population with type 2 diabetes – virtually every third patient falls into this category. Currently there is no published data on B12 deficiency either for the Bulgarian population with type 2 diabetes or for the general Bulgarian population. This is a limitation of the full analysis of the results of the present study as it does not allow comparison with other studies assessing the prevalence of B12 deficiency in a Bulgarian population with type 2 diabetes and mainly because it does not allow comparison with the prevalence of B12 deficiency in the general Bulgarian population. It can be assumed that B12 deficiency in the general Bulgarian population is comparable to that found in some other populations – in USA and Finland, as there are no substantial differences in the major determinants of deficiency – vegetarian diet, prevalence of gastrointestinal diseases and use of antiacids. Data from the NHANES study in the USA have shown a B12 deficiency in about 6% of the general population and in about 20% of the subjects above 60 years of age (1). Regarding Europe, there is available data for Finland where the deficiency is 12,1% for the population above the age of 65 (2). In countries like India where the predominant diet is vegetarian the deficiency in the adult population is up to 70% (1,2). Based on this data it can be assumed that the results of this study are in line with the published data, showing a higher prevalence of B12 deficiency among the patients with diabetes in comparison to the general population [4].

Together with the data on B12 deficiency, of major clinical importance are the results of the study concerning the low-normal levels of B12 that do not exclude deficiency. About one third of the study popu-

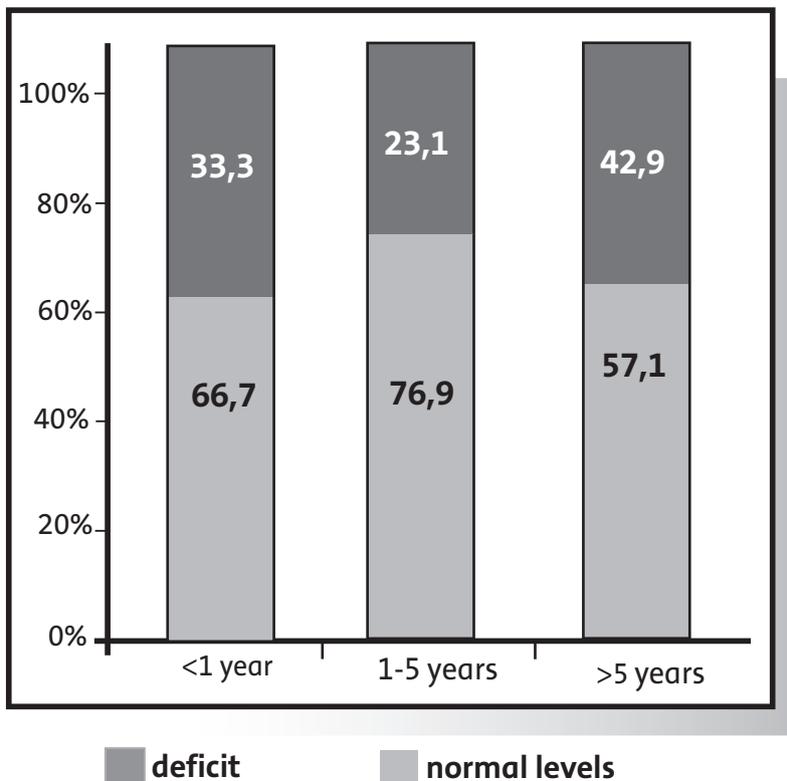
**Figure 5.** B12 status in the groups according to metformin dose.



**Figure 6.** Distribution according to metformin dose in the groups with and without B12 deficiency.



**Figure 7.** B12 status according to duration of metformin therapy.

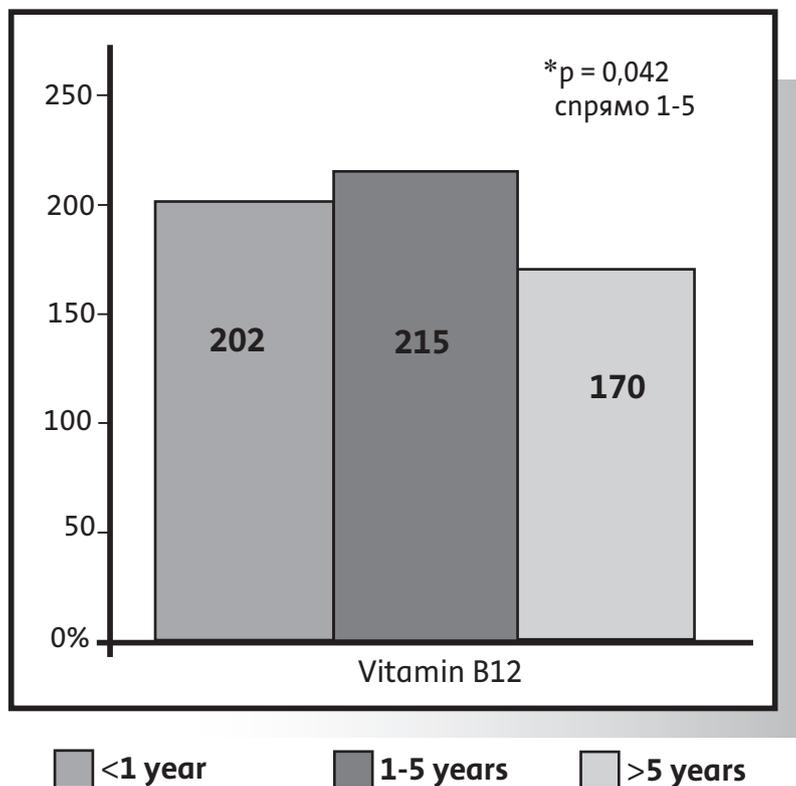


lation (28%) fall into this grey zone which determines the need for further evaluation of the B12 status by assessing some of the related metabolites. Deficiency of B12 may be assumed regardless of normal serum levels if the levels of the related metabolites such as methylmalonic acid are increased. This means that the real deficiency of B12 is higher than the overt deficiency assessed only by the serum level of B12 (1,5). It should be noted that there is no universally adopted cut-off for low-normal level of B12 (4). There are different cut-offs used – 221, 248 and 295 pmol/l (1,4). The lowest cut-off – 221 pmol/l was used in the current study, which, potentially, could underestimate the proportion of patients with potential deficiency who need further evaluation. Regarding the cut-off for overt B12 deficiency, there is also some discrepancy – 111, 148 and 150 pmol/l are used, the latter being most widely adopted and used also in the present study (1,4,5). Collectively applying these cut-offs over one half of the patients with type 2 diabetes in the present study (62%) have or might have a deficiency or it can be assumed that they have levels of B12 which are lower than the undoubtedly normal.

The B12 status of the patients with type 2 diabetes is related to metformin therapy (6-8). Metformin is a fundamental therapy of type 2 diabetes and remains the first-line agent in the algorithm according to the current guidelines (3). In line with the guidelines the majority of the patients in the study are taking metformin – 83,8%. The remaining 16,2% are not on metformin because of gastrointestinal side effects, contraindications or have newly-diagnosed diabetes and are drug-naïve.

The results of the present study show a significant difference in the mean level of B12 between the groups with and without metformin therapy in favor of the group not taking metformin as well as double the prevalence of overt deficiency – 18% vs. 37% in those on metformin therapy. These results are fully in line and in support of the established role of metformin as a risk factor for B12 deficiency and for the need to monitor B12 serum level in patients with type 2 diabetes using such

**Figure 8.** B12 level in the groups with different duration of metformin therapy.



therapy in routine clinical practice (7-11).

While the causative role of metformin for the deficiency of B12 is undoubted, the importance of the dose and the duration of therapy, that determine the risk and the need for screening, is still a matter of debate. There are plenty of published data that support the relationship between both the dose and the duration of metformin therapy for B12 deficiency as well as data in favor of the relationship only of metformin dose (7-13).

Analyses of the relation of both the dose and the duration of metformin therapy was performed in the present study using three dose groups –  $\leq 1000$  mg of metformin, 1000-2000 mg and  $\geq 2000$  mg, and three groups according to the duration of therapy – up to 1 year, 1-5 years and over 5 years. It should be noted that over one half of the patients fall into the groups with the highest dose and the longest duration – 58,7% take metformin between 2000 and 3000 mg and 68,4% are on metformin therapy for more than 5 years.

The results of this study support the role of the dose of metformin and its relationship to the level and deficiency of B12 and do not support the role of the duration of therapy.

Although there is no significant difference in B12 levels in the different dose groups, the results show a clear increase in the percentage of patients with overt deficiency with the increase of metformin dose – 22% in the group on  $\leq 1000$  mg, 32,7% in the group on 1000-2000 mg and 43,5% in the group taking  $\geq 2000$  mg of metformin. In addition, in the group with overt deficiency of B12 the percentage of patients taking the highest dose of metformin – over

2000 mg, is higher than in the groups without overt deficiency – 64% vs. 56%, despite that statistical significance is not reached.

In firm support of the role of metformin dose on B12 level and deficiency are the data from the partial correlation that show significant relationship between B12 level and metformin dose only, the relation being inverse – the increase of metformin dose leads to decrease in B12 level. These data are supplemented by the results of the regression analysis showing that each 250 mg increase in the dose of metformin, increases the risk of B12 deficiency by 15%. This analysis was performed with controlling for age as age is a major risk factor for B12 deficiency. Thus the influence of the factor was eliminated and the effect of the variables of interest was estimated – dose and duration of therapy.

The analysis of the other variable associated with metformin therapy – the duration of therapy, generally does not show a significant relation to the level and deficiency of B12. Similar results have been published by other researchers (14). The percentage of B12 deficiency in the groups with the shortest and the longest duration of metformin therapy is virtually quite similar – 42,9% and 41,2% respectively. A significant difference in B12 level was found between the groups with duration of therapy between 1-5 years and over 5 years with higher level in the latter group. Irrespective of this result, the data from the correlation analysis do not show a relation between B12 level and the duration of therapy with metformin.

#### **Advantages of the study**

The present study provides the first data on vitamin B12 status in a Bulgarian population with type 2 diabetes. The results have clinical implication as they clearly show the need for screening of B12 status in patients on metformin therapy which virtually comprises almost the entire population of patients with type 2 diabetes.

#### **Study limitations**

The major disadvantage of the study is the lack of additional assessment of B12 related metabolite that

would clarify the status of the patents in the grey zone of low-normal levels who may also have a deficiency.

Another limitation is the lack of data and analysis of the subgroup of patients taking antiacids which are a risk factor for B12 deficiency. With no doubt there is a certain percentage of such patients in the study population – these are mainly the patients with cardiovascular events who are taking antiplatelet drugs necessitating antiacid agents.

The number of patients can be considered as another limitation. Probably in a larger population the trends found in this study would have reached statistical significance.

### Acknowledgments

*The study is fully funded by the Medical University of Sofia – Contract D-238, Grant „Support of scientific research in centers of excellence 2017“*

### Conclusions

- About one third of the patients with type 2 diabetes have vitamin B12 deficiency and another third are in the grey zone of low-normal levels that does not exclude deficiency and determines the need of further evaluation of B12 status by some of the related metabolites.

- Vitamin B12 deficiency is twice as common among the patients taking metformin.

- The major factor related to B12 deficiency is the metformin dose – each 250 mg increase of the dose increases the risk of deficiency by 15%.

### References

1. Lanagan R, Goodbred A. Vitamin B12 Deficiency: Recognition and Management. *Am Fam Physician* 2017; 96(6):384-389.
2. Kibirige D, Mwebaze R. Vitamin B12 deficiency among patients with diabetes mellitus: is routine screening and supplementation justified? *J Diab Metab Disord* 2013; 12(1):17.
3. Standards of Medical Care in Diabetes 2019. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: *Diabetes Care* 2019;42(Suppl. 1):S90–S102.
4. Reinstatler L, Qi Y, Williamson R, Garn J, Oakley-Jr G. Association of Biochemical B12 Deficiency With Metformin Therapy and Vitamin B12 Supplements. The National Health and Nutrition Examination Survey, 1999–2006. *Diabetes Care* 2012; 35: 327–333.
5. Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B12 deficiencies. *Food and Nutrition Bulletin*, vol. 29, no. 2 (supplement) 2008, The United Nations University.
6. Chapman LE, Darling AL, Brown JE. Association between metformin and vitamin B12 deficiency in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Metab* 2016;42(5):316-327.
7. Out M, Kooy A, Lehert P, Schalkwijk CA, Stehouwer CDA. Long-term treatment with metformin in type 2 diabetes and methylmalonic acid: Post hoc analysis of a randomized controlled 4.3 year trial. *J Diabetes Complicat* 2018; 32(2):171–178.
8. de Jager J, Kooy A, Lehert P, Wulfel  MG, van der Kolk J, Bets D, et al. Long term treatment with metformin in patients with type 2 diabetes and risk of vitamin B-12 deficiency: randomised placebo controlled trial. *BMJ* 2010;340:c2181.
9. Ko SH, Ko SH, Ahn YB, Song KH, Han KD, Park YM, et al. Association of Vitamin B12 Deficiency and Metformin Use in Patients with Type 2 Diabetes. *J Korean Med Sci* 2014;29(7):965-972.
10. Ting R, Szeto C, Chan M, Ma K, Chow K. Risk Factors of Vitamin B12 Deficiency in Patients Receiving Metformin. *Arch Intern Med* 2006; 166:1975–1979.
11. Haessler S, Parry-Strong A, Krebs JD. The prevalence of low vitamin B12 status in people with type 2 diabetes receiving metformin therapy in New Zealand—a clinical audit. *NZ Med J* 2014;127(1404):8-16.
12. Beulens JW1, Hart HE, Kuijs R, Kooijman-Buiting AM, Rutten GE. Influence of duration and dose of metformin on cobalamin deficiency in type 2 diabetes patients using metformin. *Acta Diabetol* 2015;52(1):47-53.
13. Alharbi TJ, Tourkmani AM, Abdelhay O, Alkhashan HI, Al-Asmari AK, Bin Rashed AM, et al. The association of metformin use with vitamin B12 deficiency and peripheral neuropathy in Saudi individuals with type 2 diabetes mellitus. *PLoS One* 2018;13(10):e0204420.
14. de Groot-Kamphuis DM, van Dijk PR, Groenier KH, Houweling ST, Bilo HJ, Kleefstra N. Vitamin B12 deficiency and the lack of its consequences in type 2 diabetes patients using metformin. *Neth J Med* 2013;71(7):386-390.

# Сърдечно-съдовият автономен тонус е свързан с инсулиновата резистентност при предиабет

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

Категора по Ендокринология, Медицински Университет, София

## Адрес за кореспонденция:

Д-р Румяна Димова  
Клиника по Диабетология, УСБАЛЕ „Акаг. Ив. Пенчев“,  
1431 София, ул. Здраве № 2  
dr.roumyana.dimova@gmail.com

## Резюме

**Целта** на настоящото изследване е да оцени връзката между индиректните индекси за инсулинова чувствителност и инсулинова секреция и сърдечно-съдовата автономна дисфункция (САД) при лица с предиабет.

**Материал и методи:** В изследването са включени общо 265 лица с предиабет (104 мъже), на средна възраст  $44,7 \pm 12,4$  г. и със среден ИТМ  $30,5 \pm 6,2$   $\text{kg/m}^2$ , разделени според НОМА-IR – с НОМА-IR  $\geq 2,5$  и с НОМА-IR  $< 2,5$ , и според наличието на САД – със САД и без САД. При всички участници е оценен глюкозният толеранс посредством стандартен орален глюкозо-толерансен тест. Глюкозният толеранс е дефиниран според критериите на СЗО от 2006 г. Изследвани са плазмена глюкоза на гладно и на 120-мин. по хексокиназен ензимен метод и имунореактивен инсулин на гладно по ECLIA метод и са изчислени НОМА-IR и НОМА- $\beta$ . Функцията на автономната нервна система е оценена с мониторингова система ANX-3,0, която използва стандартните клинични тестове: дълбоко дишане, Валсалва и изправяне от седнала позиция.

**Резултати:** САД се наблюдава при 15,2% в групата с НОМА-IR  $\geq 2,5$  в сравнение с 9,2% в групата с НОМА-IR  $< 2,5$  (OR 1,67 (95% CI:0,76-3,64),  $p=0,036$ ). НОМА-IR е по-висок при лицата с патологичен тест дълбоко дишане, ортостатичен тест и наличие на САД (съответно  $p=0,010$ ,  $p=0,008$ ,  $p=0,015$ ).

**Изводи:** САД вероятно е свързана с инсулиновата резистентност, оценена посредством НОМА-IR, в ранните етапи на нарушен глюкозен толеранс.

**Ключови думи:** сърдечно-съдова автономна дисфункция, инсулинова резистентност, предиабет

## Въведение

Натрупват се доказателства, че не само дисгликемията, но и други кардио-метаболитни рискови фактори представляват потенциални патологични механизми за сърдечно-съдова автономна дисфункция (САД) при лица със захарен диабет тип 2 (ЗД тип 2). Подобряването на глике-

мичния контрол предпазва от развитие на САД при захарен диабет тип 1 (1), докато при ЗД тип 2 добрият гликемичен контрол води единствено до умерено забавяне на нейната прогресия (2). Проучването Steno-2 показва 63% намаляване на честотата на САД при ЗД тип 2 с въвеждане на комплексен терапевтичен подход, което потвърждава мултифакторната ѝ обусловеност (3).

САД се наблюдава и при предиабетни състояния и дори при нормален глюкозен толеранс (НМГТ) при наличие на инсулинова резистентност (4), където е докладвана връзка между вариабилитета на сърдечната честота (ВСЧ) и хиперинсулинемията (5). От друга страна се предполага, че връзката между намаления ВСЧ и глюкозния дисметаболизъм е двупосочна (6), но кое е първичното състояние, което завърта порочния кръг на метаболитни нарушения, остава дискуссионно (7).

Тези данни поставят въпроса за предиктивната стойност на инсулиновата резистентност, независимо от гликемията, като рисков фактор за развитие на САД при предиабет.

**Целта** на настоящото изследване е да оцени връзката между индиректните маркери за инсулинова чувствителност и инсулинова секреция у САД при лица с предиабет.

### Материали и методи

В проучването са включени общо 265 лица с предиабет (104 мъже и 161 жени), на средна възраст  $44.7 \pm 12.4$  г. и със среден ИТМ  $30,5 \pm 6,2$  кг/м<sup>2</sup>, в рамките на скринингова програма за 3Д тип 2, провеждана в Катедра по Ендокринология, Медицински Университет София. Те са разделени според стойността на НОМА-IR – с НОМА-IR  $\geq 2,5$  и с НОМА-IR  $< 2,5$ ; и според наличието на САД – със САД и без САД.

Като изключващи критерии са приети: наличие на вече диагностициран захарен диабет, аритмия или прием на антиаритмична терапия и преживян сърдечно-съдов инцидент.

Всички участници са декларирали тяхното писмено информирано съгласие в съответствие с Декларацията от Хелзинки и правилата за добра клинична практика, като изследването е одобрено от Комисията по Етика към Медицински Университет, София.

Глюкозният толеранс е оценен посредством стандартен орален глюкозо-толерансен тест със 75 г глюкоза след 12-часово гладуване. Плазмената глюкоза на гладно и на 120-мин. в хода на теста е изследвана по хексокиназен ензимен метод (Roche Diagnostics). Глюкозният толеранс е дефиниран според критериите на СЗО от 2006 г. Имунореактивният инсулин (ИРИ) на гладно е оценен с използване на ECLIA метод и са изчислени НОМА-IR и НОМА- $\beta$  по следните формули:  $\text{НОМА-IR} = (\text{плазмена глюкоза (mmol/l)} \times \text{ИРИ (mIU/l)}) / 22,5$  и  $\text{НОМА-}\beta = (20 \times \text{ИРИ (mIU/l)}) / (\text{плазмена глюкоза (mmol/l)} - 3,5) \%$ .

Функцията на автономната нервна система е оценена с автономна мониторингова сис тема ANX-3.0 (ANSAR Medical Technologies, Inc., Philadelphia, PA), която използва стандартните клинични местове: дълбоко дишане, Валсалва, и изправяне

от седнала позиция. Методът ANX-3.0 едновременно и независимо изчислява симпатиковата и парасимпатиковата активност, прилагайки едновременно спектрален анализ на дихателната активност и ВСЧ (8). Изследването е проведено 24 часа след последния прием на медикаменти, оказващи влияние върху автономната функция – антихипертензивни медикаменти, трициклически антидепресанти и SSRIs; без прием на кафе и тютюнопушене минимум 12 часа преди теста; минимум 30 минути след последното хранене; сутрин между 8 – 11 часа.

### Статистически анализ

Статистическият анализ на данните е извършен със статистически пакет SPSS 21.0 (SPSS, Chicago, USA). Данните са представени като средна  $\pm$  стандартно отклонение (SD) и медиана (персентили 25% до 75%). Логаритмична трансформация е използвана за данни с разпределение различно от нормалното. Еднопосочен анализ на дисперсията (One-way ANOVA) е приложен за сравнение на групите с Post Hoc анализ с Tamhane's T2 корекция за множество сравнения. P-value (two tailed) по-малко от 0.05 е прието за статистически значимо.

### Резултати

Основните характеристики на групите участници са представени в Таблица 1. Не се наблюдава значима разлика в нивата на ИРИ на гладно и НОМА- $\beta$  индекс между групите според наличието на САД. НОМА-IR индексът е значимо по-висок при участниците с доказана САД (4,78 спрямо 3,31,  $p=0,015$ ).

САД се установи при 15,2% от участниците в групата с НОМА-IR  $\geq 2,5$  в сравнение с 9,2% в групата с НОМА-IR  $< 2,5$ , като нива на НОМА-IR  $\geq 2,5$  увеличават риска за САД приблизително 1.7 пъти - OR 1,67 (95% CI: 0,76-3,64),  $p=0,036$ . Наблюдава се тенденция към повишени нива на НОМА-IR с увеличаване на броя патологични тестове. НОМА-IR индексът е значимо по-висок при лицата с намален автономен тонус в хода на теста дълбоко дишане и изправяне от седнала позиция (съответно  $p=0,010$ ,  $p=0,008$ ) (Фиг. 1).

### Обсъждане

В настоящото изследване се докладва 15% честота на САД при лица с предиабет и инсулинова резистентност, като нива на НОМА-IR  $\geq 2,5$  увеличават риска от САД над 1,5 пъти. Достъпните в литературата данни са в подкрепа на настоящото проучване, като показват значимо по-висока честота на САД – 38% при хора та със

**Таблица 1.** Основни характеристики на групите според HOMA-IR индекса (HOMA-IR<2,5 и HOMA-IR>2,5) и наличието на сърдечно-съдова автономна дисфункция (САД) – със САД (САД+) и без САД (САД-).

Параметри	HOMA-IR		p
	<2,5	≥2,5	
брой	76	189	
пол (мъже/жени)	22/54	82/107	
възраст (години)	45,1±14,1	46,3±12,2	p=0,454
ИТМ (кг/м <sup>2</sup> )	27,0±5,8	33,2±6,2	p=0,266
Параметри	САД		p
	САД-	САД+	
брой	229	36	
пол (мъже/жени)	31/71	17/19	
възраст (години)	44,7±12,4	54,0±12,1*	<b>p&lt;0,001 спрямо САД-</b>
ИТМ (кг/м <sup>2</sup> )	31,2±6,8	33,0±6,2	p=0,130
ИРИ на гладно (mIU/l)	11,7 (8,10-18,86)	14,29 (8,75-22,38)	p=0,128
ИРИ след натоварване (mIU/L)	33,40 (15,40-64,90)	35,58 (9,81-73,85)	p=0,595
HOMA-β	88,22 (54,09-145,84)	87,22 (56,89-131,03)	p=0,576
HOMA-IR	3,31 (2,20-5,31)	4,78 (3,12-7,76)*	<b>p=0,015 спрямо САД-</b>

Данните са средна ± стандартно отклонение (SD) и средна (персентили 25% до 75%).

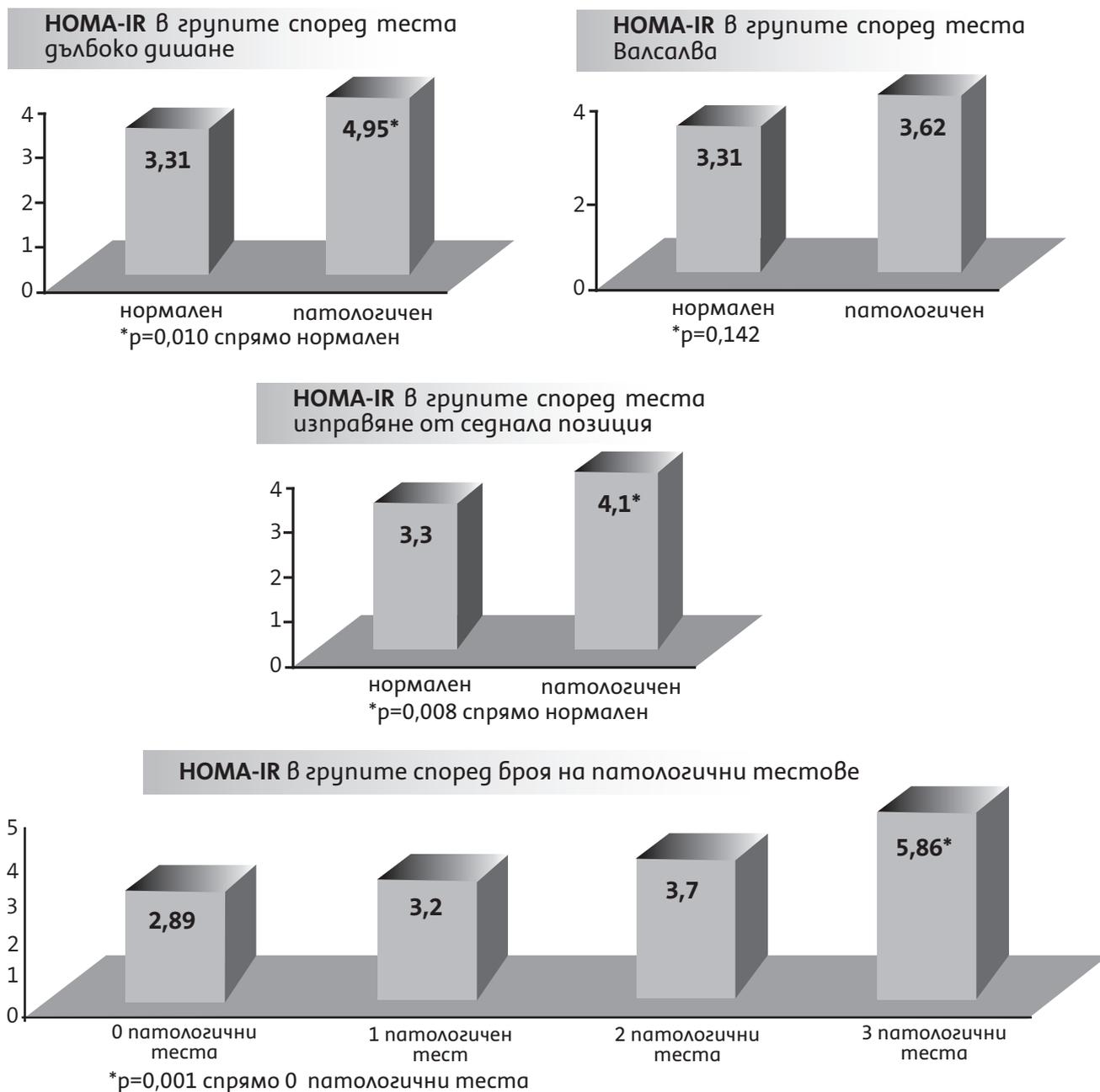
ЗД тип 2 и HOMA-IR ≥2,6 в сравнение с 24% при ЗД тип 2 и HOMA-IR <2,6 (9). Докладвано е, че честотата на САД е по-висока във високо-рискова популация с НМГТ и фамилна анамнеза за ЗД тип 2 - 6,7% в сравнение с 1,6% при здрави лица без фамилна обремененост (10, 11) и при млади индивиди с вродена генерализирана липодистрофия, което предполага, че инсулиновата резистентност съучаства в ранните етапи на развитие на САД (12).

HOMA-IR индексът е значимо по-висок при лицата с патологичен тест дълбоко дишане и изправяне от седнала позиция, и при доказана САД. Тези резултати са в съответствие с други докладвани данни за по-силна връзка между САД и хиперинсулинемията и инсулиновата резистентност, отколкото с малките флуктуации на плазмената глюкоза (13). Тези данни са потвърдени при ЗД тип 2 с голяма давност и намалена парасимпатикова функция (14), при ЗД тип 2 с малка давност и симпатикова хиперактивност (15, 16), при новооткрит ЗД тип 2 (17), както и при недиабетици родственици на лица със ЗД тип 2 (10).

Реципрочна връзка между серумния инсулин на гладно и барорецепторната чувствителност е установена дори при здрави доброволци (18). В 10-годишно проспективно проучване повишените нива на серумен инсулин на гладно и след натоварване изходно са предиктори за намален парасимпатиков тонус при новооткрит ЗД тип 2 независимо от гликемичния контрол (17). Несамо инсулинемията, но и HOMA-IR индексът корелира с ВСЧ и симпто-вагалния дисбаланс при НМГТ, предиабет и ЗД тип 2 (19, 20).

Инсулиновата резистентност на ниво неврони е свързана с инхибиране на PI3K/Akt (фосфатидилинозитол 3'-киназа/Akt) сигналия път, което води до нарушение на невротрофните инсулинови ефекти и митохондриална дисфункция с генериране на окислителен стрес, който е предполагаем подлежащ патолофизиологичен механизъм за развитие на САД (21). Следователно, вероятно инсулиновата резистентност играе ключова роля за развитието на САД, независимо от гликемията.

**Фигура 1.** HOMA-IR индекс в подгрупите според наличие на патологичен тест дълбоко дишане (E:I Ratio), патологичен Валсалва тест и патологичен тест изправяне от седнала позиция (30:15 Ratio), както и според броя патологични тестове.



### Заклучение

САД изглежда е свързана с инсулиновата резистентност в ранните етапи на нарушен глюкозен толеранс. HOMA-IR индексът може да бъде полезен маркер за наличие на САД в тази популация.

### Благодарност

Тази публикация е подкрепена от Министерство на образованието и науката по Национална програма за научни изследвания „Млади учени и постдокторанти“

# Cardiovascular Autonomic Tone is Related to Insulin Resistance in Prediabetes

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

Department of Endocrinology, Medical University of Sofia

## Адрес за кореспонденция:

Romyana Dimova, MD, PhD

Clinic of Diabetology, University Hospital of Endocrinology „Acad. Ivan Penchev“.

1431 Sofia, 2 Zdrave Str.

dr.roumyana.dimova@gmail.com

## Abstract

**The aim** of the present study is to assess the relationship between indirect indexes of insulin sensitivity and insulin secretion and cardio-vascular autonomic dysfunction (CAD) in subjects with prediabetes.

**Material and methods:** A total of 265 subjects with prediabetes (104 males), of mean age  $44,7 \pm 12,4$  years and mean BMI  $30,5 \pm 6,2$  kg/m<sup>2</sup>, divided according to HOMA-IR – with HOMA-IR  $\geq 2,5$  and with HOMA-IR  $< 2,5$ , and according to the presence of CAD – with CAD and without CAD, were enrolled. Glucose tolerance was evaluated during a standard oral glucose tolerance test in all participants. The glucose tolerance was defined according to 2006 WHO criteria. Fasting and 120-min plasma glucose were examined by a hexokinase enzyme method and immunoreactive insulin at fasting by the ECLIA method, and HOMA-IR and HOMA- $\beta$  were calculated. The autonomic nervous system function was evaluated with an ANX-3.0 autonomic monitoring system using standard clinical tests: deep breathing, Valsalva maneuver, and standing.

**Results:** CAD was found in 15,2% of the HOMA-IR  $\geq 2,5$  group in comparison to 9,2% in the HOMA-IR  $< 2,5$  group (OR 1,67 (95% CI:0,76-3,64),  $p=0,036$ ). HOMA-IR is higher in subjects with abnormal deep breathing, standing test and CAD ( $p=0,010$ ,  $p=0,008$ ,  $p=0,015$ , respectively).

**Conclusion:** CAD appears to be associated with insulin resistance, assessed by HOMA-IR, in the early stages of impaired glucose tolerance.

**Key words:** cardiovascular autonomic dysfunction, insulin resistance, prediabetes

## Introduction

There is accumulating evidence that not only dysglycemia, but other cardio-metabolic risk factors are also putative pathogenic mechanisms for cardio-vascular autonomic dysfunction (CAD) in subjects with type 2 diabetes (T2D). The improvement of glycemic control prevents CAD in type 1 diabetes (1), whereas it only moderately delays its progression in T2D (2). The Steno-2 study has demonstrated a 63% reduction of CAD in T2D with the implementation of a complex therapeutic approach confirming its multifactorial determination (3).

CAD may also develop in prediabetes and even in normal glucose tolerance (NGT) in the presence of insulin resistance (4), where a relationship between heart rate variability (HRV) and hyperinsulinemia has been reported (5). On the other hand, a bidirectional relationship between reduced HRV and glucose dysmetabolism has been assumed [6], but which is the primary defect leading to the vicious circle of metabolic abnormalities remains a question of discussion (7).

These findings raise the question about the predictive value of insulin resistance independently of dysglycemia for CAD in prediabetes. Thus, we aimed to assess

the relationship between indirect markers of insulin sensitivity and secretion and CAD in subjects with pre-diabetes.

**Material and Methods**

A total of 265 subjects with prediabetes (104 males and 161 females), of mean age 44,7±12,4 years and mean BMI 30,5±6,2 kg/m<sup>2</sup>, were enrolled at the Department of Endocrinology, Medical University of Sofia, within an ongoing screening program for T2D. They were divided according to HOMA-IR – with HOMA-IR ≥2,5 and with HOMA-IR <2,5; and according to the presence of CAD – with CAD and without CAD.

Previously diagnosed diabetes, arrhythmias or taking anti-arrhythmic drug therapy and experienced vascular events were considered exclusion criteria.

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

Glucose tolerance was evaluated during a standard oral glucose tolerance test with 75 g anhydrous glucose after an overnight fasting. Fasting and 120-min plasma glucose were examined by a hexokinase enzyme method (Roche Diagnostics). Glucose tolerance was defined

according to 2006 WHO criteria. Immunoreactive insulin (IRI) at fasting was assessed using the ECLIA method and HOMA-IR=(plasma glucose (mmol/l)×IRI(mIU/l))/22,5 and HOMA-β=(20×IRI (mIU/l))/(plasma glucose (mmol/l)–3,5)% were calculated.

The autonomic nervous system function was evaluated with an ANX-3,0 autonomic monitoring system (ANSAR Medical Technologies, Inc., Philadelphia, PA) using standard clinical tests: deep breathing, Valsalva maneuver, and standing. The ANX-3,0 method simultaneously and independently computes sympathetic and parasympathetic activity, applying concomitant spectral analysis of respiratory activity and HRV (8). The study was performed 24 hours after the last dose of medications affecting autonomic function – antihypertensives, tricyclic antidepressants and SSRIs; while refraining from coffee and smoking 12 hours prior to the test; at least 30 minutes after the last meal; between 8–11 a.m.

**Statistical analysis**

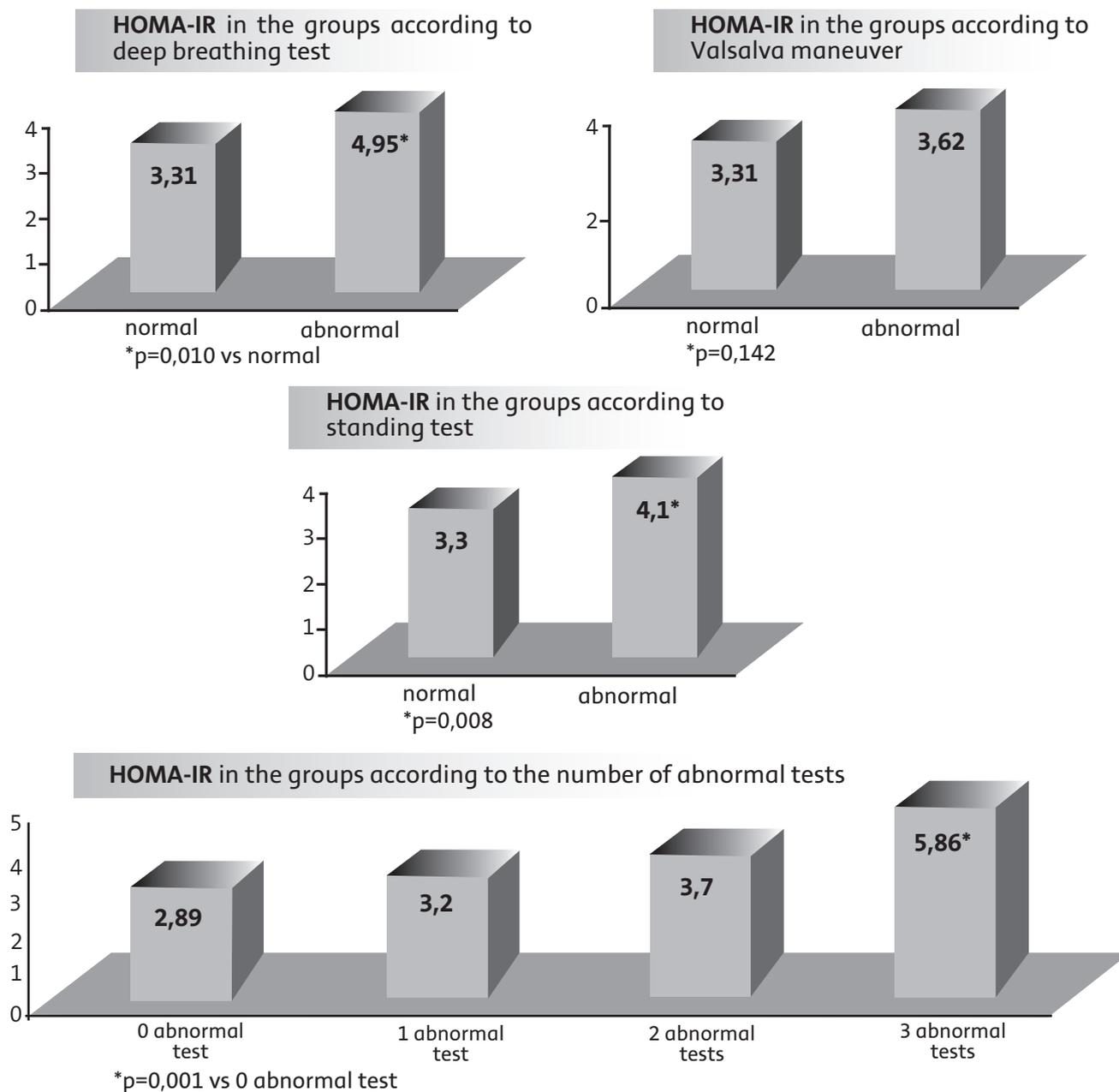
Statistical analysis of the data was performed by SPSS 21.0 (SPSS, Chicago, USA). The data are expressed as mean ± standard deviation (SD) and median (percentile 25% to 75%). Logarithmic transformation was used for skewed data distribution. One-way analysis of variance (One-way ANOVA) was applied for comparison of

**Table 1.** Main characteristics of the groups according to HOMA-IR (HOMA-IR<2.5 and HOMA-IR>2.5) and the presence of cardio-vascular autonomic dysfunction (CAD) - with CAD (CAD+) and without CAD (CAD-).

Parameters	HOMA-IR		p
	<2,5	≥2,5	
number	76	189	
sex (males/females)	22/54	82/107	
age (years)	45,1±14,1	46,3±12,2	p=0,454
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27,0±5,8	33,2±6,2	p=0,266
Parameters	CAD		p
	CAD-	CAD+	
number	229	36	
sex (males/females)	31/71	17/19	
age (years)	44,7±12,4	54,0±12,1*	<b>p&lt;0,001 vs CAD-</b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	31,2±6,8	33,0±6,2	p=0,130
IRI at fasting (mIU/l)	11,7 (8,10-18,86)	14,29 (8,75-22,38)	p=0,128
IRI postload (mIU/L)	33,40 (15,40-64,90)	35,58 (9,81-73,85)	p=0,595
HOMA-β	88,22 (54,09-145,84)	87,22 (56,89-131,03)	p=0,576
HOMA-IR	3,31 (2,20-5,31)	4,78 (3,12-7,76)*	<b>p=0,015 vs CAD-</b>

Data are means ± SD and median (percentile 25% to 75%).

**Figure 1.** HOMA-IR in the subgroups according to the presence of abnormal deep breathing tests (E:I Ratio), abnormal Valsalva maneuver test and abnormal standing from a seated position test (30:15 Ratio); and the number of abnormal autonomic tests.



the groups with Post Hoc analysis with Tamhane's T2 correction for multiple comparisons. A p-value (two tailed) of less than 0,05 was considered statistically significant.

## Results

The main characteristics of the groups are displayed in Table 1. There is no statistically significant difference in fasting IRI and HOMA- $\beta$  between the groups according to the presence of CAD. HOMA-IR is significantly higher

in subjects with CAD (4,78 vs 3,31, p=0,015).

CAD is found in 15,2% of the HOMA-IR  $\geq 2,5$  group in comparison to 9,2% in the HOMA-IR  $< 2,5$  group, as the presence of HOMA-IR  $\geq 2,5$  increases the risk of CAD approximately 1,7 times - OR 1,67 (95% CI: 0,76-3,64), p=0,036. There is a trend towards an elevated HOMA-IR value with the increase in the number of abnormal tests. HOMA-IR is significantly higher in subjects with diminished deep breathing and standing challenge (p=0,010, p=0,008, respectively) (Figure 1).

## Discussion

In the present study, we report a 15% prevalence of CAD in subjects with prediabetes and insulin resistance, HOMA-IR  $\geq 2,5$  increasing the risk for CAD over 1,5 times. Available data is in support of our findings, showing a significantly higher prevalence of CAD – 38% in subjects with T2D and HOMA-IR  $\geq 2,6$  in comparison to 24% in T2D and HOMA-IR  $< 2,6$  (9). The prevalence of CAD has been reported to be higher in a high-risk population with NGT and a family history of T2D – 6,7% as compared to 1,6% in healthy subjects without a family history (10, 11) and in young subjects with congenital generalized lipodystrophy, which suggests that insulin resistance is involved in early CAD development (12).

HOMA-IR was found to be significantly elevated in subjects with an abnormal deep breathing and standing test and confirmed CAD. These results are in line with some data for a stronger relationship between CAD and hyperinsulinemia and insulin resistance rather than with slight fluctuations in plasma glucose levels [13]. This data has been confirmed in T2D of long duration and decreased parasympathetic function (14), in T2D of short duration and sympathetic hyperactivity (15, 16), in newly-diagnosed T2D (17), as well as in non-diabetic offsprings of T2D (10). Even in healthy volunteers, a reciprocal relation between fasting IRI and baroreceptor sensitivity has been reported (18). In a 10 year prospective

study, the elevated fasting and post-load serum insulin at baseline predicted the parasympathetic decline in newly-diagnosed T2D independently of glycaemic control (17). Not only insulinemia, but HOMA-IR too, correlates with HRV and sympatho-vagal imbalance in NGT, prediabetes and T2D (19, 20).

Insulin resistance is associated with inhibition of the PI3K/Akt (phosphatidylinositol 3' – kinase/Akt) signal pathway in the neurons resulting in impaired neurotrophic insulin effects and mitochondrial dysfunction with the generation of oxidative stress which is supposed to be the underlying pathogenic mechanism for CAD (21). Therefore, it seems that insulin resistance plays a crucial role in the development of CAD independently of glycaemia.

## Conclusion

CAD appears to be associated with insulin resistance in the early stages of impaired glucose tolerance. HOMA-IR might be a useful marker for CAD in this population.

## Acknowledgements

*This work is supported by the Bulgarian Ministry of Education and Science under the National Program for Research „Young Scientists and Post-doctoral Students“.*

## References

1. Martin CL, Albers JW, Pop-Busui R; DCCT/EDIC Research Group. Neuropathy and related findings in the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications study. *Diabetes Care* 2014;37:31–38.
2. Ismail-Beigi F, Craven T, Banerji MA, Basile J, Calles J, Cohen RM, et al; ACCORD Trial Group. Effect of intensive treatment of hyperglycaemia on microvascular outcomes in type 2 diabetes: an analysis of the ACCORD randomised trial. *Lancet* 2010;376:419–430.
3. Gaede P, Vedel P, Larsen N, Jensen GV, Parving HH, Pedersen O. Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2003;348:383-393.
4. Laitinen T, Lindström J, Eriksson J, Ilanne-Parikka P, Aunola S, Keinänen-Kiukkaanniemi S, et al. Cardiovascular autonomic dysfunction is associated with central obesity in persons with impaired glucose tolerance. *Diabet Med* 2011; 28(6):699-704.
5. Schroeder EB, Chambless LE, Liao D, Prineas RJ, Evans GW, Rosamond WD, Heiss G. Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. Diabetes, glucose, insulin, and heart rate variability: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Diabetes Care* 2005;28(3):668-674.
6. Mancia G, Bousquet P, Elghozi JL, Esler M, Grassi G, Julius S, et al. The sympathetic nervous system and the metabolic syndrome. *J Hypertens* 2007;25(5):909-920.
7. Wulsin LR, Horn PS, Perry JL, Massaro JM, D' Agostino RB. Autonomic imbalance as a predictor of metabolic risks, cardiovascular disease, diabetes, and mortality. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:2443-2448.
8. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JJ, Donato KA, et al; International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009;120(16):1640-1645.
9. Fang P, Dong J, Zeng F, Tang Z. Analysis of the association between glucose profiles and b-cell function for diabetic cardiovascular autonomic neuropathy in China. *J Diabetes Invest* 2017;8:354-362.
10. Foss CH, Vestbo E, Frøland A, Gjessing HJ, Mogensen CE, Damsgaard EM. Autonomic neuropathy in nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects is associated with urinary albumin excretion rate and 24-h ambulatory blood pressure: the Fredericia Study. *Diabetes* 2001;50(3):630-636.

11. Huggett RJ, Hogarth AJ, Mackintosh AF, Mary DASG. Sympathetic nerve hyperactivity in non-diabetic offspring of patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2006;49(11):2741-2744.
12. Ponte C, Fernandes V, Gurgel M, Vasconcelos ITGF, Karbage LBAS, Liberato CBR, et al Early commitment of cardiovascular autonomic modulation in Brazilian patients with congenital generalized lipodystrophy. *BMC Cardiovasc Disord* 2018;18:6.
13. Liao D, Cai J, Brancati FL, Folsom A, Barnes RW, Tyroler HA, Heiss G. Association of vagal tone with serum insulin, glucose, and diabetes mellitus: The ARIC Study. *Diabetes Res Clin Pract* 1995;30(3):211-221.
14. Gottsäter A, Ahmed M, Fernlund P, Sundkvist G. Autonomic neuropathy in Type 2 diabetic patients is associated with hyperinsulinaemia and hypertriglyceridaemia. *Diabet Med* 1999; 16(1):49-54.
15. Borgognoni L, Picciarella A, Di Stefano A, Fontana V, Russo A, Pascucci M, et al. Correlation between glycemic trends assessed by 24 h continuous monitoring and autonomic activity in patients with recent onset type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2013;100(1):e14-6.
16. Ziegler D, Stroma A, Böhnhofa G, Püttgen S, Bódis K, Burkart V, et al; GDS group. Differential associations of lower cardiac vagal tone with insulin resistance and insulin secretion in recently diagnosed type 1 and type 2 diabetes. *Metabolism* 2018;79:1-9.
17. Toyry JP, Niskanen LK, Mantysaari MJ, Länsimies EA, Uusitupa MI. Occurrence, predictors, and clinical significance of autonomic neuropathy in NIDDM: ten-year follow-up from the diagnosis. *Diabetes* 1996;45:308-315.
18. Watkins L, Surwit RS, Grossman P, Sherwood A. Is There a Glycemic Threshold for Impaired Autonomic Control? *Diabetes Care* 2000; 239 (6):826-830.
19. Perciaccante A, Fiorenti A, Paris A, Serra P, Tubani L. Circadian rhythm of the autonomic nervous system in insulin resistant subjects with normoglycemia, impaired glucose tolerance, type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Disord* 2006; 6: 19.
20. Yoo HJ, Hwang SY, Choi KM, Baik SH, Lee EM, Kim EJ, et al. Clinical implication of body size phenotype on heart rate variability. *Metabolism* 2016;65:1589-1596.
21. Kim B, Feldman EL. Insulin resistance in the nervous system. *Trends Endocrinol Metab* 2012;23(3):133-141.

# www.endotext.org

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



Проф. д-р  
Ексамет Караханян-  
Джамбазова, д.м.н.  
1933 - 2019

На 01. 07. 2019 г. се разделихме с проф. д-р Ексамет Караханян-Джамбазова, д.м.н., изтъкнат и обичан педиатър и ендокринолог.

Проф. д-р Ексамет Карекин Караханян-Джамбазова е родена на 05. 02. 1933 г. в гр. Хасково. Завършва медицина през 1956 г. във ВМИ – Пловдив. Започва работа първоначално като педиатър в Детска Клиника в болницата на гр. Хасково, от края на 1980-те години ръководи новосъздадения Медицински факултет в гр. Пазарджик, след което до пенсионирането си работи в Клиника и Катедра по Детски болести при УМБАЛ „Свети Георги“, създавайки Отделение по детска ендокринология и болести на метаболизма.

Проф. Караханян защитава 2 дисертации – през 1978 г. и 1987 г. в областта на детската тиреоидология и има присъдена научна степен „доктор на медицинските науки“. Автор е на многобройни научни статии и учебници. Специализирала е в Германия, Англия, Дания и Швеция. След пенсионирането си се завръща в родния си град и работи в МЦ „АВИЦЕНА“, като остава консултант на университетската Детска клиника. Със своя богат професионален опит и непресъхваща енергия оказва неоценима помощ в академичното развитие на младите специалисти. През 2004 г. е избрана за Лекар на годината.

Проф. Караханян е организираща мащабни епидемиологични проучвания за откриване на ендокринни заболявания сред децата от ясли, детските градини и училищата в гр. Хасково, въвеждала е нови диагностични и терапевтични методи в цялостната си клинична дейност. През 2014 г. е избрана за почетен гражданин на гр. Хасково за дългогодишната си отдаденост на лекарската професия през своите над 60 години трудов стаж.

*„...Цял живот съм работила това и ми харесва, движението напред, новостите в лечението, учебници, всичко, което помага на хората. Доволна съм от живота си, постигнала съм всичко, което съм искала. Но никога не искам да спирам, спреш ли, приключваш с всичко...“*

ПОКЛОН пред един достойно извървян житейски и професионален път!

Редакционна колегия

# Национален симпозиум по ендокринология

10-12 октомври 2019



Българско дружество по ендокринология

Слънчев бряг, хотел Riu Helios Paradise

*„Диабет – нов подход  
в лечението“*



# Българско дружество по ендокринология *Bulgarian Society of Endocrinology*

Списание  
**ЕНДОКРИНОЛОГИЯ** ISSN 1310-8131

Journal  
**ENDOCRINOLOGIA** ISSN 1310-8131

## Адрес на редакционната колегия:

Клиничен център – УСБАЛЕ  
„Акад. Иван Пенчев“ ул. № Здраве 2, 1431  
София;  
Проф. Мария Орбецова, Главен редактор  
тел. (032) 602486  
Мобилен: 0887771322  
E-mail: morbetzova@abv.bg

## Editorial Board address for correspondence:

Clinical Center of Endocrinology  
„Acad. Ivan Penchev“, University Hospital,  
2 Zdrave Str., 1431 Sofiq, Bulgaria;  
Prof. Maria Orbetzova, *Editor in Chief*  
Tel. (+359) 32602486;  
Mobile: (+359) 0887771322  
E-mail: morbetzova@abv.bg

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

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

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

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

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

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

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

Структурата на статиите трябва да отговаря на следните изисквания:

#### Титулна страница

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

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

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

#### Резюме

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

#### Основен текст

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

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

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

#### Title page

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

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

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

#### Abstract

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

#### Main text

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

#### Tables and figures

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

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

## Таблицы и илюстрации

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

## Книгопис

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

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

## References

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

Chapters of books are cited in the same way, the full name of the chapter first, followed by „In:“, full title of the book, editors, publisher, town, year, first and last pages of the cited chapter.

## Examples

### Reference to a journal article:

- 1. McLachlan S, Prumel MF, Rapoport B.** Cell Medial or Humoral immunity in Graves' ophthalmopathy? *J endocrinol Metab* 1994; 78 (5): 1070-1074
- 2. Christov VI, Gocheva N, Petkova M, Zacharieva S, Tankova Tz, Orbetzova M, et al.** A consensus of the Bulgarian Insitute Metabolic Syndrome on the metabolic syndrome. *Nauka Endocrinologia*. 2010; 2; 53-70 (In Bulgarian)

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

### Примери:

#### Статия от списание:

##### 1. McLachlan S, Prumel MF, Rapoport B.

Cell Medical or Humoral immunity in Graves' ophthalmopathy? *J endocrinol Metab* 1994; 78 (5): 1070-1074

##### 2. Christov VI, Gocheva N, Petkova M, Zacharieva S, Tankova Tz, Orbetzova M, et al.

A consensus of the Bulgarian Institute Metabolic Syndrome on the metabolic syndrome. *Nauka Endocrinologia*. 2010; 2; 53-70 (In Bulgarian)

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

#### Глава (раздел) от книга:

##### 3. Delange F.

Endemic Cretenism. In: Braveman L, Utiger R, editors. *The Thyroid*. 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Co; 1991. p. 942-955.

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

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

### References to a book chapter:

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

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

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

#### Editorial Board address for correspondence:

Clinical Center of Endocrinology  
„Acad. Ivan Penchev“, University Hospital,  
2 Zdrave Str., 1431 Sofiq, Bulgaria;  
Prof. Maria Orbetzova, *Editor in Chief*  
Tel. (+359) 32602486;  
Mobile: (+359) 0887771322  
E-mail: morbetzova@abv.bg

#### Адрес на редакционната колегия:

Клиничен център – УСБАЛЕ  
„Акад. Иван Пенчев“ ул. № Здраве 2, 1431  
София;  
Проф. Мария Орбецова, Главен редактор  
тел. (032) 602486  
Мобилен: 0887771322  
E-mail: morbetzova@abv.bg



# ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ENDOCRINOLOGIA

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

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

**Главен редактор**

Проф. г-р Мария ОРБЕЦОВА, гм

**Редактор на английския текст**

Джеф ТОМАС

**Отговорен редактор**

Румен Нинов

© **Първа корица и графичен дизайн**

Румен НИНОВ

**Editor-in-chief**

Prof. Maria ORBETZOVA, MD PhD

**English language editor**

Jeff THOMAS

**Art director**

Rumen NINOV

© **Cover&Design**

Rumen NINOV

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

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

**Адрес на редакционната колегия:**

Клиничен център – УСБАЛЕ, „Акад. Иван Пенчев“ ул. № Здраве 2, 1431 София;  
Мобилен: 0887771322 (Проф. Мария Орбецова), E-mail: morbetzova@abv.bg

**Editorial Board address for correspondence:**

Clinical Center of Endocrinology „Acad. Ivan Penchev“, University Hospital,  
2 Zdrave Str., 1431 Sofia, Bulgaria;  
Mobile: (+359) 0887771322 (Prof. Maria Orbetzova) E-mail: morbetzova@abv.bg

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

- SCOPUS Elsevier

**Bibliographic Databases  
(since 2001)**

- EMBASE

- Bulgarian Citation Index

**(since 1996)**

- EBSCO

**(since 2019)**