



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

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

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

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

A. Isidori (Rome)/А. Изидори (Рим)

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

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

G. Krassas (Thessaloniki)/Г. Крассас (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 (Мадрид)

Съдържание**Обзори**

- Кабакчиева, Пламена П., Гатева, Антоанета Т., Каменов, Здравко А.
Ендоканабиноидна система – ролята ѝ в метаболизма и фертилитета 73

Оригинални статии

- Белчева, Милена И., Йотова, Виолета М., Бочева, Яна Д., Балева, Боян Д., Калева, Валерия И.
Кардиометаболитен риск при млади възрастни в дълготрайна ремисия на лекувана в детството остра лимфобластна левкемия – пилотно проучване от един център 83

- Шейтанова, Тания З., Заркова, Виолета Л., Орбецова, Мария М., Генчев, Генчо Д.
Определяне на референтни стойности на андрогенни стероиди в урината при българска популация във възрастта 16-30 години 100

- Тотомирова, Цветелина Ц., Арнаудова, Мила В., Владева, Стефка В.,
Лефтеров, Ивайло Н., Джуров, Калин К.
Ефективност в реални клинични условия и методи на лечението на диабет за Балканския регион – данни от проучването RECAP-DM BALKAN STUDY в България 120

- Указания за авторите 134

Journal **Endocrinologia** volume XXV, number 2 /2020

Contents**Reviews**

- Kabakchieva, Plamena P., Gateva, Antoaneta T., Kamenov, Zdravko A.
The Endocannabinoid System – its Role in Metabolism and Fertility 73

Original articles

- Belcheva, Milena I., Iotova, Violeta M., Bocheva, Yana D., Balev, Boyan D., Kaleva, Valeria I.
Cardiometabolic Risk in Young Adult Survivors of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia – A Single-Center Pilot Study 92

- Sheytanova, Tanya Z., Zarkova, Violeta L., Orbetzova, Maria M., Genchev, Gencho D.
Assessment of Referent Values of Androgenic Steroids in Urine of Bulgarian Population at 16-30 Years of Age 110

- Totomirova, Tzvetelina T., Arnaudova, Mila V., Vladeva, Stefka V., Lefterov, Ivaylo N., Djurov, Kalin K.
The Real-Life Effectiveness and Care Patterns of Diabetes Management Study for the Balkan Region – a Report on the Bulgarian Dataset 126

- Instructions to authors 134



Ендоканабиноидна система – ролята ѝ в метаболизма и фертилитета

Кабакчиева, Пламена П., Гатева, Антоанета Т., Каменов, Здравко А.

Клиника по Ендокринология, УМБАЛ „Александровска“,

Катедра по вътрешни болести, Медицински университет, София

Постъпване: 10.03. 2020 г./ Приемане: 26. 04. 2020 г.

The Endocannabinoid System – its Role in Metabolism and Fertility

Kabakchieva, Plamena P., Gateva, Antoaneta T., Kamenov, Zdravko A.

Department of Endocrinology, Alexandrovska University Hospital,

Department of Internal Medicine, Medical University, Sofia

Submitted: 10.03. 2020 / Accepted: 26. 04. 2020

Резюме

Повишеният интерес в областта на ендоканабиноидите през последните години доведе до поредица от изследвания, с които познанията ни относно тази мултифункционална хомеостатична система се обогатиха. Ендоканабиноидите са биоактивни лиганди, участващи в множество физиологични и патофизиологични процеси в човешкото тяло, като най-значима в ендокринологичната област е ролята им в модулацията на енергийната обмяна и глюкозната хомеостаза. Това бе и причината за създаването на първия ендоканабиноид-рецепторен антагонист за лечение на затлъстяването – римонабант, който показва значителни ползи в контрола на телесното тегло, а с това и в контрола на гликемията и дислипидемията. Допълнително нарастващите изследвания сред животни и хора даде потвърждение на това, че ендоканабиноидната система играе важна роля в контрола на репродуктивната функция при двата пола, както на централно, така и на периферно ниво. Ендоканабиноидите участват в редица процеси в женската репродуктивна система, включващи фоликулогенеза, овулация, зреене на овоцита, имплантация и поддържане на ранната бременност. Преди повече от 10 години се заражда и хипотезата за ролята на ендоканабиноидите в патогенезата на синдрома на поликистозни яйчници. Днес ендоканабиноидите се възприемат като потенциални биомаркери за инфертилитет при мъжа и жената.

Abstract

Endocannabinoids have gained serious interest in recent years, and this has led to an accumulation of quality research data enhancing our knowledge of this multifunctional homeostatic system. Endocannabinoids are bioactive ligands involved in many physiological and pathophysiological processes in the human body. Their probably most important role in the field of endocrinology is to modulate energy metabolism and glucose homeostasis. This was the cause for development of the first endocannabinoid-receptor antagonist for the treatment of obesity, rimonabant, which has shown significant benefits in controlling body weight and thus in controlling glycemia and dyslipidemia. Furthermore, the increasing number of studies in animals and humans confirmed that the endocannabinoid system plays an important role in controlling reproductive function in both sexes, at both central and peripheral levels. Endocannabinoids are involved in a number of processes in the female reproductive system, including folliculogenesis, ovulation, oocyte maturation, implantation, and maintenance of early pregnancy. More than 10 years ago, the hypothesis for the role of endocannabinoids in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome was born. Endocannabinoids are nowadays perceived as potential biomarkers of infertility in men and women.

The aim of the review is to briefly summarize the

Обзорът има за цел да обобщи натрупаните познания в областта на ендоканабиноидите, участието им в метаболитния контрол и глюкозната хомеостаза, както и да анализира и систематизира натрупаните до момента литературни данни относно участието на ендоканабиноидната система в женската репродуктивна система и в частност при синдрома на поликистозни яйчници.

Ключови думи:

ендоканабиноидна система; лечение на затлъстяване; контрол на гликемия; женска репродуктивна система; синдром на поликистозни яйчници; инфертилитет

Въведение

Интересът към канабиноидите датира от средата на миналия век, когато през 1960 г. се изолира активното вещество на канабиса (*Cannabis sativa*) – Δ^9 -тетрахидроканабинол (1). Той е орексигенен фактор, осъществяващ ефектите си посредством свързване със СВ1 рецептор (СВ1R) и СВ2 рецептор (СВ2R) – два G-протеин свързани рецептори. След установяването на това важно откритие изследванията се насочват към търсенето на техните едногоенни лиганди – ендоканабиноидите. Те заедно с двата рецептора – СВ1 и СВ2, както и ензимите, които ги изграждат и разграждат, формират ендоканабиноидната система (2). Днес тя се разглежда като мултифункционална хомеостатична система, която участва в контрола на множество физиологични процеси в организма, отнасящи се към различни сфери на медицината – от неврологията и онкологията, през имунологията и ендокринологията до репродуктивната медицина. Ендоканабиноидите участват в контрола на апетита на централно ниво, а на периферно ниво имат отношение към инсулиновата чувствителност (3). Те имат орексигенно действие, а техният първи СВ1-рецепторен антагонист е с изразени анорексигенни ефекти. Неговите ползи бяха потвърдени на базата на проучвания с медикамента – римонабант, който показва благоприятен ефект също и върху дислипидемията и гликемията (4).

Изследвания върху животни и хора потвърждават, че цялата ендоканабиноидна система е активна на ниво яйчници. Ендоканабиноидите играят важна роля във всички нива и етапи на женската полава ос – от развитието и зрението на овоцита до ражда-

existing knowledge in the field of endocannabinoids, their involvement in metabolic control and glucose homeostasis, as well as to analyze and systematize the literature accumulated to date on the involvement of the endocannabinoid system in the female reproductive system and in particular the polycystic ovary syndrome.

Key words:

endocannabinoid system; treatment of obesity; glycaemia control; female reproduction; polycystic ovary syndrome; infertility

нето (5). Това им отрежда важно място в репродукцията при жената. Благодарение на тези ефекти се предполага, че лигандите и метаболизиращите ги ензими биха могли да бъдат надеждни биомаркери за оценка на инфертилитета при жената.

Участието на ендоканабиноидната система в регулацията на енергийния баланс от една страна и в овариалната функция от друга повдига въпроса дали тя играе роля в патофизиологията на синдрома на поликистозни яйчници (СПЯ). Предполага се, че ендоканабиноидите може да взаимодействат с овариалната функция, модулирайки механизми, участващи в енергийния баланс и метаболитния контрол. Преди повече от 10 години е създадена хипотезата за влиянието на ендоканабиноидната система в генезата на СПЯ (6), но и до днес нейната роля е все още хипотетична и търси още потвърждения.

Обзорът има за цел да представи общ преглед на това, какво е ендоканабиноидна система и какви са нейните физиологични и патофизиологични ефекти, да се систематизират и анализират натрупаните до момента данни относно участието на ендоканабиноидите в женската репродукция и ролята им в патофизиологията на синдрома на поликистозни яйчници.

Общ преглед на ендоканабиноидната система

Ендоканабиноидите са деривати на ненаситените мастни киселини, които са широко разпространени в човешкото тяло. Отделят се от мембранните фосфолипиди, като се синтезират при необходимост (on demand) от клетката.

Основните ендоканабиноидни лиганди са два.

N-арахидоилетаноламин, още познат като анандамид (AEA), е първият открит ендоканабиноид, изолиран от свински мозък през 1992 г. (7), последван след това от втория изолиран ендоканабиноид – 2-арахидоноилглицерол (2-AG) през 1995 г. (8, 9). Прекурсор на AEA е N-арахидоилфосфатидилетаноламин (NAPE), който посредством NAPE-хидролизираща фосфолипаза D (NAPE-PLD) се хидролизира до анандамид. Синтезираният AEA се отделя в екстрацелуларното пространство, където той може да действа по автокринен или паракринен път чрез активация на канабиноидните рецептори. 2-AG се отделя също от мембраните „on demand“ след конверсия на диацилглицерол в 2-AG чрез sn-1-диацилглицерол липаза (DAGL).

Биологичните ефекти на AEA и 2-AG се осъществяват първо след захващането им от клетката, посредством предполагаеми ендоканаби-

ноид-мембранны транспортери (EMT) (10). Ендоканабиноид-медираните ефекти се прекъсват бързо чрез интрацелуларна ензимна деградация. Основният ензим, разграждащ AEA, е амид-хидролаза на мастните киселини (fatty acid amide hydrolase, FAAH) (11) и за 2-AG – моноацилглицерол липаза (monoacylglycerol lipase, MAGL) (12).

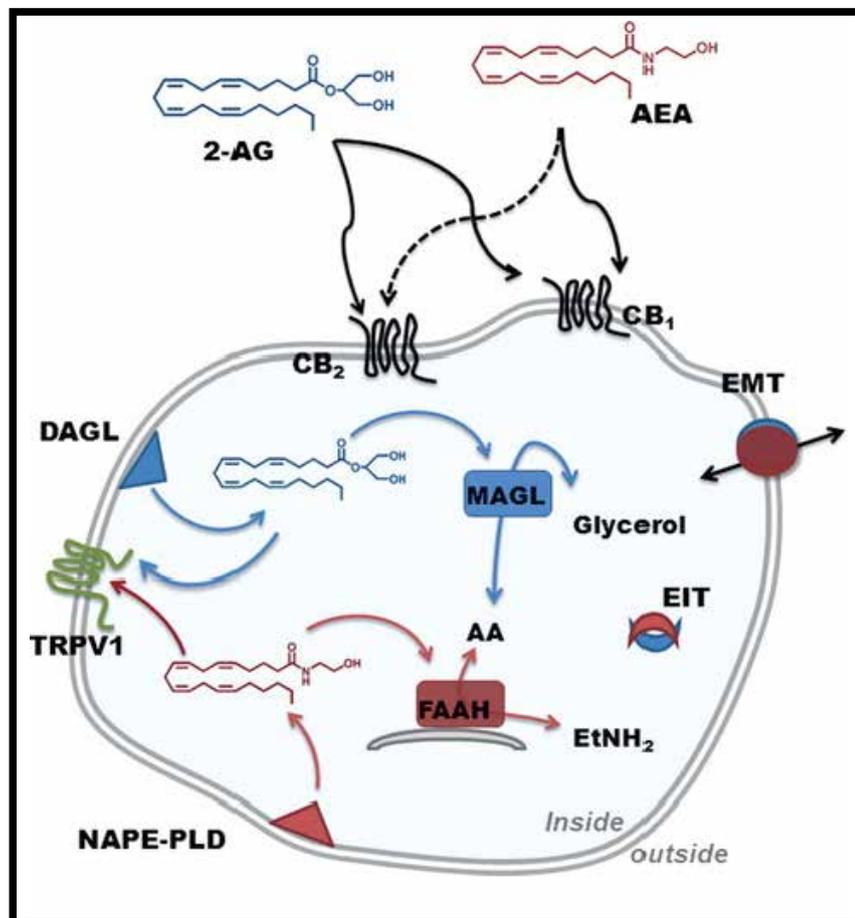
Ендоканабиноидите активират същите G-протеин рецептори (CB1 и CB2), с които се свързва психоактивното вещество на канабиса – Δ^9 -тетрахидроканабиол. Към групата на ендоканабиноидните рецептори се причислява и transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) – йонен канал, който се активира от двата лиганда и множество метаболизиращи ензими от интрацелуларната клетъчна стена (13).

Фигура 1 схематично представя главните участници в ендоканабиноидната система.

Фигура 1. Локализация на основните елементи на ендоканабиноидната система в репродуктивната клетка (14).

Легенда:

- AA: Арахидонова киселина;
- AEA: Анандамид (N-арахидоноилетаноламин);
- 2-AG: 2- Арахидоноилглицерол;
- CB1/2: Тип 1 и 2 канабиноидни рецептори;
- DAGL: Диацилглицерол липаза;
- ECS: Ендоканабиноидна система;
- EIT: Ендоканабиноиден интрацелуларен транспортер;
- EtNH₂: Етаноламин;
- FAAH: Амид-хидролаза на мастните киселини;
- MAGL: Моноацилглицерол липаза;
- NAPE-PLD: N-ацил-фосфатидилетаноламин-специфична фосфолипаза D;
- TRPV1: Transient receptor potential vanilloid 1.



Първоначално се е смятало, че първичната локализация на СВ1R е била в централната нервна система, а СВ2R се локализира в клетките на имунната система. Днес се знае, че двата рецептора са разпространени в много други органи и системи и дори те могат да съществуват едновременно върху повърхността на една и съща клетка.

СВ1 се локализира също в периферните тъкани като яйчници, ендометриум, тестис, черен дроб, сърце, тънки черва, пикочен мехур и периферните клетки като лимфоцитите (15-17). СВ2 рецепторите са изолирани за първи път от слезка на плъх и човешки миелоидни клетки (18) и затова се е смятало, че основно се експресира в имунната система. СВ2 рецептори също са установени и в редица други тъкани, като ЦНС (19), ембрионални стволови клетки (20), плацентата (21), миоетриум (22), яйчник (23), стомашно-чревен тракт (24), черен дроб (25) и сърце (26).

Физиологична роля на ендоканабиноидната система

Нараства броя на данните, отнасящи се до ефектите на ендоканабиноидите в различните органи и системи. Въз основа на натрупания досега опит с римонабант и изследванията, проведени върху животински модели и хора, би могло да се обобщи, че ендоканабиноидната система участва в различни физиологични функции, много от които свързани с поддържане на хомеостазата, невропротекцията, модулиране на болковите възприятия, регулацията на моторната активност и също контролиране на паметовите процеси в мозъка. Допълнително ендоканабиноидната система допринася за модулиране на имунната система и възпалителния отговор. Повлиява сърдечно-съдовата и респираторната система, посредством контролиране на сърдечната честота, артериалното налягане и бронхиалната функция (2) (Фиг. 2).

Ендоканабиноидите участват в регулацията на процесите на хранене и енергийна обмяна, както на централно, така и на периферно ниво. СВ1-рецептори са локализирани във всички мозъчни структури, ангажирани в контрола на апетита, включващи хипоталамуса (28), nucleus arcuatus (29), вагусовия нерв и други мозъчни центрове, контролиращи ситостта, посредством нервни сигнали от гастро-интестиналния тракт (30). Изследванията показват, че нивата на ендоканабиноидите в мозъка се увеличават под влияние на остър или хроничен стрес, или токсична причина, което има за цел да възстанови „нормалната“ хомеостаза (31, 32). Тези данни предполагат, че СВ1-рецепторите се активират при гладуване, за да регулират нивата на орексигенните и

анорексигенните медиатори и по този начин да индуцират прием на храна (33). Орексигенният ефект на ендоканабиноидите вероятно се осъществява посредством медиатора – невропептид Y (3). Активирането и потискането на СВ1-рецепторите води до промяна в нивата му, като съответно ги увеличава или намалява (34, 35).

На периферно ниво ендоканабиноидите и СВ1-рецептори са изолирани в множество клетки и тъкани, участващи в енергийната хомеостаза, в това число: черва (36), черен дроб и хепатоцити (37), бяла мастна тъкан (38, 39) и адипоцити (38, 40-42), скелетна мускулатура (43) и панкреас (38, 44). АЕА и 2-АГ промотират липогенезата, докато СВ1-рецепторният антагонист усилва липолизата и стимулира глюкозния метаболизъм, посредством повишаване на афинитета и активацията на глюкозните транспортери тип 4 (GLUT4) (40, 45, 46).

В обобщение би могло да се каже, че ендоканабиноидите във физиологични условия участват във „фината настройка“ на метаболитните процеси в тялото, но при свръхактивиране на системата изглежда, че допринасят за развитието на метаболитните нарушения и с това за оформянето на абдоминален тип обезитет, дислипидемия и хипергликемия. Плазмените нива на ендоканабиноидите е установено, че са повишени при хора със затлъстяване (47, 48) и при пациенти със захарен диабет тип 2 (49, 50). Има данни също, че плазмените нива на 2-АГ са повишени при лица с андроиден тип обезитет и негативно корелират с инсулиновата чувствителност, независимо от количеството на мастната тъкан (49, 51). Допълнително в случаи на затлъстяване, индуцирано от повишен прием на храна, и двата показателя - лиганд и СВ1 рецептор са показали свръхактивация (52). Интересен е също фактът, че СВ1-рецептор „knockout“ мишки са били резистентни към затлъстяване, индуцирано от повишен прием на храна (53). Всички тези данни насочват към тясна връзка между обезитета и свръхактивацията на ендоканабиноидната система. Доказано е, че тя се реализира на ниво хипоталамус и периферни тъкани – мастна тъкан, панкреас, скелетна мускулатура и черен дроб (54).

Приложение на ендоканабиноидите във фармакотерапията на затлъстяването

След установяването на новите локализации на ендоканабиноидните рецептори и ангажирането на системата в регулацията на различни физиологични и патологични процеси, включващи стрес, имунна система, контрол на апетита и репродукцията при мъжа и жената, са започнали изследвания в насока търсене на техния фармакологичен потенциал.

Първият одобрен за клинична употреба СВ1-ре



Фигура 2.

Влияние на ендоканабиноидната система върху различни процеси в човешкия организъм (Адаптирано по 27).

цепторен блокатор за лечение на затлъстяване е римонабант (SR141716A) (4). Натрупаните данни от клиничните изпитвания с този препарат - RIO-Lipids, RIO-Europe, RIO-NorthAmerica и RIO-Diabetes (55, 56) са показали добри терапевтични ефекти на римонабант върху контрола на телесното тегло и благоприятно повлияване на сърдечно-съдовите рискови фактори (56-58). Допълнителните ефекти, установени при лечение с римонабант включват: подобрение в нивата на адипонектин, HDL, триглицериди и гликиран хемоглобин при пациенти със захарен диабет (55, 58). Две години след регистрирането на препарата в Европа, той е изтеглен от аптечната мрежа поради натрупаните данни за повишаване на депресивните епизоди и суицидният риск (59, 60).

Към момента се провеждат изследвания в насока търсене на нов периферно действащ CB1-рецепторен блокатор за ефективно лечение на затлъстяването и свързаните с него усложнения, които да е с по-малка пенетрация през кръвно-мозъчната бариера. Активацията на CB2-рецепторите, от друга страна, се предполага също, че може да има благоприятен ефект върху телесното тегло и затова фармацевтичната индустрия разработва CB2-рецепторни агонисти за лечение за затлъстяването (4).

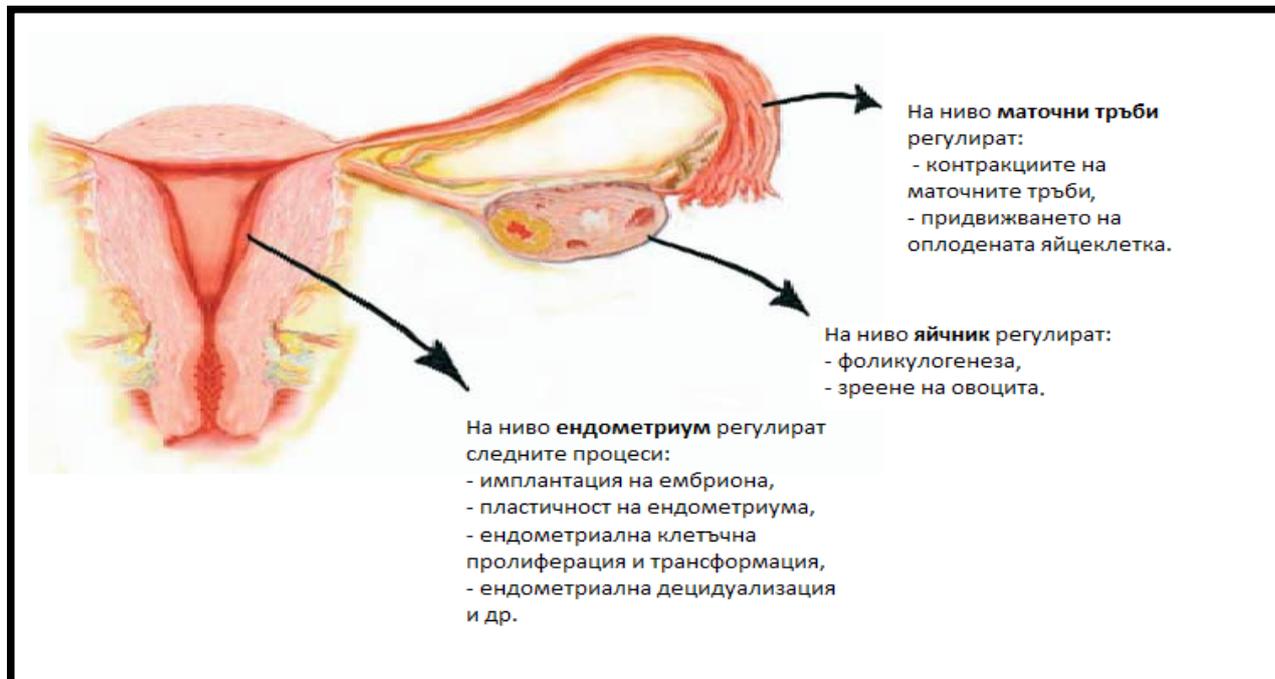
Ендоканабиноидите играят важна роля в няколко процеса в женския репродуктивен тракт, включващи фоликулогенеза, овулация, зреене на овоцита, имплантация и ранна бременност (22, 61-65) (Фиг. 3).

Плазмените нива на АЕА варират през менструалния цикъл, като са най-високи във фоликуларна фаза (67, 68). Това е от особено значение за реализиране на бременност (65). Високите плазмени нива на АЕА и свързаната с това пониска активност на FAAH в периода на имплантация на ембриона се асоциират с повишен риск от спонтанен аборт. Тази връзка е потвърдена от две проучвания. Първото докладва, че жени със спонтанен аборт са имали по-ниска FAAH-активност спрямо здрави контроли (69). Второто проучване сравнява нивата на АЕА сред жени с предстояща IVF/ICSI процедура. При тези от тях с реализирана бременност са измерени по-ниски нива на АЕА спрямо жените с неуспех от *in-vitro* процедурата (22).

В обобщение – ниските нива на АЕА подпомагат маточната рецептивност и са необходими за поддържане на бременността, докато около периода на термин високите нива на АЕА са необходими за раждането, вероятно поради хидролизата, на която се подлага анандамида и от това - покачващите се нива на простагландините (54).

Ендоканабиноидите в женския репродуктивен тракт

Фигура 3. Най-важни биологични ефекти на ендоканабиноидите в женския репродуктивен тракт (Адаптирано от 66).



Нива на ендоканабиноидите в яйчника и фолликуларната течност

Нежеланите ефекти на Δ^9 -тетрахидроканбинол са свързани с фолликулогенезата и овулацията, като се счита, че този фитоканабиноид се асоциира с ниско качество на овоцитите и евентуално ановулация и инфертилитет. Количество на АЕА е определяно във фолликуларна течност, посредством аспирация при жени, подлагащи се на IVF-процедура (70). Изследванията са показали, че цялата ендоканабиноидна система е активна на ниво яйчник. CB1 и CB2 рецепторите, както и NAPE-PLD и АЕА са били идентифицирани в яйчниковата тъкан (64). Имунологично е локализирана експресията на CB1R и CB2R в медулата и кортекса на яйчника. В кортекса рецепторите са експресирани върху гранулозните клетки на примордиалния, първичния, вторичния и третичния фоликул, както и върху тека-клетките на вторичен и третичен фоликул. Двама рецептора са установени също в corpus luteum и corpus albicans. NAPE-PLD е експресиран в гранулозните и тека-клетките на вторичен и третичен фоликул, в corpus luteum и в corpus albicans, което предполага, че АЕА основно се продуцира от гранулозните клетки на растящите фоликули, но не и от овоцитите (64). На базата на тези резултати се предполага, че АЕА може би играе роля в

антралната фаза на фолликулогенезата.

Интересни са данните, че измерваните нива на АЕА във фолликуларна течност, аспирирана от фоликули на жени, подлагащи се на контролирана овариална стимулация за предстояща IVF/ICSI- процедура, са били по-високи във фоликулите със зрели овоцити, в сравнение с тези с незрели овоцити ($1,56 \pm 0,11$ срещу $0,99 \pm 0,09$ pM) (64). Концентрация на АЕА от 1,09 pM във фолликуларна течност има предиктивна стойност за зрялост на овоцита в 77% от случаите, подкрепящо хипотезата, че нивата на АЕА във фолликуларна и ободуктална течност може да бъдат свързани със зрелостта на овоцитите (64, 70). Тези ефекти на анандамида вероятно се осъществяват посредством свързване с CB2-рецепторите, които са локализирани чрез имунохистохимичен анализ в овоцити на третичен фоликул, но не и върху такива в друга фаза на развитие (64).

Ендоканабиноидна система и синдром на поликистозни яйчници

Синдромът на поликистозни яйчници (СПЯ) е сред най-често срещаните ендокринопатии, засягащи млади жени. Той се характеризира с наличието на хиперандрогенизъм, овулаторна дисфункция и поликистозна морфология на яйчниците (71), представени в различна степен и оформящи четири фенотипни групи (Табл. 1).

Таблица 1. Фенотипни групи.

Критерий	Фенотип А	Фенотип В	Фенотип С	Фенотип D
Хиперандрогенизъм (клиничен и/или биохимичен)	+	+	+	-
Овулаторна дисфункция	+	+	-	+
Поликистозна морфология на яйчниците	+	-	+	+

В проучване на българска популация жени със СПЯ преобладават пациенти с класическата форма на синдрома (фенотип А и В). Голяма част от тях са били със затлъстяване и инсулинова резистентност (72), които се оказват най-важните фактори за развитие на метаболитен синдром и оформящият се в резултат на това сърдечно-съдов рисков профил при жените със СПЯ (73, 74). Медикаментозното повлияване на инсулиновата резистентност посредством инсулинови чувствителни води до редукция в нивата на редица адипоцитокини, свързани с инсулиновата резистентност (лептин, резистин и тумор некрозис фактор 1), и хипоталамичния невропептид Y в проучване на Орбецова и съавтори (2011 г.). Тази терапия допълнително оказва благоприятни ефекти върху сърдечно-съдовия рисков профил на жените със СПЯ и съпътстващата инсулинова резистентност (75).

Преди повече от 10 години се заражда хипотезата, за влиянието на ендоканабиноидната система в етиопатогенезата на СПЯ. Обещаващите добри метаболитни резултати от терапията с римонабант предполагат, че и при жените със СПЯ той ще доведе до намаляване на инсулиновата резистентност, телесното тегло, подобряване на липидния профил и повишаване на нивата на адипонектин. Допълнително се е считало, че нарушенията на хипоталамо-хипофизо-гонадна ос и променената пулсативност в секрецията на гонадотропния рилийзинг хормон (GnRH) ще се повлияят благоприятно от терапията с СВ1-рецепторния антагонист (6).

Последващите изследванията с римонабант сред жени със СПЯ и обезитет показват добри ефекти върху инсулиновата резистентност. Терапията с медикамента допълнително води до намаляване на нивата на аланин аминотрансферазата (АЛАТ) (76).

Все още не са ясни точните механизми, с които ендоканабиноидната система може да съучаства в патогенезата на синдрома на поликистозни яйчници. Сред плъхове е установено, че активацията

на СВ1R от АЕА в панкреасните бета-клетки може да индуцира инсулинова хиперсекреция и инсулинова резистентност (77, 78). Тези наблюдения предполагат, че локалните ефекти на ендоканабиноидите на ниво панкреас може също да играят роля в СПЯ-асоцираната инсулинова резистентност. Ановулацията при СПЯ може да се дължи на комплексната връзка между ендоканабиноидите, лептиновата продукция и обезитета (79).

Нови проучвания в областта на ендоканабиноидната система и СПЯ

Въпреки изказаната хипотеза за връзка между ендоканабиноидната система и СПЯ, броят на научните изследвания в тази област е недостатъчен.

В проучване сред тайванска популация при жени със СПЯ е установено, че нивата на ендоканабиноидите – анандамид и 2-арахидонилглицерол в периферни мононуклеарни клетки са били по-високи спрямо тези при здрави контроли. Допълнително е установено, че повишена експресия на СВ1R в периферни мононуклеарни клетки и висцерална мастна тъкан е налице при жените със СПЯ, спрямо здравата популация. В същото проучване се открива позитивна корелация между експресията на СВ1 mRNA и нивата на ендоканабиноидите с тези на кръвната захар и имунореактивния инсулин на втория час в хода на орален глюкозо-толерантен тест. Авторите на проучването установяват, че СВ1R е единственият фактор, независимо асоцииращ се с инсулиновата резистентност. Въз основа на получените резултати те стигат до заключението, че ендоканабиноидната система е тясно свързана с инсулиновата резистентност при СПЯ (80).

Cui и съавтори (2017 г.) изследват експресията на FAAH и СВ1R в ендометриум в трите фази на менструалния цикъл – менструална, пролиферативна и секреторна, като очаквано нивата на ензима са се повишавали сигнификантно в секреторната фаза, спрямо другите две фази. Тази тенденция е наблюдавана и при двете

изследвани групи – жени със и без СПЯ. Авторите установяват също, че нивата на FAAH при жените със СПЯ са били значимо по-ниски във всяка фаза на менструалния цикъл, спрямо жените без СПЯ. Допълнително е установена сигнификантна позитивна корелация между инсулиновата резистентност (оценявана посредством количествен индекс за инсулинова чувствителност – Quantitative Insulin Sensitivity Check Index [QUICKI]) и експресията на FAAH в пролиферативна и секреторна фаза на менструалния цикъл в групата със СПЯ. Това дава основания на авторите да предполагат, че FAAH играе роля в генезата на инсулиновата резистентност при СПЯ (81). В лонгитудинално проучване на същия авторски колектив се установяват по-високи изходни плазмени нива на АЕА при жени със СПЯ, сравнени с жени без СПЯ, но с инфертилитет. В нивата на 2-AG липсва сигнификантна разлика между двете групи. Ефектите, които са наблюдавани след 3-месечно комбинирано лечение с етинил естрадиол 35 мкг и ципротерон ацетат 2 мг в комбинация с метформин при жените със СПЯ, са били редуциране на нивата на АЕА и повишаване нивата на експресия на FAAH в ендометриума (82).

Заклучение

Ролята на ендоканабиноидната система в генезата на затлъстяването е безспорна. Доказателство за това са и наблюдаваните позитивни ефекти на СВ1R антагонист (римонабант) по отношение на редуцията на тегло. Макар някои от проучванията да предполагат връзка между ендоканабиноидите и инсулиновата резистентност в контекста на СПЯ, те не достигат до твърди заключения и налагат провеждането на допълнителни научни изследвания. Допълнителен интерес представлява ролята на ендоканабиноидната система във „фоликуларния арест“ на зреещите фоликули и ановулацията при СПЯ. Ендоканабиноидите се посочват в литературата като новите потенциални биомаркери за инфертилитет (83). За да се установи дали те са ключов фактор за инфертилитета и при СПЯ, от критично значение е провеждането на нови изследвания в областта.

Обзорът е написан по проект № Д-102/23. 04. 2019г. на Медицински университет – София „ГРАНТ-2019“

References

1. Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* 1964;86(8):1646-1647.
2. Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3(9):771-784.
3. Matias I, Di Marzo V. Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol Metab* 2007;18(1):27-37.
4. Richey JM, Woolcott O. Re-visiting the Endocannabinoid System and Its Therapeutic Potential in Obesity and Associated Diseases. *Curr Diab Rep* 2017;17(10):99.
5. Maccarrone M, Wenger T. Effects of cannabinoids on hypothalamic and reproductive function. *Handb Exp Pharmacol* 2005;168:555-571.
6. Pagotto U, Gambineri A, Vicennati V, Pasquali R. Involvement of the Endocannabinoid System in Metabolism and Fertility. In *Insulin Resistance and Polycystic Ovarian Syndrome. Humana Press* 2007:385-396.
7. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992; 258: 1946-1949.
8. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1995;50:83-90.
9. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, et al. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;215(1):89-97.
10. Ben-Shabat S, Frider E, Sheskin T, Tamiri T, Rhee MH, Vogel Z, et al. An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *Eur J Pharmacol* 1998;353(1):23-31.
11. McKinney M, Cravatt B. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu Rev Biochem* 2005;74:411-432.
12. Dinh T, Freund T, Piomelli D. A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation. *Chem Phys Lipids* 2002;121(1-2):149-158.
13. Fezza F, Bari M, Florio R, Talamonti E, Feole M, Maccarrone M. Endocannabinoids, related compounds and their metabolic routes. *Molecules* 2014;19(11):17078-17106.
14. Maccarrone M. Endocannabinoid signaling in female reproductive events: a potential therapeutic target? *Expert Opin Ther Targets* 2015;19(11):1423-7.
15. Bouaboula M, Rinaldi M, Carayon P, Carillon C, Delpech B, Shire D, et al. Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. *Eur J Biochem* 1993;214:173-180.
16. Pertwee R. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Therapeut* 1997;74:129-180.
17. Pertwee R, Ross R. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002;66:101-121.
18. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993;365:61-65.
19. Viscomi MT, Oddi S, Latini L, Pasquariello N, Florenzano F, Bernardi G, et al. Selective CB2 receptor agonism protects central neurons from remote axotomy-induced apoptosis through the PI3K/Akt pathway. *J Neurosci* 2009;29:4564-4570.

20. Sharov AA, Piao Y, Matoba R, Dudekula DB, Qian Y, VanBuren V, et al. Transcriptome analysis of mouse stem cells and early embryos. *PLoS Biol* 2003;1:E74.
21. Helliwell R, Chamley L, Blake-Palmer K, Mitchell M, Wu J, Kearns C, et al. Characterization of the endocannabinoid system in early human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5168–5174.
22. Denny M, Friel A, Houlihan D, Broderick V, Smith T, Morrison J. Cannabinoids and the human uterus during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:2–9.
23. El-Talatini MR, Taylor AH, Elson JC, Brown L, Davidson AC, Konje JC. Localisation and function of the endocannabinoid system in the human ovary. *PLoS One*. 2009;4(2):e4579.
24. Fioramonti J, Bueno L. Role of cannabinoid receptors in the control of gastrointestinal motility and perception. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2008;2:385–397.
25. Mallat A, Lotersztajn S. Endocannabinoids and liver disease. I. Endocannabinoids and their receptors in the liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294(1):G9–G12.
26. Pacher P, Steffens S. The emerging role of the endocannabinoid system in cardiovascular disease. *Semin Immunopathol* 2009;31:63–77.
27. Battista N, Di Tommaso M, Bari M, Maccarrone M. The endocannabinoid system: an overview. *Front Behav Neurosci* 2012;6:9.
28. González S, Manzanera J, Berrendero F, Wenger T, Corchero J, Bisogno T, et al. Identification of endocannabinoids and cannabinoid CB1 receptor mRNA in the pituitary gland. *Neuroendocrinology* 1999;70(2):137–145.
29. Robbe D, Kopf M, Remaury A, Bockaert J, Manzoni OJ. Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99(12):8384–8388.
30. Partosoedarso E, Abrahams T, Scullion R, Moerschbaecher J, Hornby P. Cannabinoid1 receptor in the dorsal vagal complex modulates lower oesophageal sphincter relaxation in ferrets. *J Physiol* 2003;550(1):149–158.
31. Marzo V, Petrocellis L. Plant, synthetic, and endogenous cannabinoids in medicine. *Annu Rev Med* 2006;57:553–574.
32. Hill M, Ho W, Sinopoli K, Viau V, Hillard C, Gorzalka B. Involvement of the endocannabinoid system in the ability of long-term tricyclic antidepressant treatment to suppress stress-induced activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *Neuropsychopharmacology* 2006;31(12):2591–2599.
33. Di Marzo V, Goparaju S, Wang L, Liu J, Bátkai S, Járás Z, et al. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 2001;410:822–825.
34. Verty AN, McGregor IS, Mallet PE, Oldfield BJ. The impact of cannabinoid receptor (CB1) antagonists on the central neural circuitry mediating energy balance. *36th Neuroscience Annual Meeting, Washington, USA, 2006; Poster number 456.3/BB3.*
35. Gamber K, MacArthur H, Westfall T. Cannabinoids augment the release of neuropeptide Y in the rat hypothalamus. *Neuropharmacology* 2005;49(5):646–652.
36. Coutts A, Izzo A. The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids: an update. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4(6):572–579.
37. Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2005;115(5):1298–1305.
38. Matias I, Gonthier M, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, et al. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and β -pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(8):3171–3180.
39. Engeli S, Böhnke J, Feldpausch M, Gorzelnik K, Janke J, Bátkai S, et al. Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes* 2005;54(10):2838–2843.
40. Cota D, Marsicano G, Tschöp M, Grübler Y, Flachskamm C, Schubert M, et al. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 2003;112(3):423–431.
41. Bensaid M, Gary-Bobo M, Esclangon A, Maffrand J, Le Fur G, Oury-Donat F, et al. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol* 2003;63(4):908–914.
42. Roche R, Hoareau L, Bes-Houtmann S, Gonthier M, Laborde C, Baron J, et al. Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. *Histochem Cell Biol* 2006;126(2):177–187.
43. Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev* 2006; 27(1):73–100.
44. Juan-Picó P, Fuentes E, Bermudez-Silva F, Diaz-Molina F, Ripoll C, de Fonseca F, et al. Cannabinoid receptors regulate Ca²⁺ signals and insulin secretion in pancreatic β -cell. *Cell Calcium* 2006; 39(2):155–162.
45. Cota D, Marsicano G, Lutz B, Vicennati V, Stalla G, Pasquali R, et al. Endogenous cannabinoid system as a modulator of food intake. *Int J Obes* 2003;27(3):289–301.
46. Jbilo O, Ravinet-Trillou C, Arnone M, Buisson I, Bribes E, Péleraux A, et al. The CB1 receptor antagonist rimonabant reverses the diet-induced obesity phenotype through the regulation of lipolysis and energy balance. *FASEB J* 2005;19(11):1567–1569.
47. Cote M, Matias I, Lemieux I, Petrosino S, Almeras N, Despres JP, et al. Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. *Int J Obes* 2007;31(4):692–699.
48. Di Marzo V, Cote M, Matias I, Lemieux I, Arsenault B, Cartier A, et al. Changes in plasma endocannabinoid levels in viscerally obese men following a 1 year lifestyle modification programme and waist circumference reduction: associations with changes in metabolic risk factors. *Diabetologia* 2009;52(2):213.
49. Matias I, Petrosino S, Racioppi A, Capasso R, Izzo A, Di Marzo V. Dysregulation of peripheral endocannabinoid levels in hyperglycemia and obesity: effect of high fat diets. *Mol Cell Endocrinol* 2008;286(1–2):S66–S78.
50. Di Marzo V. The endocannabinoid system in obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia* 2008;51(8):1356–1367.
51. Starowicz K, Cristino L, Matias I, Capasso R, Racioppi A, Izzo A, et al. Endocannabinoid dysregulation in the pancreas and adipose tissue of mice fed with a high-fat diet. *Obesity* 2008;16(3):553–565.
52. Kunos G, Osei-Hyiaman D, Liu J, Godlewski G, Bátkai S. Endocannabinoids and the control of energy homeostasis. *J Biol Chem* 2008;283(48):33021–33025.
53. Kunos G, Osei-Hyiaman D, Bátkai S, Sharkey K, Makriyannis A. Should peripheral CB1 cannabinoid receptors be selectively targeted for therapeutic gain? *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30(1):1–7.
54. Di Marzo V, Petrosino S. Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr Opin Lipidol* 2007;18(2):129–140.
55. Van Gaal L, Pi-Sunyer X, Després J, McCarthy C, Scheen A. Efficacy and safety of rimonabant for improvement of multiple cardiometabolic risk factors in overweight/obese patients: pooled 1-year data from the Rimonabant in Obesity (RIO) program. *Diabetes Care* 2008; 31:S229–240.
56. Pi-Sunyer F, Aronne L, Heshmati H, Devin J, Rosenstock J, Group R-NAS. Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006;295(7):761–75.
57. Van Gaal L, Rissanen A, Scheen A, Ziegler O, Rössner S, Group R-ES. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* 2005;365:1389–1397.
58. Scheen A. CB1 receptor blockade and its impact on cardiometabolic risk factors: overview of the RIO programme with rimonabant. *J Neuroendocrinol* 2008;20(S1):139–146.
59. Ducobu J, Stemon J. Rimonabant (Acomplia), specific inhibitor of the endocannabinoid system. *J Pharm Belg* 2005;60(3):89–91.
60. Di Marzo V, Szallasi A. Rimonabant in rats with a metabolic syndrome: good news after the depression. *Br J Pharmacol* 2008;154(5):915–917.
61. Lazzarin N, Valensise H, Bari M, Ubaldi F, Battista N, Finazzi-Agro A, et al. Fluctuations of fatty acid amide hydrolase and anandamide levels during the human ovulatory cycle. *Gynecol Endocrinol* 2004;18:212–218.
62. Taylor A, Ang C, Bell S, Konje J. The role of the endocannabinoid system in gametogenesis, implantation and early pregnancy. *Hum Reprod Update* 2007;13:501–513.

63. El-Talatini M, Taylor A, Konje J. The relationship between plasma levels of the endocannabinoid, anandamide, sex steroids, and gonadotrophins during the menstrual cycle. *Fertil Steril* 2010;93:1989–1996.
64. El-Talatini MR, Taylor AH, Konje JC. Fluctuation in anandamide levels from ovulation to early pregnancy in in-vitro fertilization-embryo transfer women, and its hormonal regulation. *Hum Reprod* 2009;24(8):1989–1998.
65. Peralta L, Agirregoitia E, Mendoza R, Exposito A, Casis L, Matorras R, et al. Expression and localization of cannabinoid receptors in human immature oocytes and unfertilized metaphase-II oocytes. *Reprod BioMed Online* 2011;23:372–379.
66. Di Blasio A, Vignali M, Gentilini D. The endocannabinoid pathway and the female reproductive organs. *J Mol Endocrinol* 2013;50(1):R1-R9.
67. Maccarrone M, Bari M, Battista N, Finazzi-Agro A. Estrogen stimulates arachidonylethanolamide release from human endothelial cells and platelet activation. *Blood* 2002;100:4040–4048.
68. Habayeb O, Taylor A, Evans M, Cooke M, Taylor D, Bell S, et al. Plasma levels of the endocannabinoid anandamide in women - a potential role in pregnancy maintenance and labor? *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5482–5487.
69. Maccarrone M, Valensise H, Bari M, Lazzarin N, Romanini C, Finazzi-Agro A. Relation between decreased anandamide hydrolase concentrations in human lymphocytes and miscarriage. *Lancet* 2000;355:1326–1329.
70. Schuel H, Burkman L, Lippes J, Crickard K, Forester E, Piomelli D, et al. Acylethanolamines in human reproductive fluids. *Chem Phys Lipids* 2002;121:211–227.
71. Azziz R, Carmina E, Chen Z, Dunaif A, Laven J, Legro R, et al. Polycystic ovary syndrome. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2(1):1-18.
72. Pehlivanov B, Orbetzova M. Characteristics of different phenotypes of polycystic ovary syndrome in a Bulgarian population. *Gynecol Endocrinol* 2007;23(10):604-609.
73. Orbetzova M, Kamenov Z, Kolarov G, Orbetzova V, Genchev G, Genov N, et al. Metabolic disturbances in women with polycystic ovary syndrome. *Folia Med* 2003;45(3):12-20.
74. Gateva A, Kamenov Z. Cardiovascular risk factors in Bulgarian patients with polycystic ovary syndrome and/or obesity. *Obstet Gynecol Int* 2012;2012:1-11.
75. Orbetzova M, Pehlivanov B, Mitkov M, Atanassova I, Kamenov Z, Kolarov G, et al. Effect of Short-Term Standard Therapeutic Regimens on Neuropeptide Y and Adipose Tissue Hormones in Overweight Insulinresistant Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Folia Med* 2011;53(3):15-24.
76. Dawson A, Kilpatrick E, Coady A, Elshewehy A, Dakroury Y, Ahmed L, et al. Endocannabinoid receptor blockade reduces alanine aminotransferase in polycystic ovary syndrome independent of weight loss. *BMC Endocr Disord* 2017;17(1):41.
77. Bermudez-Siva F, Serrano A, Diaz-Molina F, Vera I, Juan-Pico P, Nadal A, et al. Activation of cannabinoid CB1 receptors induces glucose intolerance in rats. *Eur J Pharmacol* 2006; 531:282–284.
78. Ahrens K, Mumford S, Schliep K, Kissell K, Neil M, Perkins J, et al. Serum leptin levels and reproductive function during the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 2014;210:248.e1-9.
79. Battista N, Pasquariello N, Di Tommaso M, Maccarrone M. Interplay between endocannabinoids, steroids and cytokines in the control of human reproduction. *J Neuroendocrinol* 2008;20:82–89.
80. Juan C, Chen K, Wang P, Hwang J, Seow K. Endocannabinoid system activation may be associated with insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2015;104(1):200-206.
81. Cui N, Yang Y, Xu Y, Zhang J, Jiang L, Hao G. Decreased expression of fatty acid amide hydrolase in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2017;33(5):368-372.
82. Cui N, Feng X, Zhao Z, Zhang J, Xu Y, Wang L, et al. Restored Plasma Anandamide and Endometrial Expression of Fatty Acid Amide Hydrolase in Women With Polycystic Ovary Syndrome by the Combination Use of Diane-35 and Metformin. *Clin Ther* 2017;39(4):751-758.
83. Rapino C, Battista N, Bari M, Maccarrone M. Endocannabinoids as biomarkers of human reproduction. *Hum Reprod Update* 2014;20(4):501-516.

Address for correspondence:

Д-р Пламена Кабакчиева

гр. София, 1431, бул. „Г. Софийски“ № 1
УМБАЛ „Александровска“
e-mail: plamenakabakchieva@mail.bg

Dr. Plamena Kabakchieva

Sofia, 1431, 1, „G. Sofiyski“ Blvd.
Alexandrovskaya University Hospital
e-mail: plamenakabakchieva@mail.bg

Кардиометаболитен риск при млади възрастни в дълготрайна ремисия на лекувана в детството остра лимфобластна левкемия – пилотно проучване от един център

Белчева, Милена И.¹, Йотова, Виолета М.², Бочева, Яна Д.³, Балеф, Боян Д.⁴, Калева, Валерия И.¹

¹ Клиника по Детска клинична хематология и онкология,

² Първа детска клиника с ДООИЛ,

³ Катедра по Обща медицина и клинична лаборатория,

⁴ Катедра по Образна диагностика и лъчетерапия, Медицински Университет, Варна

Адрес за кореспонденция:

Д-р Милена Белчева

Клиника по Детска хематология и онкология

УМБАЛ „Св. Марина“, Варна, бул. „Хр. Смирненски“ 1, 9010, Варна

Тел: 052 978 285; 0889 684 275

e-mail: milenabeltcheva@yahoo.com

Постъпила 20. 01. 2020

Приета: 08. 04. 2020

Резюме

Цел на настоящото пилотно проучване е оценка на някои променливи фактори на кардиометаболитния риск при преживели в дълготрайна ремисия на успешно лекувана в детството остра лимфобластна левкемия (ОЛЛ).

Пациенти и методи: Оценени са 28 пациенти (ср. възраст 24,8±4,2 г. (18-32 г.) в ремисия средно 13,5±4,2 г. (5-25 г.) и 25 съответстващи по възраст и пол здрави контроли. Проведени са антропометрични, биохимични, хормонални и цялостелесни Dual-energy X-ray Absorptiometry (DEXA) изследвания.

Резултати: Честотата на наднормено тегло/затлъстяване и дислипидемия е значимо по-висока при преживелите в сравнение с контролите (съотв. 53,58% vs 20%, p=0,005 и 60,71% vs 32%, p=0,037). Сред преживелите 57,14% от жените и 15,38% от мъжете са затлъстели с нормално тегло (p=0,023). Преживелите, особено мъжете, имат сигнификантно по-високи мастна маса (FM) (p=0,009), процент (% FM) (p=0,002) и индекс на мастната маса (FMI) (p=0,002) от контролите (за мъжете: p=0,006, p=0,002 и p=0,009, съответно). FM (p=0,039), % FM (p=0,01) и FMI (p=0,048) са по-високи при облъчените с висока доза краниална лъчетерапия (КЛ) в сравнение с лекуваните с по-ниска доза или без КЛ. Преживелите мъже имат сигнификантно по-голяма обиколка на талията (ОТ) в сравнение с контролите (p=0,015) и разпределение на мастната маса по андроиден тип (AG ratio 1,09±0,15 vs 0,94±0,21, p=0,05). Преживелите мъже имат по-често множествени отклонения в липидния профил от лекуваните жени (50% vs 7,14%, p=0,039) и по-високи систолно артериално налягане (САН) и средно АН от жените с ОЛЛ (p=0,004 и p=0,027) и от мъжете-контроли (p=0,021 и p=0,057, съответно).

Заклучение: Наднормено тегло/затлъстяване, повишено количество мастна маса, абдоминален адипозитет и дислипидемия предпоставят риск за последваща кардиометаболитна болест при лекуваните за ОЛЛ и са налице още в ранната им зрялост. Най-засегнати са мъжете и понеслите по-интензивна терапия. Рутинно мониториране на метаболитните отклонения и анализ на телесната композиция чрез DEXA спомагат за ранно идентифициране на индивидите в риск и за ориентиране на превантивните стратегии.

Ключови думи: кардиометаболитен риск, DEXA, дислипидемия, остра лимфобластна левкемия, дълготрайна ремисия

Въведение

В резултат от съвременното успешно лечение, индивидите в дълготрайна ремисия на остра лимфобластна левкемия (ОЛЛ) са най-голямата и увеличаваща се популация сред пациентите, лекувани за злокачествено заболяване в детството. Те обаче представляват група от млади възрастни с реален и прогресивно нарастващ риск за тежка, социално-значима патология. Приложенията в ранна възраст терапевтични въздействия – химиотерапия (ХТ), глюкокортикоиди (ГК), краниална лъчетерапия (КЛ) предизвикват широк спектър от късни ефекти. Здравният риск е свързан най-често с ранно развитие на наднормено тегло (НТ)/затлъстяване, сърдечно-съдови заболявания, метаболитен синдром (1). Ятрогенната увреда създава предпоставки за болестност, която значително превишава тази на здравите им връстници и смъртност, надхвърляща смъртността вследствие рецидиви и вторични неоплазми при преживелите (2).

Цел на настоящото проучване е оценка на някои променливи фактори на кардиометаболитния риск при пилотна група от индивиди в дълготрайна ремисия на успешно лекувана в детството остра лимфобластна левкемия.

Пациенти и методи

Изследваната група включва 28 пациенти (14 мъже и 14 жени) на средна възраст $24,8 \pm 4,2$ г. (18-32 г.) и в ремисия ≥ 5 г. след края на терапия за ОЛЛ. Всички те са диагностицирани и лекувани преди навършване на 18 г. в клиниката по Детска хематология и онкология на УМБАЛ „Света Марина“, Варна между 1989 г. и 2011 г. съобразно актуалните към момента на диагнозата терапевтични протоколи (DFCI 87-01, BFM1998, ALL IC-BFM 2002). Данни за инициалната характеристика на заболяването и информация за проведеното лечение са извлечени от медицинските досиета на участниците. Средната възраст при диагнозата е $8,8 \pm 4,8$ г.; 35,7% от болните са стратифицирани в група на висок риск. Средният период на проследяване след лечение е $13,5 \pm 4,2$ г. (5-25 г.). По-голяма част от пациентите (89,3%) са лекувани с комбинация от ХТ и КЛ, трима (10,7%) – единствено с ХТ. При четирима болни (14,3%) е проведена терапия за рецидив: при трима конвенционална ХТ, при един е приложен трансплантационен режим. Шестнадесет пациенти са лекувани по протокол DFCI (57,1%), дванадесет (42,9%) – по протоколи BFM ($p=0,712$). Средната доза на КЛ е 17,6 Gy (12–24 Gy). Няма значима

разлика между двата пола в честотата на проведената КЛ; с висока доза (24 Gy) са облъчени 9 (64,3%) от участниците-жени и 5 (35,7%) от участниците-мъже ($p=0,141$). Кумулативните дози на ГК, антрациклини и КЛ не се различават сигнификантно при мъжете и жените, лекувани за ОЛЛ (съответно $p=0,223$; $p=0,745$ и $p=0,172$). Сходни са и възрастта при диагнозата ($p=0,738$), и възрастта към момента на изследването ($p=0,561$). Контролната група се състои от братя/сестри на участниците, познати на медицинския персонал, студенти по медицина и лекари, и включва 25 здрави индивиди, съответстващи по възраст и пол.

Протоколът за антропометрия, измерване на артериално налягане (АН) и вземане на кръв на гладно е описан подробно в преходна публикация (3). Изследвани са кръвна глюкоза (КГ), гликиран хемоглобин, общ холестерол, HDL-холестерол (HDL-C), LDL-холестерол (LDL-C), триглицериди (ТГ), аполипопротеин В, С-реактивен протеин (CRP), инсулин и инсулиноподобен растежен фактор-1 (IGF-1). HOMA-IR е калкулиран по формулата: $HOMA-IR = [КГ (mmol/l) \times инсулин (\mu U/ml)] : 22,5$. Информация за актуалното здравословно състояние и текущ прием на медикаменти е събрана чрез въпросник и интервю. Нито един от изследваните не е лекуван с растежен хормон. Изследваната група включва 28 пациенти (14 мъже и 14 жени) на средна възраст $24,8 \pm 4,2$ г. (18-32 г.) и в ремисия ≥ 5 г. след края на терапия за ОЛЛ. Всички те са диагностицирани и лекувани преди навършване на 18 г. в клиниката по Детска хематология и онкология на УМБАЛ „Света Марина“, Варна между 1989 г. и 2011 г. съобразно актуалните към момента на диагнозата терапевтични протоколи (DFCI 87-01, BFM1998, ALL IC-BFM 2002). Данни за инициалната характеристика на заболяването и информация за проведеното лечение са извлечени от медицинските досиета на участниците. Средната възраст при диагнозата е $8,8 \pm 4,8$ г.; 35,7% от болните са стратифицирани в група на висок риск. Средният период на проследяване след лечение е $13,5 \pm 4,2$ г. (5-25 г.). По-голяма част от пациентите (89,3%) са лекувани с комбинация от ХТ и КЛ, трима (10,7%) – единствено с ХТ. При четирима болни (14,3%) е проведена терапия за рецидив: при трима конвенционална ХТ, при един е приложен трансплантационен режим. Шестнадесет пациенти са лекувани по протокол DFCI (57,1%), дванадесет (42,9%) – по протоколи BFM ($p=0,712$). Средната доза на КЛ е 17,6 Gy (12–24 Gy). Няма значима разлика между двата пола в честотата на проведената КЛ; с висока доза (24 Gy) са облъчени 9 (64,3%) от участниците-жени и 5 (35,7%) от участниците-мъже ($p=0,141$). Кумулативните дози на ГК, антрациклини и КЛ не

се различават сигнификантно при мъжете и жените, лекувани за ОЛЛ (съответно $p=0,223$; $p=0,745$ и $p=0,172$). Сходни са и възрастта при диагнозата ($p=0,738$), и възрастта към момента на изследването ($p=0,561$). Контролната група се състои от братя/сестри на участниците, познати на медицинския персонал, студенти по медицина и лекари, и включва 25 здрави индивиди, съответстващи по възраст и пол.

Протоколът за антропометрия, измерване на артериално налягане (АН) и вземане на кръв на гладно е описан подробно в преходна публикация (3). Изследвани са кръвна глюкоза (КГ), гликиран хемоглобин, общ холестерол, HDL-холестерол (HDL-C), LDL-холестерол (LDL-C), триглицериди (ТГ), аполипопротеин В, С-реактивен протеин (CRP), инсулин и инсулиноподобен растежен фактор-1 (IGF-1). HOMA-IR е калкулиран по формулата: $HOMA-IR = [КГ (mmol/l)] \times [инсулин (\mu U/ml)]:22,5$. Информация за актуалното здравословно състояние и текущ прием на медикаменти е събрана чрез въпросник и интервю. Нито един от изследваните не е лекуван с растежен хормон.

При всички участници е проведено цялостно изследване чрез Dual Energy X-ray Absorptiometry (DEXA) – Lunar Prodigy апаратура, в стандартни условия. Използвани са директно отчетените от апарата параметри на мастната маса: Total Body % Fat, Centile, Fat mass (FM) (g), Android % Fat, Gynoid % Fat, Android/Gynoid Ratio (A/G ratio). Използван е генерираният от апарата и стандартизиран по възраст и пол показател за перцентила на мастна маса – USA (Lunar) Total Body Reference Population (v112). Процентът мастна маса (% FM) е изчислен като мастната маса е изразена като процент от сумата на цялостната мастна и мускулна маса, към които е добавено костното минерално съдържание. С цел неутрализиране на ефекта от размера на тялото FM е представена като индекс (kg/m^2): FMI.

Хранителният статус е преценен на базата на класификацията на WHO, като е стратифициран в категориите: поднормено тегло ($BMI < 18,5 kg/m^2$); нормално тегло ($BMI 18,5-24,99 kg/m^2$); наднормено тегло ($BMI 25-29,99 kg/m^2$); затлъстяване I ст. ($BMI 30-34,99 kg/m^2$); затлъстяване II ст. ($BMI 35-39,99 kg/m^2$); затлъстяване III ст. ($BMI > 40 kg/m^2$). Нутритивният статус е преценен допълнително и на базата на FMI според класификацията, предложена от Kelly et al. (4). Отделните категории са сведени до дефицит на мастна маса (Fat deficit) ($FMI < 3 kg/m^2$ за мъже и $FMI < 5 kg/m^2$ за жени), нормален индекс на мастна маса (normal FMI) ($FMI 3-6 kg/m^2$ за мъже и $FMI 5-9 kg/m^2$ за жени), наднормена мастна маса (Excess Fat) ($FMI > 6-9 kg/m^2$ за мъже и $FMI > 9-13 kg/m^2$ за жени),

затлъстяване I ст. ($FMI > 9-12 kg/m^2$ за мъже и $FMI > 13-17 kg/m^2$ за жени), затлъстяване II ст. ($FMI > 12-15 kg/m^2$ за мъже и $FMI > 17-21 kg/m^2$ за жени) и затлъстяване III ст. ($FMI > 15 kg/m^2$ за мъже и $FMI > 21 kg/m^2$ за жени).

Въз основа на BMI и процента мастна маса (% FM) са идентифицирани индивидите, представящи се със затлъстяване при нормално тегло (Normal Weight Obesity, NWO). NWO е дефинирано като $BMI \leq 24,9 kg/m^2$ и % FM над 20% при мъже и над 30 % при жени, както е прилагано от други изследователи (5).

Предвид младата възраст на участниците, артериална хипертония (АХ) е дефинирана при стойности на систолно артериално налягане (САН) $\geq 130 mmHg$ и/или диастолно артериално налягане (ДАН) $\geq 85 mmHg$, използвани в критериите на Международна Диабетна Федерация (IDF) за метаболичен синдром, или прием на антихипертензивни медикаменти (6). По същата причина като гранични са прецизирани стойности на липидите, използвани от IDF. Дислипидемия е дефинирана като наличие на поне един абнормен от следните 3 показателя на стандартния липиден панел: нисък HDL-C ($< 1,03/1,29 mmol/l$), високи ТГ ($\geq 1,7 mmol/l$), висок LDL-C ($\geq 3,36 mmol/l$), или назначена медикаментозна терапия по повод нарушен липиден метаболизъм. При преценка на общия холестерол и LDL-C като фактори на метаболитния риск са приложени cut-off стойности от съответно $5,17 mmol/l$ ($200 mg/dl$) и $3,36 mmol/l$ ($130 mg/dl$) (7). Като косвен показател за повишена атерогенна фракция на LDL-C – тип В, е използвано съотношението ТГ (mg/dl)/HDL-C (mg/dl) $\geq 3,8$ (8).

Статистическата обработка е извършена с помощта на статистически пакет SPSS for Windows, ver. 20.0. Приложени са: дескриптивен анализ за представяне на данните; t-критерий на Стюдънт и дисперсионен анализ (ANOVA) за сравняване на средни стойности и относителни дялове при нормално разпределение на извадките, както и непараметричен критерий – U-критерий на Mann-Whitney при различно от нормалното разпределение на количествените данни; корелационен анализ (r-коефициент на Пийърсън, Кендал τ -b коефициент). За статистически достоверни са приемани разлики, при които $p < 0,05$.

Резултати

Наднормено тегло/затлъстяване и повишено количество на мастната маса

Средните стойности на телесната маса са сходни за цялата група на преживелите и контролната група ($p=0,23$), но теглото на преживелите мъже е по-високо от това на мъжете-

контроли ($p=0,051$). Ръстът на пациентите е значимо по-нисък ($p=0,004$) за сметка на по-нисък ръст при лекуваните жени. При сравнение със съответните контроли, BMI, BMISDS, Обиколката на талията (OT) и Z-score на OT са сигнификантно по-високи при преживелите мъже, но не и при жените с ОЛЛ (Табл. 1). При всички преживели ($25,74\pm 6,08$ kg/m²) и особено при преживелите мъже BMI е в границите на НТ.

Пациентите с проведена краниална лъчелерапия (КЛ) имат по-висок BMI ($25,67\pm 5,66$ kg/m²) от този на лекуваните единствено с ХТ ($22,16\pm 3,89$ kg/m²), ($p=0,03$). При облъчените с висока доза (24 Gy) BMI ($26,35\pm 6,09$ kg/m² vs $24,03\pm 5,05$ kg/m², $p=0,177$), SDSBMI ($0,69\pm 1,22$ vs $0,58\pm 0,94$, $p=0,73$) и OT ($87,03\pm 17,68$ cm vs $80,12\pm 12,24$ cm, $p=0,126$) са по-високи в сравнение с лекуваните с по-малка доза или без КЛ.

Хранителният статус на участниците, оценен чрез BMI и FMI, е представен на *Фигура 1* и *Фигура 2*. В контролната група процентът на индивиди с нормално тегло е двойно по-висок в сравнение с преживелите ОЛЛ. Разликата в относителния дял на индивидите с НТ/затлъстяване между двете групи е сигнификантна ($p=0,005$). Анализът чрез FMI показва сходен процент на изследвани с наднормено количество мастна маса сред преживелите ОЛЛ, но при увеличен дял на индивидите в категориите на лекото и средно тежкото затлъстяване. В групата на контролите е по-висок дялът участници в категорията „дефицит“ за сметка на нормално тегло, оценено чрез BMI.

Едновременното отчитане на BMI и % FM установява normal weight obesity (NWO) при 37,04% от лекуваните и при 28% от контролите ($p=0,49$). Този фенотип доминира сигнификантно сред преживелите жени (57,14% срещу 15,38% при мъжете, $p=0,023$) и е по-чест в сравнение с жените-контроли (57,14% vs 33,33%, $p=0,29$). При това, половината от лекуваните за ОЛЛ жени с NWO се представят с BMI < 18,5 kg/m².

Абсолютното количество мастна маса ($22,85\pm 10,61$ kg vs $16,99\pm 10,04$ kg, $p=0,009$), % FM ($35,92\pm 8,9\%$ vs $25,80\pm 12,26\%$, $p=0,002$), FMI ($8,90\pm 3,58$ kg/m² vs $5,75\pm 3,31$ kg/m², $p=0,002$) и перцентилът на мастната маса ($86,83\pm 22,4$ vs $59,84\pm 35,63$, $p=0,003$) са значимо по-високи за цялата група на преживелите ОЛЛ в сравнение с контролите, като разликата е особено подчертана при мъжете. Лекуваните за ОЛЛ мъже имат двойно по-голямо количество мастна маса ($p=0,006$), % FM ($p=0,002$) и FMI ($p=0,009$) от връстниците си. Макар и по-високи, параметрите на мастната маса при жените с ОЛЛ не се отличават съществено от тези на контролите (*Фиг. 3*).

Процентът мастна маса в андроидния и в гино-

идния компартименти е сигнификантно по-висок при преживелите мъже в сравнение с контролите-мъже (респективно $41,29\pm 10,05\%$ vs $24,87\pm 14,81\%$, $p=0,006$ и $37,49\pm 8,19\%$ vs $24,89\pm 11,09\%$, $p=0,003$), като превалира андроиден тип на натрупване на мастната маса (A/G ratio $1,09\pm 0,15$ vs $0,94\pm 0,21$, $p=0,05$). При общо по-висок % FM в андроидния и в гиноидния компартименти, при преживелите ОЛЛ жени разпределението остава пропорционално.

Пациентите с ОЛЛ, облъчени с 24 Gy, имат значително по-високи % FM ($40,2\pm 7,26\%$ vs $32,88\pm 9,12\%$, $p=0,01$), абсолютно количество на мастна маса ($27,5\pm 9,98$ kg vs $21,02\pm 9,31$ kg, $p=0,039$) и FMI ($10,0\pm 3,52$ kg/m² vs $7,78\pm 3,36$ kg/m², $p=0,048$) в сравнение с лекуваните само с ХТ или получените КЛ в по-ниска доза. При тях процентното разпределение на мастна маса в гиноидния ($46,42\pm 7,35\%$ vs $40,1\pm 8,77\%$, $p=0,022$) и в андроидния ($44,72\pm 7,73\%$ vs $37,19\pm 11,16\%$, $p=0,027$) компартименти са по-високи, но при сходно A/G ratio. OT при преживелите ОЛЛ корелира положително и сигнификантно с A/G ratio ($r=0,802$, $p<0,001$) и BMI ($r=0,962$, $p<0,001$). Пропорционалната зависимост между OT и A/G ratio остава значима ($r=0,602$, $p=0,001$) и при контролиране за BMI.

Дислипидемия

С изключение на сигнификантно по-нисък HDL-C ($p=0,004$), лекуваните за ОЛЛ имат сходни серумни нива на липиди в сравнение с контролната група. Средните стойности на HDL-C са значимо по-ниски и в групите на преживелите мъже ($p=0,035$) и жени ($p=0,021$) в сравнение със здравите им връстници. Мъжете с ОЛЛ имат и повишени стойности на Аполипопротеин В ($102,66\pm 27,0$ mg/dl vs $84,29\pm 23,21$ mg/dl, $p=0,07$).

Относителната честота на отклоненията в липидния панел при участниците е представена на *Фигура 4*.

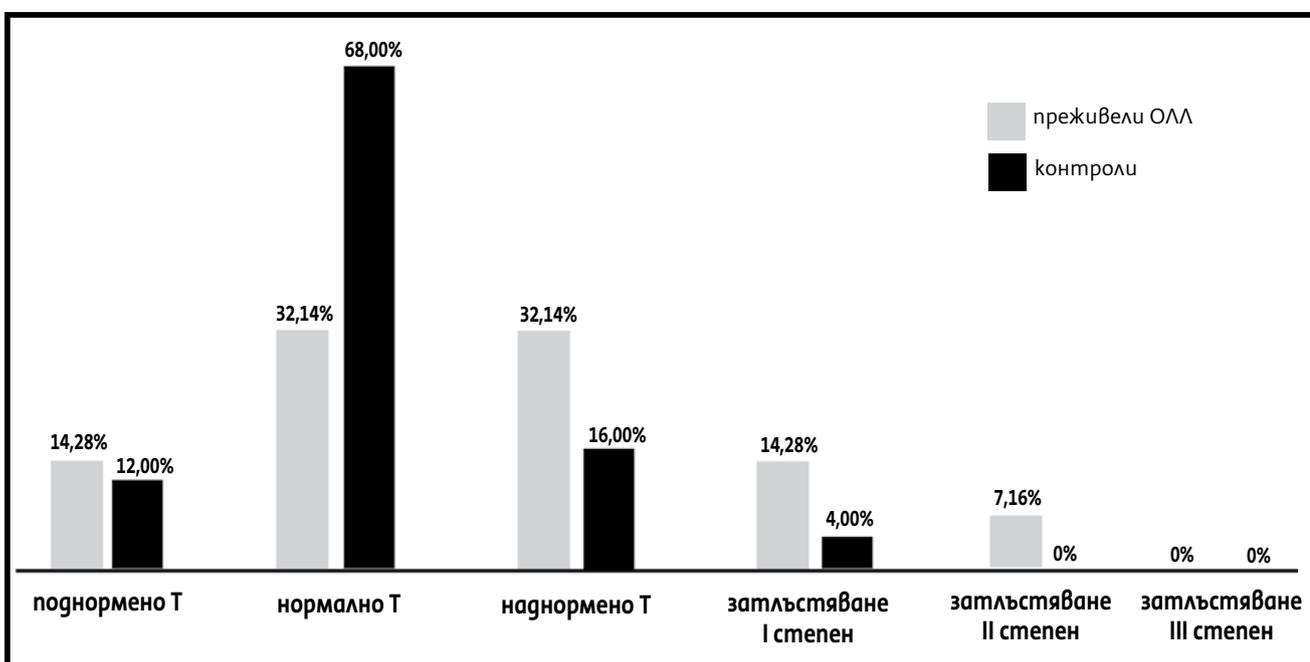
Дислипидемия е налице при 17/28 (60,71%) от преживелите ОЛЛ срещу 8/25 (32%) от контролите ($p=0,037$). Дислипидемията е по-честа при мъжете с ОЛЛ (71,42% vs 38,46%, $p=0,035$), но не и при жените (50% vs 25%, $p=0,41$) при съпоставка със съответните контроли. Множествени отклонения в параметрите на липидния панел са двойно по-чести при пациентите в сравнение с контролите (25% vs 12%, $p=0,14$) и превалират при преживелите мъже спрямо преживелите жени (50% vs 7,14%, $p=0,039$). Съотношение TG/HDL-C $\geq 3,8$ имат 21,4% от преживелите срещу 8% от контролите ($p=0,17$).

При лекуваните с КЛ показателите на липидния панел са по-високи, но не се различават значимо от тези на лекуваните без облъчване. Честотата на дислипидемия (1 или повече параметри)

Таблица 1. Антропометрични показатели при преживелите ОЛЛ в сравнение с контроли

	Преживели мъже (n=14)	Контроли мъже (n=13)	p	Преживели жени (n=14)	Контроли жени (n=12)	p
Тегло (kg)	88,01 (20,3)	74,7 (12,1)	0,051	57,9 (13,9)	58,3 (10,4)	0,95
Ръст (cm)	173,8 (8,0)	177,9 (7,3)	0,170	160,2 (4,9)	165,9 (5,1)	0,008
BMI (kg/m ²)	28,9 (5,2)	23,6 (3,3)	0,004	22,5 (5,2)	21,1 (3,2)	0,40
SDSBMI	0,50 (1,03)	-0,50 (0,69)	0,007	0,15 (1,19)	-0,18 (0,73)	0,40
OT (cm)	95,5 (14,8)	83,1 (8,9)	0,015	74,1 (11,0)	72,5 (10,6)	0,71
OT)Z-score)	0,42 (1,08)	-0,42 (0,73)	0,027	0,07 (1,03)	-0,08 (0,99)	0,71

* Показателите са представени като средна стойност (SD)



Фигура 1. Разпределение на участниците според нутритивния статус, оценен чрез BMI

в тези случаи е също съпоставима.

Показатели на глюкозната хомеостаза и възпалителната активност

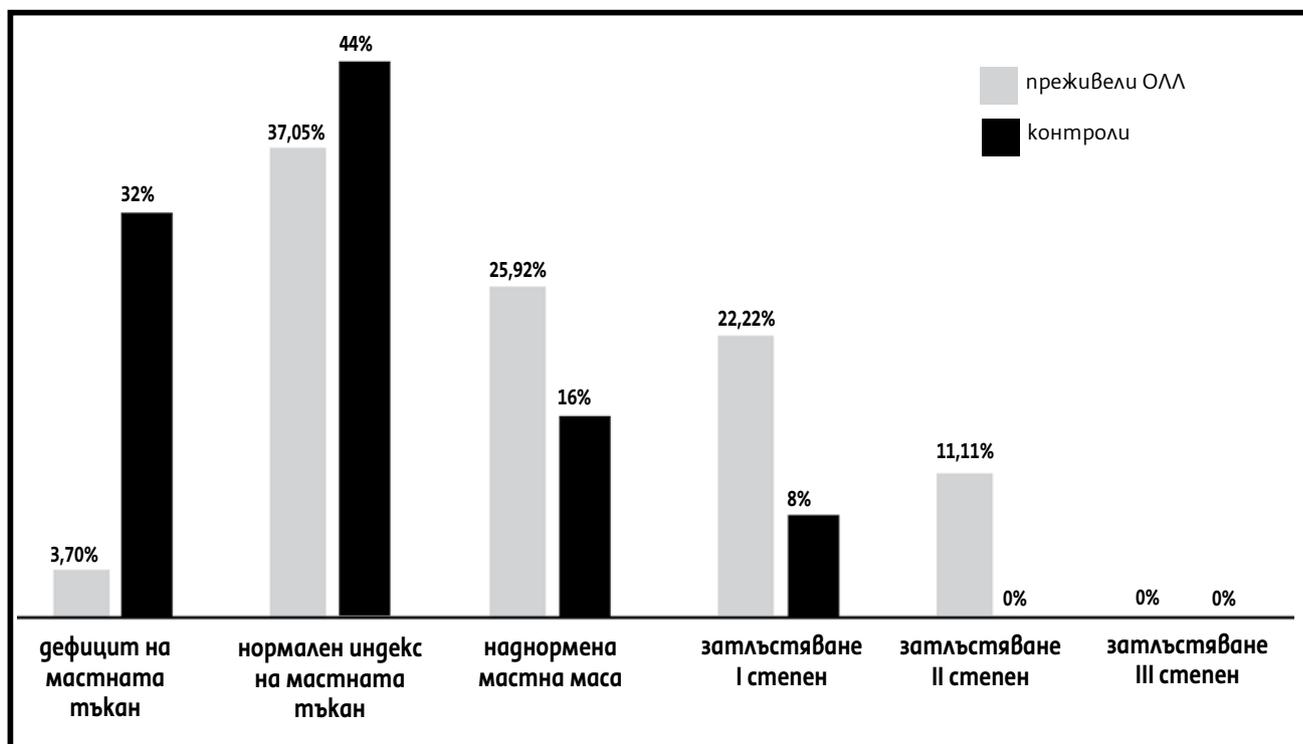
Показателите на глюкозния метаболизъм не се различават между преживелите и контролите, както и при анализ в зависимост от пола. Един пациент провежда инсулинолечение заетрогенен захарен диабет. Нивата на CRP също не показват значими различия между групите, макар че с възпалителна активност (CRP ≥ 3 mg/l) се представят 17,9% от пациентите срещу 8% от контролите (p=0,29).

Повишено артериално налягане

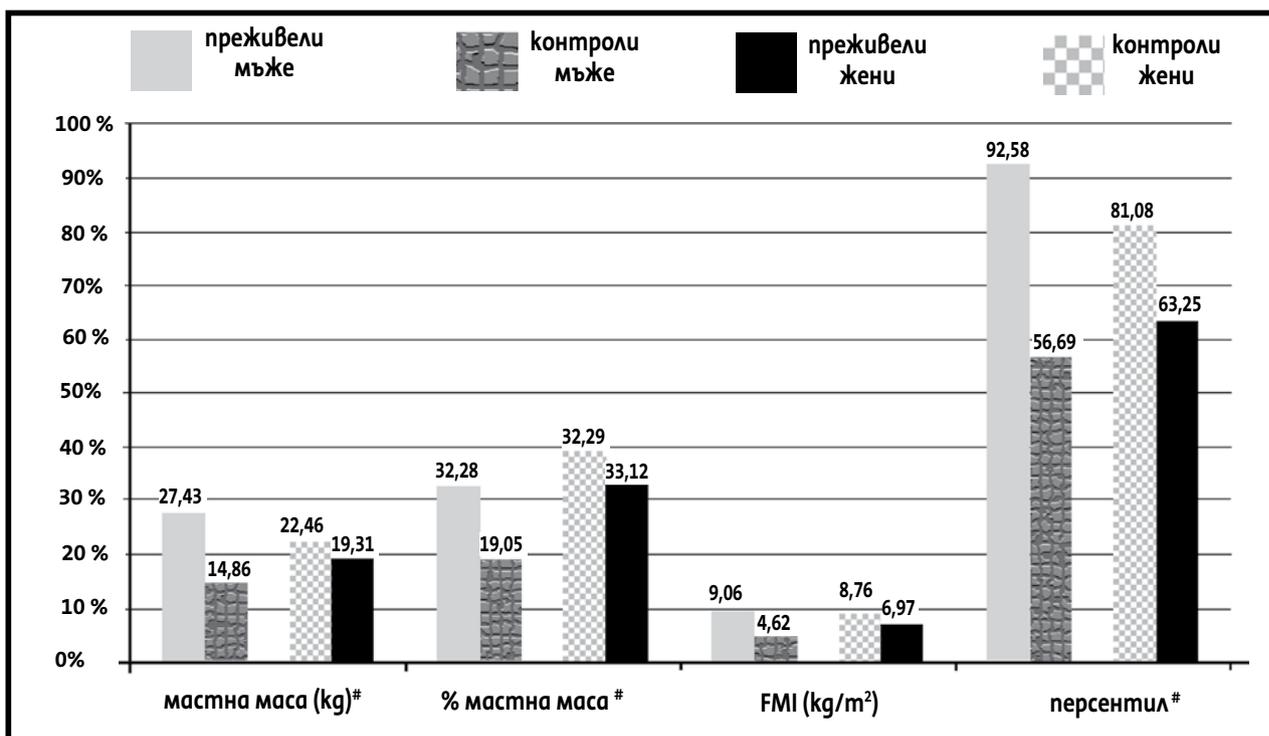
Трима от преживелите ОЛЛ (10,7%), всички-

те мъже (21,4% от мъжете в серията) имат повишено САН/ДАН. Средното АН при пациентите е по-високо, като разликата с контролите е сигнификантна (p=0,05). Лекуваните за ОЛЛ мъже имат значимо по-високи стойности на САН (p=0,004) и средно АН (p=0,027) в сравнение с лекуваните жени. Мъжете с ОЛЛ имат сигнификантно по-високи стойности на САН в сравнение с мъжете-контроли (119,0 \pm 8,5 mmHg vs 111,9 \pm 6,1 mmHg, p=0,021) и повишено средно АН (89,9 \pm 10,9 mmHg vs 83,4 \pm 4,9 mmHg, p=0,057).

Съпоставката на жените с ОЛЛ и жените-контроли не показва съществена разлика в показателите на АН.

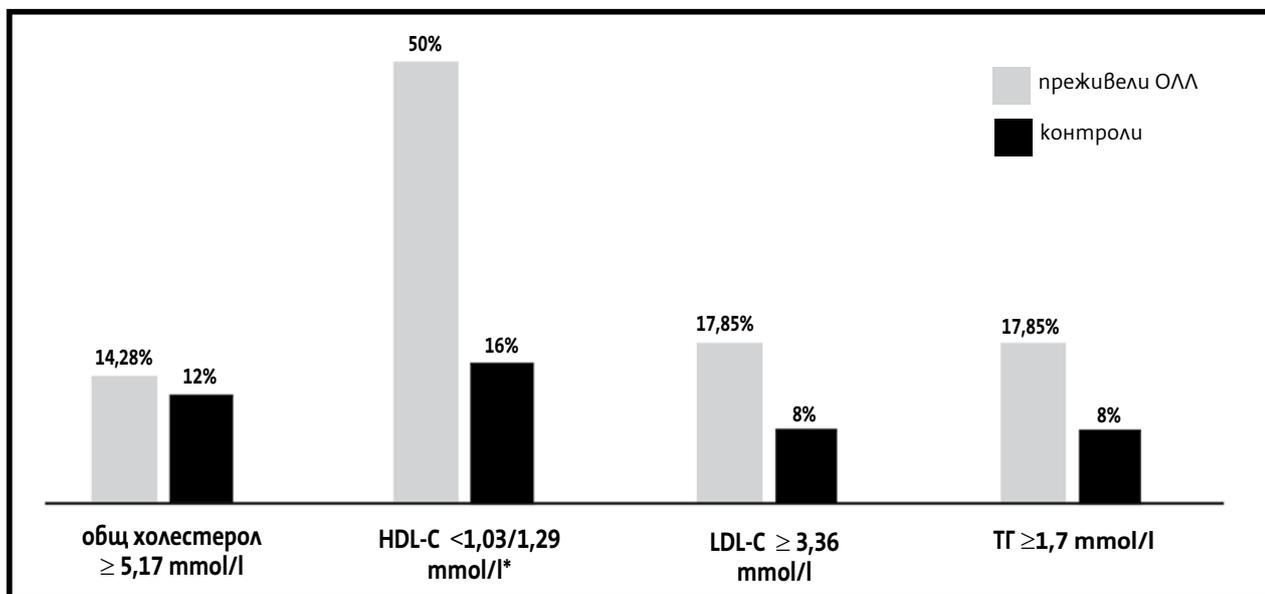


Фигура 2. Разпределение на участниците според нутритивния статус, оценен чрез FMI



[#] Сигнификантна разлика между преживели мъже и контроли мъже (p < 0,01)

Фигура 3. Сравнение на показателите на мастната маса (DEXA) при преживели ОЛЛ мъже и жени в сравнение със съответните контроли



* - Сигнификантна разлика с контролната група ($p=0,007$)

Фигура 4. Дизайн на проучването.

Обсъждане

Анализът на нашата серия установява очаквано по-висок процент НТ и затлъстяване при преживелите ОЛЛ в сравнение със здравите им връстници. На сходна възраст, затлъстяване имат 17% от преживелите ОЛЛ в серията на Garmey et al., като процентът нараства до 31,7% около 32^{-та} година на участниците (9). В по-ранно изследване честотата на затлъстяване е 31,3% в началото на третата декада от живота на участниците и достига 42,8% около 30-та им година (7). Други автори докладват НТ/затлъстяване с по-ниска честота. В съвременна серия от 75 юноши и млади възрастни (ср. възраст 21,2 г.), лекувани според актуален DFCI протокол, НТ се среща в 30%, а неморбидно затлъстяване – само в 8% (10). Belle et al. не откриват разлика в честотата на НТ/затлъстяване след лечение за ОЛЛ в сравнение с общата швейцарска популация (11). Възможно е влияние на генетични фактори, но и на различните диети и физическа активност в региони с културални различия.

За разлика от по-честите заключения в литературата за отклонения при жени, в нашата серия НТ и затлъстяване преобладават при мъжкия пол. Независимо от преобладаващия дял жени сред облъчените с доза 24 Gy, ние не откриваме описаната от Oeffinger et al. висока честота на обезитет и повишен кардиоваскуларен риск при жените след висока доза КЛ (12). Това вероятно

е резултат от по-голямата възраст при облъчването на нашите пациенти. При липса на съществена разлика между преживелите от мъжки и от женски пол по отношение на възраст при диагнозата, терапевтични въздействия и фамилна обремененост със затлъстяване, мъжете в серията имат среден BMI в стойности, граничещи със затлъстяване и манифестно увеличено количество мастна маса в сравнение с отклоненията, установени при лекуваните жени. Подобни са наблюденията в някои по-нови изследвания (13). Резултатите от скорошен анализ на сравнително голяма серия от един център в Полша показват сигнификантно по-висока честота на НТ/затлъстяване при мъжете, след лечение за ОЛЛ и лимфоми. (14). Високата честота на НТ/затлъстяване при преживелите ОЛЛ мъже не може да бъде обяснена изцяло с проведеното лечение. Възможен аргумент е обсъжданата от някои автори повишена чувствителност на мъжкия пол спрямо глюкокортикоидна терапия.

Затлъстяването само по себе си предопределя риск за сърдечно-съдова заболяемост, но метаболитната дисрегулация е свързана най-вече централен (висцерален) обезитет (15,16), каквито са и нашите резултати. Подобни са наблюденията на Miller et al. за кохорта от 170 лекувани в детството пациенти със злокачествени заболявания. На сходна възраст и при сходна продължителност на проследяването, мъжете в тази група имат по-високи % FM и мастна маса на тор-

са ($p=0,007$ и $p=0,008$, респективно), както и общ холестерол, LDL-C и ТГ в сравнение с контролите (17). Отново мъжете, лекувани в детството за ОЛЛ и подложени на КЛ, се представят с по-голямо количество висцерална мастна маса и с абнормален липиден профил в сравнение с тези без КЛ и в студиата на Jarfeld et al. (13). При мъжете в нашата серия ОТ корелира силно и сигнификантно с A/G ratio и с BMI, подобно на наблюдаваното в общата популация. За разлика от тях, голяма част от лекуваните жени (57,14%) с повишено количество мастна маса и реален риск за сърдечно-съдова заболяемост, остават „скрити“ зад нормален, дори нисък BMI. Изследването на телесната композиция при тях установява и понижена мускулна маса, което в перспектива може да влоши глюкозния толеранс и да увеличи допълнително метаболитния риск. Броят на преживелите в нашата серия до момента е твърде малък, за да се анализира честотата на дислипидемия и абдоминално затлъстяване при индивидите с NWO, но рискът за метаболитен синдром в тези случаи е около 4 пъти по-висок в сравнение с индивиди с нормален % FM и нормално тегло, особено при жените (5).

Поради високия риск от хронична патология при преживелите ОЛЛ, неправилна оценка на НТ и затлъстяването може да осуети адекватни медицински съвети предвид настоящите и бъдещи здравни рискове, както и интервенции, касаещи диетата и физическата активност. Директното измерване на мастната маса дава по-ясна представа за метаболитния риск и може по-точно да направлява превантивните стратегии. Все още обаче няма консенсус относно точните граници на здравословното количество мастна маса в организма, над които се отчита излишък на мазнини. Предложени са съобразени с възраст и пол граници, като арбитражните стойности варират между 20-25% FM за мъжете и 30-37% FM за жените (18). Самите те обаче, при популационните изследвания са изработени на база BMI, което не е добра отправна точка. Различията в честотата на затлъстяване, определено чрез BMI и чрез %FM при DEXA са в твърде широк диапазон както при общопопулационни (19), така и при проучвания, касаещи преживелите ОЛЛ (20). FMI се оказва по-удачен за прецизиране на количеството мастна маса и може да прекласифицира пациентите в субкатегориите на затлъстяване, включително в нашето изследване.

Следва да се има предвид обаче, че при изразяване на мастната маса като индекс, влияние оказва и потенциална индуцирана от терапията промяна в ръста, каквато отбелязваме при жените в серията ни. Всичко това очертава трудностите при точната преценка на нутритивния

статус, особено при някои групи сред тази специфична популация. Определянето на подходящи методи, точни критерии и валидираны референтни стойности все още е обект на изследвания.

Убедени сме, че DEXA има негвусмислени предимства пред BMI както при комплексната оценка на метаболитния риск, така и за индивидуализиране на подхода към неговото снижаване при преживелите ОЛЛ. Възможността за телесно и регионално отчитане на адипозитета в съчетание с директно измерване на мускулната маса придава нови функционални измерения на този риск. Изследванията на телесната композиция сред лекуваните за малигнена хемопатия в детството очертават при тях тенденция за саркопенично затлъстяване още от ранната им зрялост (21). Този фенотип съчетава метаболитните ефекти на намалената мускулна маса (по-изразени при млади възрастни, отколкото в старостта) с ефекта на метаболитната дисфункция при затлъстяване в контекста на понесената терапия. В някои проучвания ниска мускулна маса в съчетание с повишена мастна маса се оказва по-тясно свързана с инсулинова резистентност, отколкото затлъстяването само по себе си (22, 23). Следователно при индивидите в дълготрайна ремисия е налице не само адитивен, но и синергичен ефект на висцералния адипозитет и на намалената мускулна маса върху метаболитната хомеостаза, инсулиновата резистентност и в крайна сметка върху сърдечно-съдовата патология. Индивидуалната характеристика на телесната композиция, получена на база на DEXA, има и предимството за по-прецизно ориентиране на интервенциите, насочени към редукция на мастната маса и/или увеличение на мускулатурата и мускулната сила (24).

В литературата съществуват описания на подобен на установения в нашата серия фенотип на атерогенна дислипидемия. Детайлен анализ на показателите на липидния панел сред 80 индивиди с ОЛЛ (25), открива дислипидемия при 50% от изследваните, независимо от възрастта и пола. При това, възрастовата характеристика, периодът на проследяване и BMI на преживелите са много сходни с параметрите в настоящата серия, а дефиницията за дислипидемия и използваните cut-off стойности са идентични.

Настоящото изследване установява по-високи фактори за сърдечно-съдов риск сред преживелите ОЛЛ в сравнение със здравите им връстници, особено сред мъжете. Артериална хипертония и нарушения в глюкозната хомеостаза/захарен диабет са относително по-редки. Най-вероятна причина е малкият брой участници в нашата серия и относително мла-

дата им възраст. В голяма германска кохорта от 951 индивиди, оценени на средна възраст 34 г. и средно 28,4 г. след диагнозата, Faber et al. установяват при преживелите релативен риск за АХ от 1,38, а за дислипидемия – 1,26 (26). Дислипидемията и АХ са значително по-чести и в тази серия при преживелите мъже в сравнение с лекуваните жени, като настъпват съответно 6 и 8 г. по-рано, отколкото в общата популация. Очевидна е необходимостта от ранна, регулярна и внимателна оценка на липидния профил, параметрите на глюкозната хомеостаза, САН и ДАН и своевременна терапевтична намеса при лекуваните за малигнена хемопатия, особено при мъжете. Докато в общата популация основен фактор за кардиометаболитен риск е затлъстяването, при пациентите с малигнена хемопатия терапевтичната експозиция сама по себе си обуславя дисфункция на мастната тъкан, независимо от общото ѝ количество. В подкрепа на това са резултатите на Giordani et al., които обективизират средно 28 мес. след края на терапията ендотелна дисфункция, която персистира във времето и не се влияе от интензивността на лечението (27). Интересен пример са лекуваните с трансплантационни режими, включващи целотелесно облъчване, които развиват неблагоприятен метаболически профил, но нямат НТ/

затлъстяване. Те се представят с променен фенотип на телесна композиция – намалена мускулна маса и повишен висцерален адипозитет, но без увеличена ОТ и проявяват възпалителна активност с повишени CRP и лептин при нисък адипонектин (28).

В заключение, НТ/затлъстяване, абдоминален адипозитет и дислипидемия са най-честите фактори на кардиометаболитния риск при лекуваните за ОЛЛ и са налице още в ранната им зрялост. Особено засегнати са мъжете и лекуваните според по-ранни протоколи, а следователно и с по-интензивна терапия, включително КЛ. Продължителната експозиция може само да задълбочи промените и да увеличи дългосрочния метаболически и сърдечно-съдов риск. Рутинното мониториране на липидната обмяна и агресивен контрол на метаболическите отклонения са задължителни при пациентите в дълготрайна ремисия. По-широкото използване на DEXA за измерване на мастната маса и за анализ на телесната композиция при тази рискова млада популация има безспорни предимства за идентифициране на застрашените индивиди и за индивидуализиране на терапевтичните стратегии. Нейното все по-широко клинично приложение в бъдеще е неотменимо.

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

Cardiometabolic Risk in Young Adult Survivors of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia – A Single-Center Pilot Study

Belcheva, Milena I.¹, Iotova, Violeta M.², Bocheva, Yana D.³, Balev, Boyan D.⁴, Kaleva, Valeria I.¹

¹ Clinic of Pediatric Hematology and Oncology; ² First Pediatric Clinic with DOIL;

³ Department of General Medicine and Clinical Laboratory;

⁴ Department of Imaging and Radiotherapy, Varna Medical University

Address for correspondence:

Milena Belcheva, MD

Clinic of Pediatric Hematology and Oncology

University Hospital „St Marina“ 1, Hr. Smirnenki, Blvd,

9010 Varna Bulgaria

e-mail: milenabeltcheva@yahoo.com

Received: 20. 01. 2020.

Accepted: 08. 04. 2020

Abstract

The aim of this study was to assess some of the modifiable factors of cardiometabolic risk in long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL).

Patients and methods: We compared 28 long-term survivors, aged 18-32 (mean age 24,8±4,2 years), mean follow-up 13,5±4,2 years (5 – 25 years) to 25 age- and sex-matched healthy controls. We performed anthropometric, biochemical, hormonal, and total body Dual-energy X-ray Absorptiometry (DEXA) examinations.

Results: Overweight/obesity and dyslipidemia were more frequent among ALL survivors compared to healthy controls (53,58% vs 20%, p=0,005, and 60,71% vs 32%, p=0,037, respectively). Among former patients, 57,14% of women and 15, 38% of men had normal weight obesity (NWO) (p=0,023). Survivors, especially men, also had a higher fat mass (FM) (p=0,009), percent of FM (% FM) (p=0,002), and FMI (p=0,002) than controls (for men: p=0,006, p=0,002 and p=0,009, respectively). Patients with high-dose cranial radiotherapy (CR) had higher FM (0,039), % FM (0,01) and FMI (0,048) than those treated with low-dose or without CR. Male survivors had significantly higher waist circumference (p=0,015) and AG ratio (p=0,05) than male controls. Multiple lipid abnormalities were more frequent among male survivors compared to female survivors (50% vs 7,14%, p=0,039). Male survivors also had higher systolic BP and mean BP than female survivors (p=0,004 and p=0,027) and male controls (p=0,021 and p=0,057, respectively).

Conclusion: Overweight /obesity, excess body fat, abdominal adiposity and dyslipidemia outline the risk of cardiometabolic disease in young adult survivors of childhood ALL, especially in men and in patients with intensive therapy. Routine monitoring of metabolic abnormalities and body composition analysis through DEXA can help identify those in risk early and help orient the preventive strategies.

Key words: cardiometabolic disease, DEXA, dyslipidemia, acute lymphoblastic leukemia, long-term remission

Introduction

As a result of successful contemporary treatment, survivors of acute lymphoblastic leukemia (ALL) are the largest and continuously growing group of patients treated for childhood malignancies. Nevertheless, these

young adults run a real and progressively growing risk of a severe, socially significant pathology. Carried out at an early age, treatments such as chemotherapy (CT), glucocorticoids, and cranial radiotherapy (CRT) produce a wide range of late effects. Among the most common health risks are an early onset of overweight/

obesity, cardiovascular disease, and metabolic syndrome (MS) (1). Iatrogenic impairment in survivors is conducive to morbidity levels much higher than those of healthy peers as well as to mortality levels exceeding those caused by recurrence and second neoplasms (2).

This study seeks to evaluate the cardiometabolic risk variables of a pilot group of survivors in long-term remission of successfully-treated childhood acute lymphoblastic leukemia.

Patients and Methods

The study sample comprises 28 patients (14 men and 14 women) between 18 and 32 years of age (mean age $24,8 \pm 4,2$ years) who were in remission for ≥ 5 years following the completion of treatment. All of them were diagnosed and treated in accordance with current (at the time of diagnosis) therapeutic ALL protocols (Dana Farber Cancer Institute (DFCI) ALL Consortium protocol 87-01, BFM 1998, ALL IC-BFM 2002) before they turned 18 years of age at the Clinic of Pediatric Hematology and Oncology between 1989 and 2011. Data about initial disease characteristics and applied treatment were extracted from patients' medical files. The average age at diagnosis was $8,8 \pm 4,8$ years. 35,7% of all patients were classified as high-risk. The mean follow-up period after treatment completion was $13,5 \pm 4,2$ years (5-25 years). The majority of patients (89,3%) received a combination of CT and CRT, while the remaining three patients (10,7%) only received CT. Four patients (14,3%) were treated for relapse: three of them with conventional CT and one with a myeloablative CT followed by a hematopoietic stem cell transplantation. Sixteen patients were treated according to the DFCI protocol (57,1%) and 12 (42,9%) – according to the BFM protocols ($p=0,712$). The mean dose of CRT was 17,6 Gy (12-24 Gy). The proportion of patients who received CRT does not differ by sex; 9 (64,3%) female participants and 5 (35,7%) male participants were irradiated with 24 Gy ($p=0,141$). The cumulative doses of glucocorticoids, anthracyclines, and CRT did not significantly differ between male and female ALL survivors ($p=0,223$, $p=0,745$, and $p=0,172$, respectively); nor did the age at diagnosis ($p=0,738$) and the age at evaluation ($p=0,561$). The control group, which included 25 age- and sex-matched healthy individuals, was comprised of survivors' siblings, medical students, physicians, and acquaintances of the medical staff.

An earlier publication describes the protocol for anthropometry and arterial pressure (AP) measurement in detail (3). After the participants spent 12 hours fasting overnight, we collected blood samples for biochemical and hormonal tests – blood glucose (BG), glycated hemoglobin, total cholesterol, HDL-cholesterol (HDL-C), LDL-cholesterol (LDL-C), triglycerides (TG), apolipoprotein B, C-reactive protein (CRP), insulin and insulin growth factor-1 (IGF-1). We calculated HOMA-IR by

the formula: $\text{HOMA-IR} = [\text{BG (mmol/l)} \times \text{insulin } (\mu\text{U/ml})] : 22,5$. We fielded a questionnaire and carried out interviews to collect data about the health and medication intake of the participants. None of the survivors had growth hormone replacement therapy.

All participants received a whole-body evaluation using Dual Energy X-ray Absorptiometry (DEXA) – Lunar Prodigy. We used the fat mass parameters calculated by the device: Total Body % Fat, Fat mass (FM) (g), Android % Fat, Gynoid % Fat, Android/Gynoid Ratio (A/G ratio), and the device-generated age- and sex-standardized Fat Mass Centile – the USA (Lunar) Total Body Reference Population (v112). The Total Body % Fat measures fat mass as a share of the sum of total body fat and muscle mass and bone mineral content. We used the Fat Mass Index (FMI, kg/m^2) in an effort to neutralize the body size effect.

The nutritional status of the participants was evaluated based on the WHO classification system: underweight ($\text{BMI} < 18,5 \text{ kg/m}^2$), normal weight ($\text{BMI} 18,5-24,99 \text{ kg/m}^2$), overweight ($\text{BMI} 25-29,99 \text{ kg/m}^2$), obesity class I ($\text{BMI} 30-34,99 \text{ kg/m}^2$), obesity class II ($\text{BMI} 35-39,99 \text{ kg/m}^2$), and obesity class III ($\text{BMI} > 40 \text{ kg/m}^2$). The nutritional status was also assessed based on individual FMI (DEXA) using Kelly et al.'s classification (4). This classification was adapted and reduced to the following categories: fat deficit (FMI $< 3 \text{ kg/m}^2$ for men and FMI $< 5 \text{ kg/m}^2$ for women), normal FMI (FMI 3 - 6 kg/m^2 for men and FMI 5 - 9 kg/m^2 for women), excess fat (FMI $> 6-9 \text{ kg/m}^2$ for men and FMI $> 9-13 \text{ kg/m}^2$ for women), obesity class I (FMI $> 9 - 12 \text{ kg/m}^2$ for men and FMI $> 13-17 \text{ kg/m}^2$ for women), obesity class II (FMI $> 12-15 \text{ kg/m}^2$ for men and FMI $> 17-21 \text{ kg/m}^2$ for women), and obesity class III (FMI $> 15 \text{ kg/m}^2$ for men and FMI $> 21 \text{ kg/m}^2$ for women).

Individuals with normal weight obesity (NWO) were identified based on their BMI and % FM. Following other studies (5), NWO was defined as $\text{BMI} \leq 24,9 \text{ kg/m}^2$ and % FM $> 20\%$ for men and $> 30\%$ in women.

Given the young age of the participants, arterial hypertension (AH) was defined as systolic blood pressure (SBP) values $\geq 130 \text{ mm Hg}$ and/or diastolic pressure (DBP) values $\geq 85 \text{ mm Hg}$ (in accordance with the International Diabetic Federation's metabolic syndrome criteria) or in case of antihypertensive treatment (6). We used the IDF's cut-off values for abnormal HDL-C, LDL-C and TG. Dyslipidemia is defined when at least one of the following three lipid profile indicators assumes an abnormal value: low HDL-C ($< 1,03/1,29 \text{ mmol/l}$), high triglycerides ($\geq 1,7 \text{ mmol/l}$), or high LDL-C ($\geq 3,36 \text{ mmol/l}$), or if the participant received lipid-lowering medication. Cholesterol values $> 5,17 \text{ mmol/l}$ (200 mg/dl) and LDL-C values $> 3,36 \text{ mmol/l}$ (130 mg/dl) were defined as metabolic risk factors (7). We used TG (mg/dl)/HDL-C (mg/dl) ratio $\geq 3,8$ as an indirect indicator of the atherogenic LDL-C type B.

We conducted the quantitative analysis with SPSS v. 20.0 for Windows. Below, we present descriptive statistics, Student's t-scores, ANOVA dispersion analyses for mean comparisons and relative shares assuming a normal distribution, Mann-Whitney's non-parametric U test for non-normal data distributions, and correlation analyses (Pearson's r and Kendall's τ -b coefficient). We set the level of significance at $p < 0,05$.

Results

Overweight/obesity and increased fat mass

There was no statistically significant difference between the average weight of the survivors or the controls ($p=0,23$), but male the weight of the male survivors was higher than that of the male controls ($p=0,051$). The height of the survivors was significantly lower ($p=0,004$); female survivors had the lowest average height in the entire sample. The BMI, SDSBMI, waist circumference (WC), and WC Z-scores of the male survivors were significantly higher than those of their control counterparts; this was not the case for female ALL survivors (Table 1). The mean BMI ($25,74 \pm 6,08$ kg/m²) of the survivors, especially that of male survivors, fell within the overweight category.

Patients treated with CRT had a higher BMI than patients who only received CT ($25,67 \pm 5,66$ kg/m² vs $22,16 \pm 3,89$ kg/m², $p=0,03$). Similarly, patients treated with high dose CRT (24 Gy) presented with higher BMI ($26,35 \pm 6,09$ kg/m² vs $24,03 \pm 5,05$ kg/m², $p=0,177$), SDSBMI ($0,69 \pm 1,22$ vs $0,58 \pm 0,94$, $p=0,73$) and WC ($87,03 \pm 17,68$ cm vs $80,12 \pm 12,24$ cm, $p=0,126$) than those treated with lower-dose or no CRT.

Figure 1 and Figure 2 present the nutritional status of the participants, measured with their BMI and FMI. The share of individuals with normal weight was twice as high in the control group than in the survivors group. The difference between the two groups' relative shares of overweight/obese individuals was statistically significant ($p=0,005$). The FMI analysis revealed a similar share of ALL survivors with excess fat, but a higher number of survivors with mild and moderate obesity. The proportion of individuals with a 'fat deficit' measured by FMI is higher in the control group at the expense of the 'normal weight' category assessed by BMI.

37,04% of ALL survivors and 28% of controls presented with normal weight obesity (NWO). This phenotype was statistically significantly more prevalent among female survivors than among male survivors ($57,14\%$ vs $15,38\%$, $p=0,023$) or female controls ($57,14\%$ vs $33,33\%$, $p=0,29$). Half of female ALL survivors with NWO had BMI $< 18,5$ kg/m².

The fat mass of ALL survivors ($22,85 \pm 10,61$ kg vs $16,99 \pm 10,04$ kg, $p=0,009$), % FM ($35,92 \pm 8,9\%$ vs $25,80 \pm 12,26\%$, $p=0,002$), FMI ($8,90 \pm 3,58$ kg/m² vs $5,75 \pm 3,31$ kg/m², $p=0,002$), and Fat Mass Centile

($86,83 \pm 22,4$ vs $59,84 \pm 35,63$, $p=0,003$) were significantly higher than that of the controls. This difference was highly pronounced among men. Male ALL survivors had twice the fat mass ($p=0,006$), % FM ($p=0,002$), and FMI ($p=0,009$) of their peers. Albeit higher, the fat mass parameters of female ALL survivors did not significantly differ from the parameters of corresponding controls (Figure 3).

Male ALL survivors also exhibited higher Android % Fat and Gynoid % Fat compared to sex-matched controls ($41,29 \pm 10,05\%$ vs $24,87 \pm 14,81\%$, $p=0,006$ and $37,49 \pm 8,19\%$ vs $24,89 \pm 11,09\%$, $p=0,003$, respectively), and were more likely to have an android type of fat distribution (A/G ratio $1,09 \pm 0,15$ vs $0,94 \pm 0,21$, $p=0,05$). Female ALL survivors had higher Android % Fat and Gynoid % Fat but their fat mass' distribution was proportional.

ALL survivors who received 24 Gy of CTR had significantly higher % FM ($40,2 \pm 7,26\%$ vs $32,88 \pm 9,12\%$, $p=0,01$), fat mass ($27,5 \pm 9,98$ kg vs $21,02 \pm 9,31$ kg, $p=0,039$), and FMI ($10,0 \pm 3,52$ kg/m² vs $7,78 \pm 3,36$ kg/m², $p=0,048$) than those who only received CT or who received a lower CRT dose. They also had a higher Gynoid % Fat ($46,42 \pm 7,35\%$ vs $40,1 \pm 8,77\%$, $p=0,022$) and Android % Fat ($44,72 \pm 7,73\%$ vs $37,19 \pm 11,16\%$, $p=0,027$) at similar A/G ratios.

Waist circumference was positively and significantly correlated with A/G ratios ($r=0,802$, $p < 0,001$) and BMI ($r=0,962$, $p < 0,001$) in ALL survivors. The correlation between survivors' WC and A/G ratio remained significant ($r=0,602$, $p=0,001$) even after BMI was controlled for.

Dyslipidemia

Total cholesterol, LDL-C and TG levels did not differ between patients and controls. However, ALL survivors had significantly lower HDL-C values ($p=0,004$). The average HDL-C values of male and female survivors were also significantly lower than those of their healthy peers ($p=0,035$ and $p=0,021$, respectively). Male ALL survivors had higher levels of apolipoprotein B ($102,66 \pm 27,0$ mg/dl vs $84,29 \pm 23,21$ mg/dl, $p=0,07$). Figure 4 shows the relative frequency of lipid abnormalities in all participants.

Seventeen out of 28 (60,71%) ALL survivors presented with dyslipidemia compared to 8 out of 25 (32%) controls ($p=0,037$). Dyslipidemia was more common in male ALL survivors than in male controls ($71,42\%$ vs $38,46\%$, $p=0,035$). There was no significant difference in the proportion of individuals with dyslipidemia across female survivors and female controls (50% vs 25% , $p=0,41$). Multiple lipid abnormalities were twice as common in survivors than in controls (25% vs 12% , $p=0,14$) and prevailed among male, rather than female, survivors (50% vs $7,14\%$, $p=0,039$). 21,4% of survivors and only 8% of controls had a TG/HDL-C ratio $\geq 3,8$.

Table 1. Anthropometric parameters in ALL survivors and controls

	Male survivors (n=14)	Male controls (n=13)	p	Female survivors (n=14)	Female controls (n=12)	p
Weight (kg)	88,01 (20,3)	74,7 (12,1)	0,051	57,9 (13,9)	58,3 (10,4)	0,95
Height (cm)	173,8 (8,0)	177,9 (7,3)	0,170	160,2 (4,9)	165,9 (5,1)	0,008
BMI (kg/m ²)	28,9 (5,2)	23,6 (3,3)	0,004	22,5 (5,2)	21,1 (3,2)	0,40
SDSBMI	0,50 (1,03)	-0,50 (0,69)	0,007	0,15 (1,19)	-0,18 (0,73)	0,40
WC (cm)	95,5 (14,8)	83,1 (8,9)	0,015	74,1 (11,0)	72,5 (10,6)	0,71
WC (Z-score)	0,42 (1,08)	-0,42 (0,73)	0,027	0,07 (1,03)	-0,08 (0,99)	0,71

* Values are presented as means (SD)

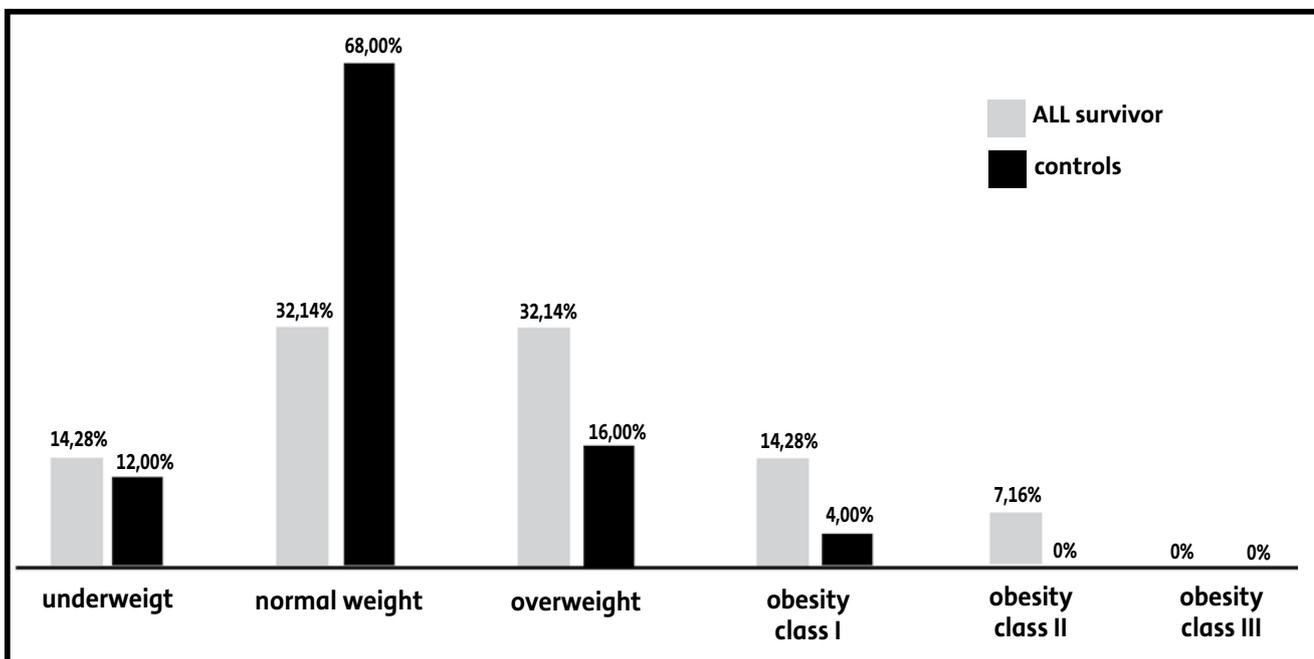


Figure 1. Nutritional status of participants measured by BMI

lipid abnormalities were more pronounced among survivors treated with CRT than among those who did not receive cranial irradiation, but the difference did not reach statistical significance. The incidence of dyslipidemia (1 or more aberrant parameters) in these cases was also comparable between the two groups.

Glucose homeostasis and inflammatory activity

The glucose metabolism indicators of survivors and controls were similar, even when sex was controlled for. One patient was on insulin treatment for iatrogenic diabetes. CRP levels also did not differ between survi-

lors and controls, although 17,9% of survivors presented with inflammatory activity (CRP \geq 3 mg/l) compared to only 8% of controls ($p=0,29$).

Increased arterial pressure

Three ALL survivors (10,7%), all of whom men (21,4% of the men in the sample), had increased SBP/DBP. The average AP of survivors was statistically significantly higher than that of controls ($p=0,05$). SBP and mean AP values were also significantly higher in male ALL survivors than in female survivors ($p=0,004$ and $p=0,027$, respectively). The SBP and average AP of male All survivors were significantly higher than those

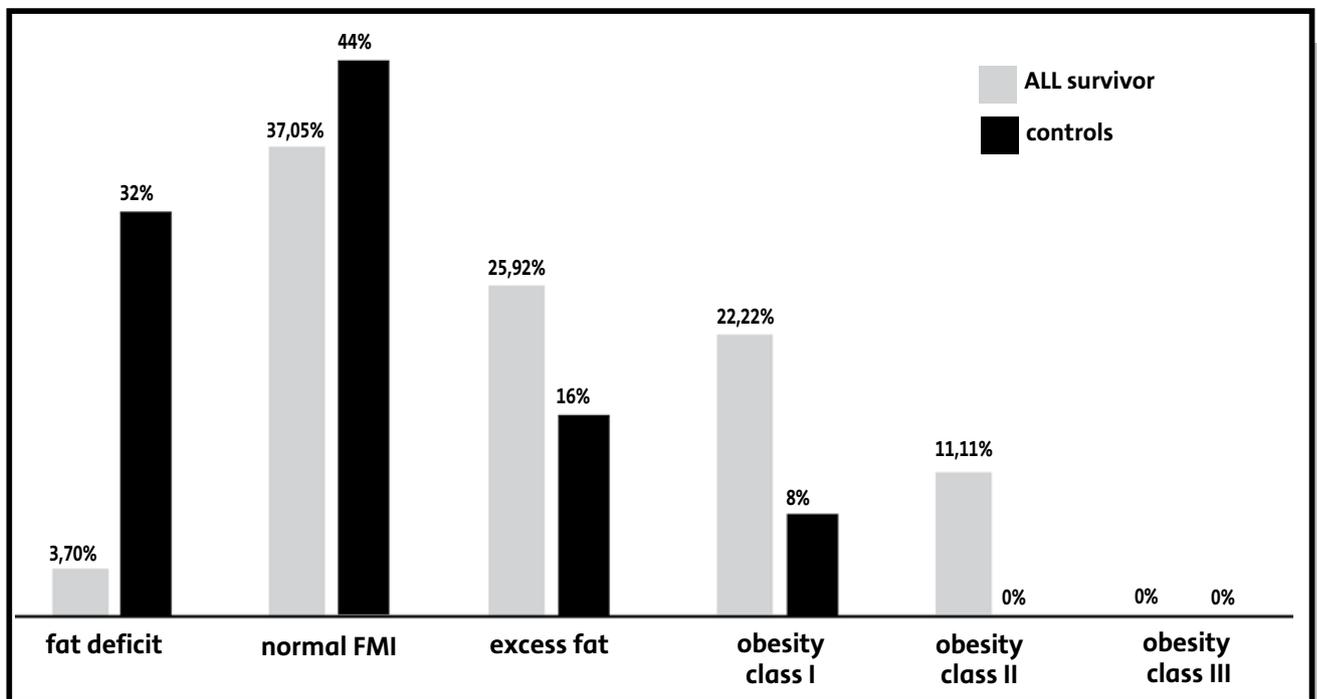
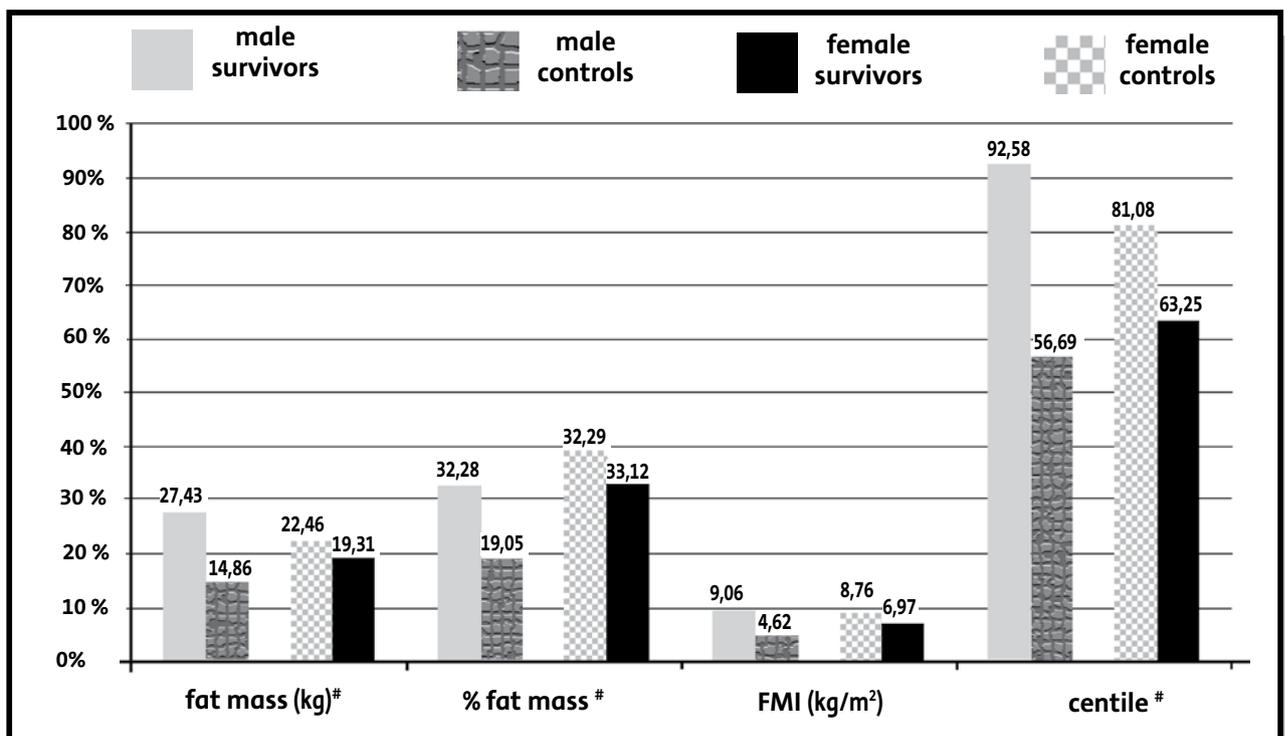
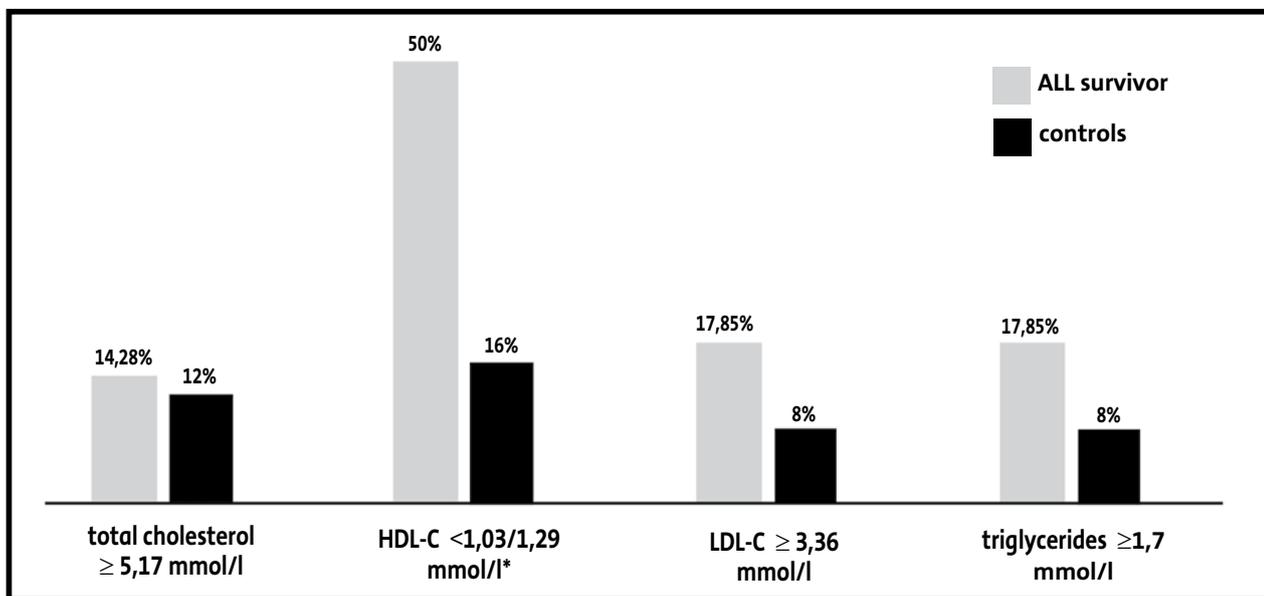


Figure 2. Nutritional status of participants measured by FMI



significant difference between male survivors and male controls (p<0,01)

Figure 3. Fat mass parameters (DEXA) in male and female ALL survivors compared to corresponding controls



* – significant difference with controls (p=0,007)

Figure 4. Lipid panel abnormalities in participants

of male controls (119,0±8,5 mm Hg vs 111,9±6.1 mm Hg, p=0,021 and 89,9±10,9 mm Hg vs 83,4±4,9 mm Hg, p=0,057, respectively). The AP parameters of female ALL survivors did not differ from those of the female controls.

Discussion

Unsurprisingly, our analysis finds a significantly higher percentage of overweight and obesity among ALL survivors than among their healthy peers. According to Garmey et al., at a similar age 17% of ALL survivors are obese. This number increases to 31,7% when participants reach 32 years (9). An earlier study found that the frequency of obesity was around 31,3% in their early twenties and reached 42,8% around the time they turned 30 (7). Other authors report lower frequencies of overweight/obesity. In a series of 75 adolescents and young adults (mean age 21,2 years) who were all treated according to current DFCI protocol, 30% are overweight and only 8% have non-morbid obesity (10). Belle et al. found no significant difference in the incidence of overweight/obesity in ALL survivors and the general Swiss population (11). While these results could be explained by differences in genetic predisposition, they could also be due to different diets or physical activity levels in regions with different cultures.

Unlike other studies, which mostly identify abnormalities in women, our analysis finds that overweight and obesity prevail among men. Even though more women than men in our sample received the highest dose of CRT (24 Gy), we do not find the high obesity rate and the increased cardiovascular risk reported by Oeffinger et al. (12) among female ALL survivors who had received CRT. This is likely the result of the higher age of our patients at the moment of CNS irradiation. The age at diagnosis, therapeutic exposure and family history of obesity do not differ across male and female patients in our sample. Nevertheless, male survivors have higher adiposity and BMI values that come close to the obesity cut-offs than female survivors. Recent studies report similar findings (13). An analysis focusing on a relatively large cohort from a single Polish center outlines that overweight and obesity are significantly more common in men treated for ALL and malignant lymphomas (14). This prevalence of overweight and obesity in male ALL survivors cannot be solely attributed to the treatment protocol. As some have argued, it might have to do with increased sensitivity to glucocorticoids in men.

Obesity per se constitutes a cardiovascular risk, but metabolic dysregulation is mainly associated with central (visceral) obesity (15, 16). Our results are consistent with this conclusion. Miller et al. arrive at a similar conclusion evaluating a sample of 170 patients who were treated for malignant haemopathies in childhood.

At a similar age and with a similar follow-up period, male survivors presented with higher % FM ($p=0,007$), truncal fat mass ($p=0,008$), total cholesterol, LDL-C and TG levels than controls (17). Compared to patients who never received CRT, male survivors of childhood ALL who were treated with CRT also had higher visceral fat mass and abnormal lipid profile in the study of Jarfeld et al. (13). In our sample, the WC of male survivors is strongly and significantly correlated with their A/G ratio and BMI, as seen in the general population. In contrast, a large share of female ALL survivors (57,14%) with increased fat mass and a real risk of cardiovascular disease remain „hidden“ behind normal, even low BMI values. Their body composition evaluation reveals low muscle mass, which may exacerbate glucose intolerance and additionally increase metabolic risk in the future. The number of survivors in our sample is too low to analyze the incidence of dyslipidemia and abdominal obesity in NWO individuals, but in these cases, especially among women, the individual risk of MS is 4 times higher than that of people with normal weight and % FM (5).

Given the high risk of chronic pathology in ALL survivors, the inaccurate evaluation of overweight and obesity may prevent appropriate medical advice about current and future health risks as well as adequate diet and physical activity interventions. The direct measurement of fat mass ensures a better understanding of metabolic risk and can guide prevention strategies more effectively. We still lack consensus on the exact healthy amount of fat mass. Proposed values take sex and age into account, and range between 20 and 25% FM for men and between 30 and 37% FM for women (18). However, these general values are elaborated based on BMI, which is not a good foundation for such estimations. The differences between obesity estimated by BMI and adiposity measured through DEXA are too wide, both in the general population (19) and among ALL survivors (20). FMI determines the amount of fat mass more accurately and can re-classify patients in the obesity categories, as we see in our study. Noteworthy, however, is the fact that the potential therapy-induced change in height, which is observable among the female survivors in our sample, affects the calculation of fat mass as an index. This further highlights the difficulties of accurately determining the nutritional status of individuals, especially that of some groups in our population. The elaboration of good methods, accurate criteria, and valid reference values is a subject of ongoing research.

We are convinced that DEXA is undoubtedly better than BMI at evaluating metabolic risk and customizing efforts to lower this risk in ALL survivors. The ability to assess patients' whole-body and visceral adiposity and to directly measure their muscle mass gives this risk functional parameters. Childhood ALL survivors have a tendency to sarcopenic obesity in their early maturity (21). This phenotype combines the metabolic effects of reduced muscle mass (more pronounced among

young adults than among elderly people) with the effect of obesity-induced metabolic dysfunction resulting from treatment. In some studies, the combination of low muscle mass and high fat mass is more closely associated with insulin resistance than obesity itself (22, 23). Therefore, in long-term ALL survivors metabolic homeostasis, insulin resistance, and cardiovascular events are affected by both the additive and synergistic effects of their visceral adiposity and reduced muscle mass. The evaluation of the individual body composition that DEXA makes possible can further guide efforts to reduce fat mass and/or increase muscle mass more accurately (24).

The literature has already documented the atherogenic dyslipidemia phenotype that we depict. A detailed analysis of the lipid profile in 80 ALL survivors' (25) identifies dyslipidemia in 50% of the sample, regardless of participants' sex and age. The mean age, follow-up period, and BMI of this cohort are similar to ours. Furthermore, the definition of dyslipidemia used identical cut-off values.

Our study finds that ALL survivors, especially men, experience an increased burden of cardiovascular risk factors compared to their healthy peers. Arterial hypertension and glucose homeostasis abnormalities/diabetes are relatively rare. This is likely due to our small sample and the relative youth of our subjects. In a large German cohort of 951 survivors (mean age of 34 years and mean follow-up period of 28.4 years), Faber et al. report a relative risk of AH of 1.38 and of dyslipidemia of 1,26 (26). Dyslipidemia and AH are more common among the male than among the female survivors in this sample, and their onset takes place 6 and 8 years earlier than they do in the general population. It is thus necessary to evaluate the lipid profile, glucose homeostasis, SBP, and DBP of survivors, especially male survivors, early, regularly, and attentively, and to stage an intervention accordingly. While obesity is the main cardiometabolic risk factor in the general population, in patients with malignant hemopathies the therapeutic exposure itself induces fat-mass dysfunction regardless of the amount of fat mass. This is consistent with Giordani et al. who identified endothelial dysfunction, which persists over time and is not affected by the treatment intensity, 28 months after the period of the treatment (27). Another example is patients exposed to bone marrow transplantation and whole-body radiotherapy who have an unfavourable metabolic profile but do not have overweight and obesity. Their body composition phenotype is characterized by low muscle mass and high visceral adiposity without increased WC. Furthermore, they have inflammatory activity, increased CRP and leptin levels, and decreased adiponectin (28).

In conclusion, overweight, abdominal adiposity, and dyslipidemia are the most common cardiometabolic risk factors in ALL survivors. They have an early onset, affect male patients more than female patients, and are especially prevalent in those treated with earlier

treatment protocols including more intensive chemotherapy and radiotherapy. Prolonged exposure can further exacerbate these abnormalities and raise the long-term metabolic and cardiovascular risk. The routine monitoring of the lipid panel and aggressive management of

metabolic abnormalities are mandatory for patients in long-term remission. The wider use of DEXA in measuring the fat mass and evaluating the body composition of this young population helps identify survivors at risk and customize prophylactic interventions.

References

1. Meacham LR, Chow EJ, Ness KK, Kamdar KY, Chen Y, Yasui Y, et al. Cardiovascular risk factors in adult survivors of pediatric cancer – A report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:170-181.
2. Armstrong GT, Q Liu, Y Yasui, Neglia JP, Leisenring W, Robison LL, et al. Late mortality among 5-year survivors of childhood cancer: a summary from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol* 2009;27:2328-2338.
3. Belcheva M, Usheva N, Hristozova Hr, Kaleva V, Iotova V. Metabolic syndrome after completed treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia: Results from a single center in Bulgaria. *Pediatrics* 2019;1:37-41. (In Bulgarian) [Белчева М, Ушева Н, Христова Хр, Калева В, Йотова В. Метаболитен синдром след завършено лечение по повод остра лимфобластна левкемия в детска възраст: резултати от един клиничен център в България. *Педиатрия* 2019;1:37-41.]
4. Kelly TL, Wilson KE, Heymsfield SB. Dual Energy X-ray absorptiometry body composition reference values from NHANES. *PLoS One* 2009;4(9):e7038. doi: 10.1371/journal.pone.0007038.
5. Romero-Corral A, Somers VK, Sierra-Johnson J, Korenfeld Y, Boarin S, Korinek J, et al. Normal weight obesity: a risk factor for cardiometabolic dysregulation and cardiovascular mortality. *Eur Heart J* 2010;31(6):737-746.
6. Zimmet P, Alberti KG, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S, et al; IDF Consensus Group The metabolic syndrome in children and adolescents – an IDF consensus report. *Pediatric Diabetes* 2007;8(5):299-306.
7. Oeffinger KC, Buchanan GR, Eshelman DA, Denke MA, Andrews TC, Germak JA, et al. Cardiovascular risk factors in young adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001;23(7):424-430.
8. Hanak V, Munoz J, Teague J, Stanley A, Bittner V. Accuracy of the triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol ratio for prediction of the low-density lipoprotein phenotype B. *Am J Cardiol* 2004;94:219-222.
9. Garmey EG, Liu Q, Sklar CA, Meacham LR, Mertens AC, Stovall MA, et al. Longitudinal changes in obesity and body mass index among adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol* 2008;26:4639-4645.
10. Collins L, Beaumont L, Cranston A, Savoie S, Nayiager T, Barr R. Anthropometry in long-term survivors of acute lymphoblastic leukemia in childhood and adolescence. *J Adolesc Young adult Oncol* 2017;6(2):294-298.
11. Belle FN, Weiss A, Schindler M, Goutaki M, Bochud M, Zimmermann K, et al. for the Swiss Pediatric Oncology Group. Overweight in childhood cancer survivors: the Childhood Cancer Survivor Study. *Am J Clin Nutr* 2018;107:3-11.
12. Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA, Yasui Y, Fears T, Stovall M, et al. Childhood Cancer Survivor Study. Obesity in adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol* 2003;21:1359-1365.
13. Jarfeld M, Lannerberg B, Bosaeus I, Johannsson G, Bjarnason R. Body composition in young adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Endocrinol* 2005;153:81-89.
14. Sawicka-Zukowska M, Luczynski W, Cobroch J, Krawczuk-Rybak M. Factors affecting weight and body composition in childhood cancer survivors – cross-sectional study. *Ecancer* 2020;14:999. doi.org/10.3332/ecancer.2020.999
15. Karpe F, Pinnick K. Biology of upper-body and lower-body adipose tissue – link to whole-body phenotypes. *Nature Rev Endocrinol* 2015;11:90-100.
16. Booth A, Magnuson A, Foster M. Detrimental and protective fat: body fat distribution and its relation to metabolic disease. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2014;17(1):13-27.
17. Miller TL, Lipsitz SR, Lopez-Mitnik G, Hinkle AS, Constine LS, Adams MJ, et al. Characteristic and determinants of adiposity in pediatric cancer survivors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19(8):2013-2022.
18. Gallagher D, Heymsfield SB, Heo M, Jebb SA, Murgatroyd PR, Sakamoto Y. Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. *Am J Clin Nutr* 2000;72:694-701.
19. Pasco JA, Holloway KL, Dobbins AG, Kotowicz MA, Williams LJ, Brennan SL. Body mass index and measures of body fat for defining obesity and underweight: a cross-sectional, population-based study. *BMC Obesity* 2014;1:9. doi: 10.1186/2052-9538-1-9.
20. Karlage RE, Wilson CL, Zhang N, Kaste S, Green DM, Armstrong GT, et al. Validity of anthropometric measurements for characterizing obesity among adult survivors of childhood cancer: a report from the St. Jude Lifetime Cohort Study. *Cancer* 2015;121:2036-2043.
21. Marriott CJC, Beaumont LF, Farncombe TH, Cranston AN, Athale UH, Yakemchuk VN, et al. Body composition in long-term survivors of acute lymphoblastic leukemia diagnosed in childhood and adolescence: A focus on sarcopenic obesity. *Cancer* 2018;124(6):1225-1231.
22. Lim S, Kim JH, Yoon JW, Kang SM, Choi SH, Park YJ, et al. Sarcopenic obesity: prevalence and association with metabolic syndrome in the Korean Longitudinal Study on Health and Aging (KLoSHA). *Diabetes Care* 2010;33:1652-1654.
23. Levine ME, Crimmins EM. The impact of insulin resistance and inflammation on the association between sarcopenic obesity and physical functioning. *Obesity* 2012;20:2101-2106.
24. Boland AM, Gibson TM, Lu L, Kaste SC, DeLany JP, Partin RE, et al. Dietary protein intake and lean muscle mass in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia: report from the St. Jude Lifetime Cohort Study. *Physical Ther* 2016;96(7):1029-1038.
25. Morel S, Leahy J, Fournier M, Lamarche B, Garofalo C, Grimard G, et al. Lipid and lipoprotein abnormalities in acute lymphoblastic leukemia survivors. *J Lipid Res* 2017;58(5):982-993.
26. Faber J, Wingerter A, Neu MA, Henninger N, Erkerle S, Munzel T, et al. Burden of cardiovascular risk factors and cardiovascular disease in childhood cancer survivors: data from the German CVSS-study. *Eur Heart J* 2018;39(17):1555-1562.
27. Giordani P, Muggeo P, Delvecchio M, Carbonara S, Romano A, Antomare M, et al. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors in childhood acute lymphoblastic leukemia survivors. *Int J Cardiol* 2017;228:621-627.
28. Novetsky Friedman D, Hilden P, Moskowitz C, Suzuki M, Boulad F, Kernan N, et al. Cardiovascular risk factors in survivors of childhood hematopoietic cell transplantation treated with total body irradiation: a longitudinal analysis. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017;23:475-482.

Определяне на референтни стойности на андрогенни стероиди в урината при българска популация във възрастта 16-30 години

Шейтанова, Таня З.¹, Заркова, Виолета Л.¹, Орбецова, Мария М.²,
Генчев, Генчо Д.³

¹ Лаборатория за Допингов контрол, Антидопингов Център,

² Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Св. Георги“, Катедра по Ендокринология, МФ, МУ, Пловдив

³ Катедра по Икономика на здравеопазването, ФОЗ, МУ, София

Адрес за кореспонденция:

Проф. д-р Мария Орбецова

Клиника по Ендокринология и болести на обмяната,
УМБАЛ „Св. Георги“, ул. „В. Априлов“ 15 А, Пловдив, 4000
e-mail: morbetzova@abv.bg

Постъпване: 24.05.2020

Приемане: 02.06.2020

Резюме

Андрогенните стероиди са широко разпространени сред спортистите и употребата им в най-различни форми е основен проблем в съвременния спортен свят. Програмата на Световната Анти-допингова Агенция (WADA) за биологични паспорти на спортисти въвежда стандартизиран модул (т.нар. „стероиден профил“) за всеки спортист, който позволява да се идентифицират приети екзогенно анаболни андрогенни субстанции от Забранителния списък. Доказано е, че стероидният профил се влияе от пол, възраст, физическа активност, диета и етническа принадлежност.

Цел: Определяне на референтни стойности на стероиди в урината при репрезентативна извадка от българска популация клинично здрави мъже и жени във възрастта 16-30 години, спортуващи в свободното време, с оглед създаване на национални норми за показателите от стероидния профил.

Материал и методи: Проучването е проведено в периода 2016-2017 г. и обхваща 1189 клинично здрави и спортуващи в свободното време лица във възрастта 16-30 години, от които 840 (70,6%) мъже и 349 (29,4%) жени. Групите участници са географски равномерно разпределени в страната. Изследвани са показателите тестостерон (Т); епитестостерон (ЕрТ) и тяхното съотношение (Т/ЕрТ); андростерон (А); етиохоланолон (Еtio); 5 α -андростан-3 α ,17 β -диол (5 α -diol); 5 β -андростан-3 α ,17 β -диол (5 β -diol) в уринни проби. Количественото определяне на стероидите е извършено чрез газова хроматография с мас спектрометрия.

Резултати: Определени са референтни стойности за Т, ЕрТ, Т/ЕрТ, А, Еtio, 5 α -diol, 5 β -diol. Прегледаван е обхватът от 2,5 до 97,5 персентил с 95% доверителен интервал на изследваните компоненти на стероидния профил поотделно за двата пола.

Заклучение: Създадената национална база данни за показателите на стероидния профил ще послужи за сравняване на индивидуалните резултати от „биологичния паспорт“ при младото поколение български спортисти, както и за продължителното им проследяване по време на и извън състезания, за да бъдат елиминирани погрешни интерпретации на настъпили отклонения.

Ключови думи: анаболни андрогенни стероиди; Програма за биологични паспорти на спортисти; стероиден профил; референтни стойности; газова хроматография с мас спектрометрия

Въведение

Анаболните андрогенни стероиди са широко разпространени сред спортистите и употребата им в най-различни форми е основен проблем в съвременния спортен свят (1, 2). Определянето на произхода на анаболните стероиди – ендогенен (физиологичен) или екзогенен (фармацевтичен), е сложно, което в допълнение към биологичните им ефекти прави тези вещества много популярно средство за подобряване на физическата форма и спортните резултати (3). Официалната забрана за приложението им в спорта, изисква големи усилия и ресурс за разработване на общовалидни скринингови стратегии за доказване на наличността им. За борба с допинга в спорта и предоставяне на единни стандарти за допинг контрол през 1999 г. е създадена независима международна организация – Световна Анти-допингова агенция (WADA). Въпреки постигнатите добри резултати, понастоящем откриването на отклоненията в концентрациите на ендогенните стероиди в урината вследствие екзогенно внасяне продължава да бъде едно от най-големите предизвикателства, пред което са изправени акредитираните от WADA антидопингови лаборатории. Терминът „биологичен паспорт на спортист“ е предложен за първи път в началото на 2000 г. от научни колективи, които идентифицират избрани хематологични показатели (маркери за кръвен допинг) като средство за определяне на хематологичния профил на индивида. Със създаването си WADA предприема действия по горазвиване, хармонизиране и валидиране на тази концепция. В резултат на тези активности през 2009 г. за първи път се публикуват официални оперативни указания и задължителни стандарти, познати като Програма за биологични паспорти на спортисти (4). Тези стандарти за изготвяне на биологичните паспорти не заменят приложението на традиционните аналитични методи за тестване на определени показатели, а по скоро допълват методите с оглед усъвършенстване и подсилване на анти-допинговите стратегии като цяло.

В рамките на Програмата е въведен и стандартизиран метод за откриване на злоупотреба с андрогенни стероиди чрез изследване на определени показатели в уринни проби. Стероидният модул (т. нар. „стероиден профил“) има за цел да идентифицира отклонения, когато са администрирани екзогенни и други анаболни агенти (субстанции) от Забранителния списък. От 2014 г. е въведен стероидният модул на ABP и методите на лабораториите отговарят на изискванията на WADA TD2014EAAS.

В Програмата на WADA стероидният профил се дефинира като съвкупност от известни ендогенни съединения, структурно свързани с тестостерона, неговите биосинтетични прекурсори и метаболити, използвани в анти-допинг протоколите за проследяване приложението на анаболни андрогенни стероиди. Следните маркери са включени в стероидния профил: *5 α -андростан-3 α ,17 β -диол (5 α -diol); 5 β -андростан-3 α ,17 β -диол (5 β -diol), андростерон (A); етиохоланолон (Etio); тестостерон (T); епитестостерон (EpiT) и тяхното съотношение (T/EpiT) (4). WADA препоръчва референтни граници за концентрациите на показателите от уринния стероиден профил и някои съотношения между тях, които се явяват маркери за употреба на тестостерон и негови прекурсори (5). Така, като атипични отклонения са общоприети уринни концентрации на T или EpiT по-високи от 200 ng/ml, на A или Etio по-високи от 10 000 ng/ml; съотношение T/EpiT над 4 (5).*

Доказано е, че стероидният профил се влияе от пол, възраст, физическа активност, диета и етническа принадлежност (6-8). Последният факт е изключително важен, тъй като в литературата се натрупват данни за различия в референтните обхвати на ключови стероидни показатели, както между различни етнически популации, така и между отделни лаборатории (9). Например, концентрациите на T, EpiT, A, Etio, DHEA, 5 α -diol и 5 β -diol при Латинско-американска популация са между 1,6 пъти и 1,9 пъти по-високи от тези при Кавказка популация (10). Освен това се откриват значими вариации в експресията на ензима *uridine diphosphate (UDP)-glucuronosyltransferase 2B17 (UGT2B17)*, който играе важна роля в метаболизма на тестостерона при хора (катализира трансфера на UDP-глюкуронова киселина към молекулата на тестостерона, за да повиши бъбречната му екскреция) (11, 12), както интрапопулационно, така и между популациите поради различното разпространение на полиморфизма с делеция на UGT2B17 гена (13). Лицата с делеция(и) на UGT2B17 имат по-високи серумни нива на T (с 15%) (14) и по-ниска екскреция на T в урината (с ~90%) (15-17). В допълнение, делецията на UGT2B17 е свързана с по-ниско съотношение T/EpiT, което е рутинен маркер за откриване на злоупотреба с тестостерон при допинг-контрол (18, 19). Създаването на собствени национални референтни обхвати на компонентите на стероидния профил ще диференцира етническите вариации.

Целта на настоящото проучване е определяне на референтни стойности на стероиди в урината при репрезентативна извадка от българска популация клинично здрави мъже и жени във въз-

растта 16-30 години, спортуващи в свободното време, с оглед създаване на национални норми за показателите от стероидния профил. Тази национална база данни, основана на надеждни статистически анализи, ще послужи за сравняване на индивидуалните резултати от „биологичния паспорт“ при младото поколение български спортисти, както и за продължително проследяване на стероидния профил по време на и извън състезания, за да бъдат елиминирани погрешни интерпретации на настъпили отклонения. „Честната игра“ и защитата на здравето на спортистите са основата на Националната Антидопингова Програма в България.

Материали и методи

Проучването е проведено в периода 2016-2017 г. и обхваща 1189 клинично здрави и спортуващи в свободното време лица във възрастта 16-30 години, от които 840 (70,6%) мъже и 349 (29,4%) жени. Тази извадка като общ брой за целевия възрастов интервал отговаря на изискването за репрезентативност. Необходимият брой случаи, гарантиращ максимална статистическа грешка не по-голяма от 3% при българското население на възраст 16-30 години въз основа на данни от Националния Статистически Институт за цитирания период, е 1067 (20).

Участниците в проучването отговарят на следните критерии за включване: спортуване в свободното време; свободен диетичен режим без целенасочени диети, ограничаващи калорийността и приема на определени хранителни вещества; отсъствие на остри и клинично значими хронични заболявания; липса на употреба на лекарствени средства и хранителни добавки, които биха могли да повлияят нивата на стероидните хормони и обмяната на веществата, не по-малко от 3 месеца преди включване в проучването. Групите участници са географски равномерно разпределени в страната.

Пробите са събирани в съответствие с изискванията на Международния Стандарт за Тестване и Разследвания на WADA (21) и са анализирани в Лабораторията за Допингов контрол на Антидопинговия Център към Министерство на младежта и спорта. Уринни проби с ниско относително тегло под 1,004 не са изследвани. Не са използвани данните от проби с установена бактериална контаминация. Измерените концентрации на стероидите, във всички останали проби, са коригирани към относително тегло 1,020 (TD2014EAAS). Анализирани са показателите тестостерон (T); епитестостерон (EpiT) и тяхното

съотношение (T/EpiT); андростерон (A); етиохоланолон (Etio); 5 α -андростан-3 α ,17 β -диол (5 α -diol); 5 β -андростан-3 α ,17 β -диол (5 β -diol).

Описание на лабораторната постановка:

Количественото определяне на стероиди в уринните проби е извършено чрез газова хроматография с мас-спектрометрия (GC/MS) след хидролиза, течно-течна екстракция и дериватизация (TD2014EAAS). 1 ml урина е хидролизирана с β -Glucuronidase (E. coli K 12) при pH=7, 50 °C за 1 h, след което е извършена течно-течна екстракция (LLE) с третичен-бутил метил етер (t-BME) при pH=9,6. Отделената органична фаза е изпарена до сухо, изсушена под вакуум и дериватизирана с 50 μ l MSTFA/NH₄I/2-ME (500:1:3). Камо вътрешни стандарти (ISTD) са използвани d5-Etiocholanolone, d3-Epitestosterone и d3-Testosterone.

Хроматографско разделяне и количествено определяне

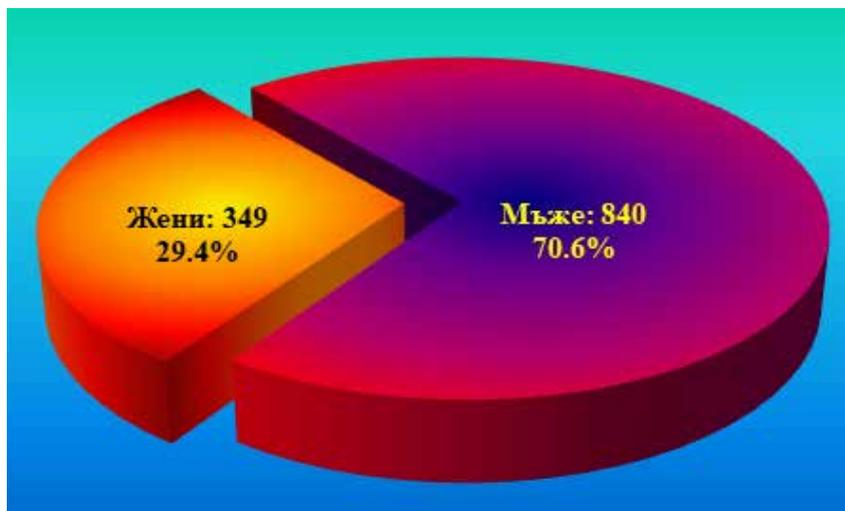
Пробите са анализирани с газов хроматограф с мас-селективен детектор Agilent Technologies 7890A/5975C. Използвана е газово-хроматографска колона Agilent DB-1MS (20m x 180 μ m x 0,18 μ m) – 100% Dimethylpolysiloxane. От всяка проба са инжектирани 3 пъти по 2 μ l. Температурният градиент на пещта започва от 190 °C със загържане 0 min. Следва нагряване до 218 °C с 2 °C/min и загържане 3 min. Втората стъпка на градиента е до 230 °C с 2 °C/min и загържане 0 min. Третата стъпка на градиента е до 300 °C с 20 °C/min и загържане 6 min. Камо носещ газ е използван хелий със скорост 1 ml/min. Режимът на работа на детектора е SIM, при йонизация с електронен удар (70 eV).

Установените съединения са Androsterone (m/z 434), Etiocholanolone (m/z 434), 5 α -Androstane-3 α ,17 β -diol (m/z 436), 5 β -Androstane-3 α ,17 β -diol (m/z 436), Epitestosterone (m/z 432), Testosterone (m/z 432), d5-Etiocholanolone (m/z 439), d3-Epitestosterone (m/z 435), d3-Testosterone (m/z 435). За количественото определяне на съединенията е използвана калибрационна крива с 5 точки.

Статистически анализи: Данните са въведени и обработени чрез програма Refval v.4.11, считана за лабораторен стандарт. След отстраняване на екстремните стойности е определен видът на разпределението и, ако не е нормално, чрез математически техники е конвертирано в нормално. Впоследствие, референтните стойности са определяни по параметричен метод. В случаите, когато разпределението на емпиричните данни не може да бъде приведено към нормалното, е използван подобрен вариант на непараметрично определяне на референтните граници.

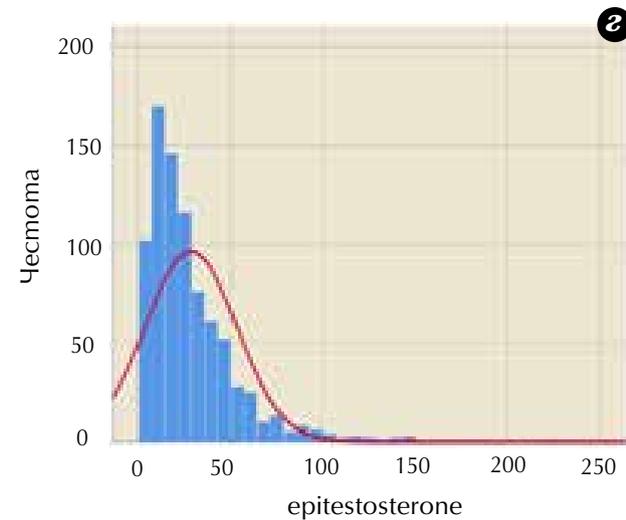
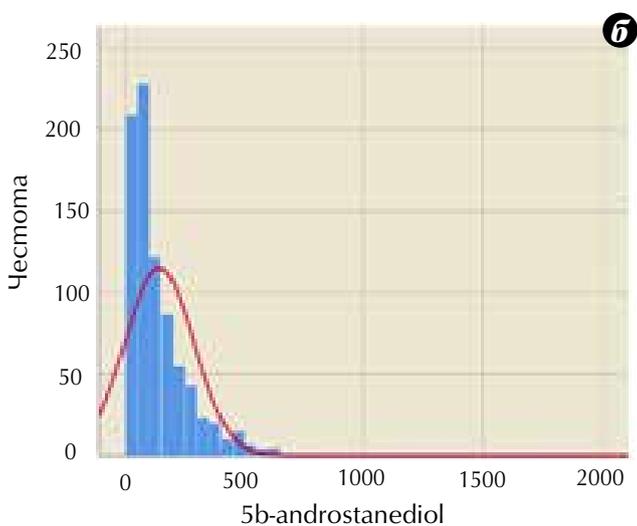
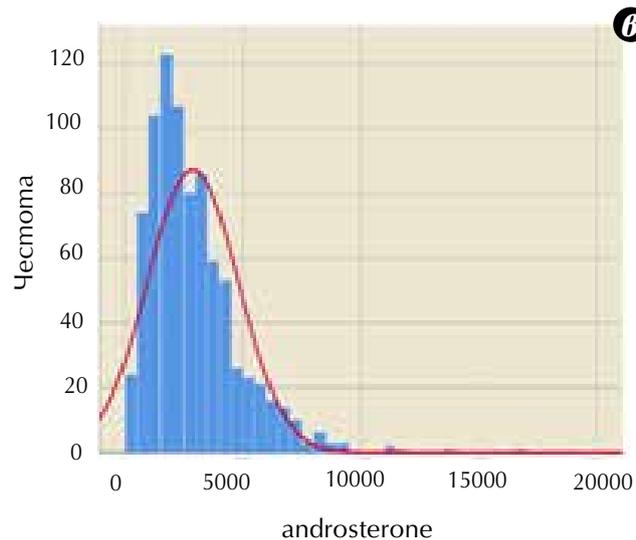
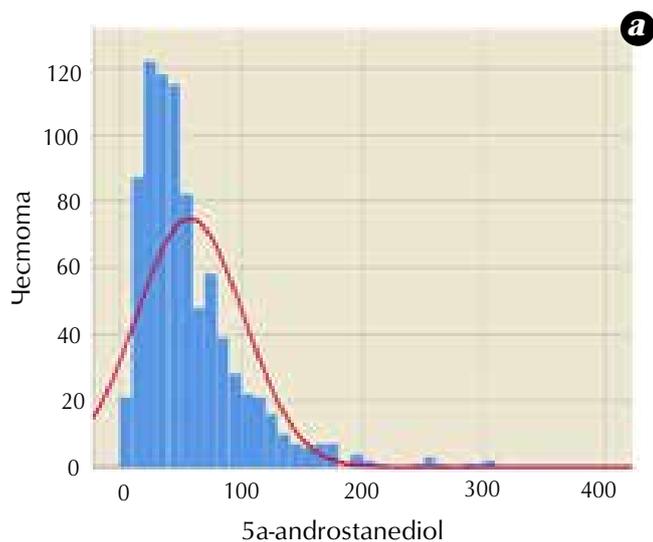
Фигура 1.

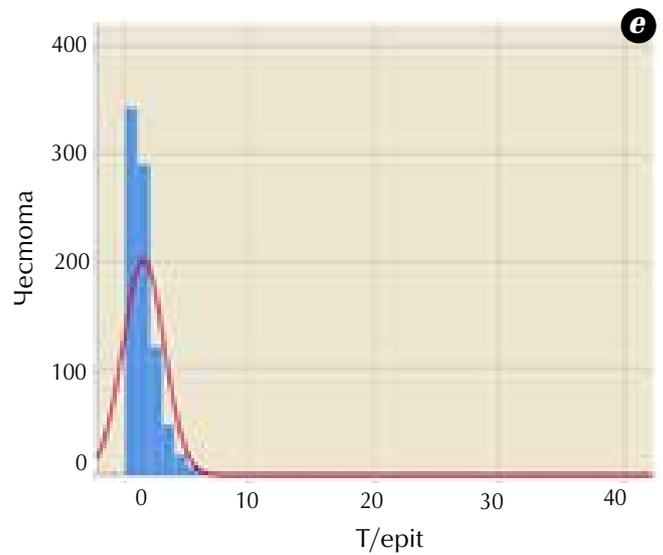
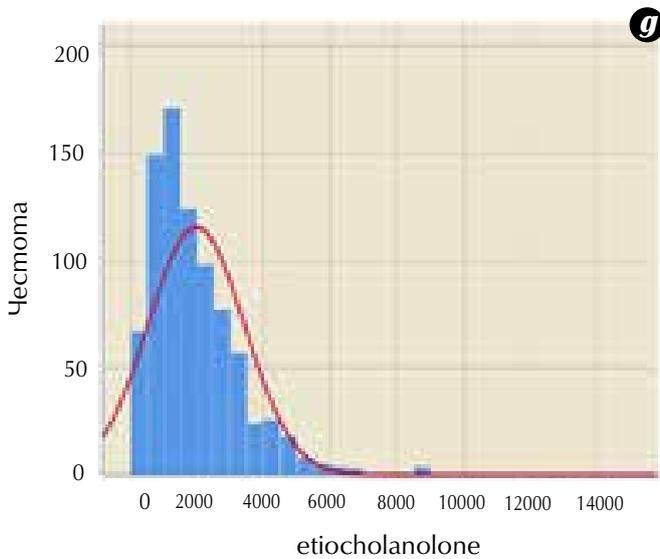
Разпределение на участниците в проучването по полова принадлежност.



Фигура 2.

Честотно разпределение на мъжете по 5 α -androstanediol, p<0,001 (а); 5 α -androstanediol, p<0,001 (б); androsterone, p<0,001 (в); epitestosterone, p<0,001 (г); etiocholanolone, p<0,001 (д); T/epiT, p<0,001 (е); testosterone, p<0,001 (ж).

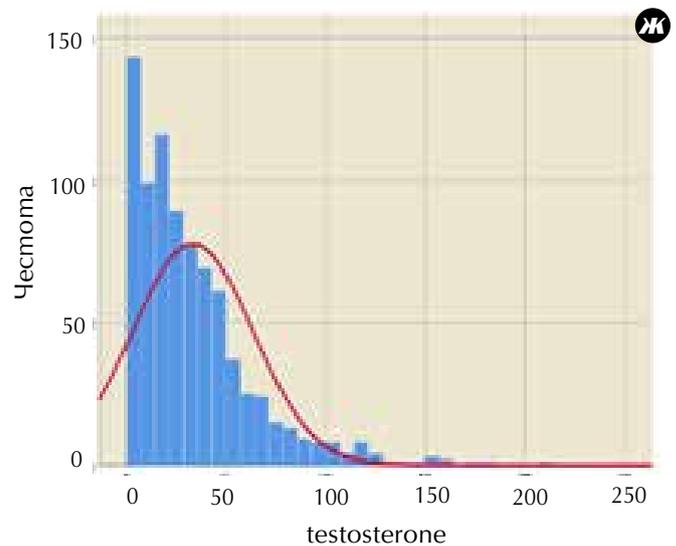




Резултати

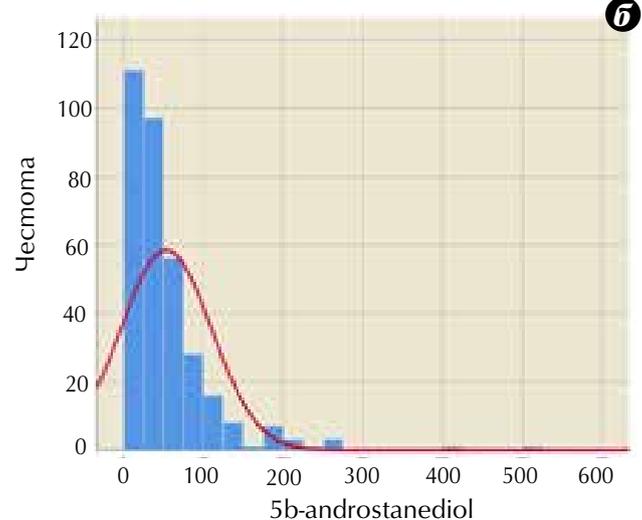
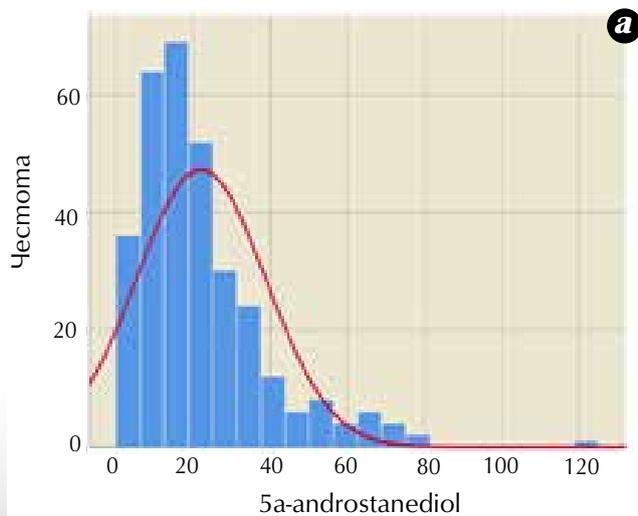
За времето 2016-2017 г. е извършено определяне на „стероиден профил“ при 1189 клинично здрави и спортуващи в свободното време лица на възраст 16-30 г. - 840 (70.6%) мъже и 349 (29,4%) жени (Фиг. 1).

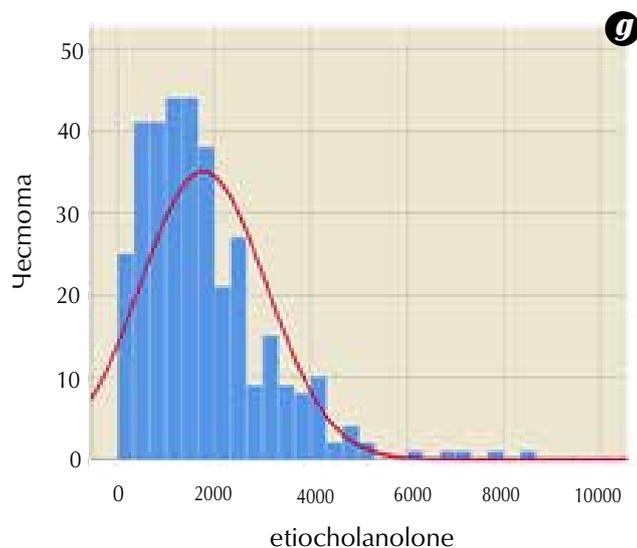
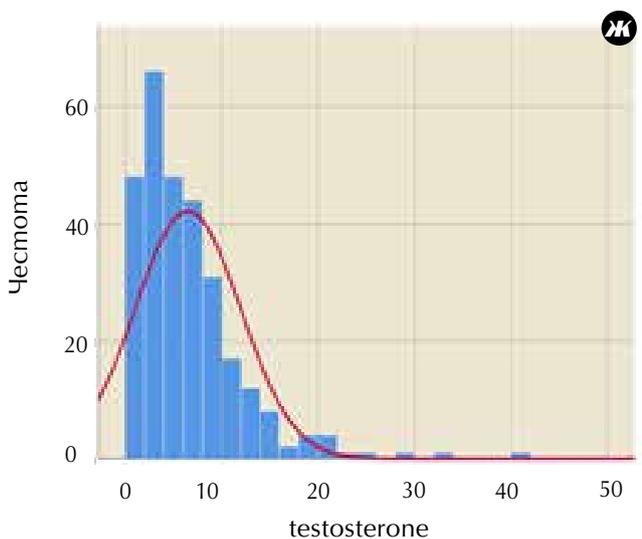
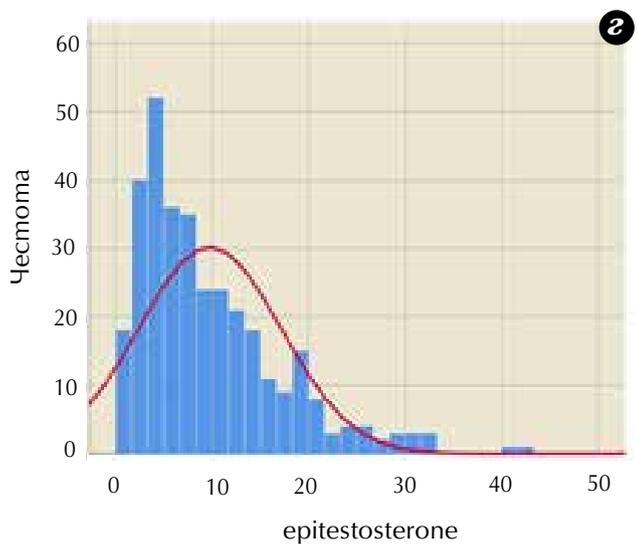
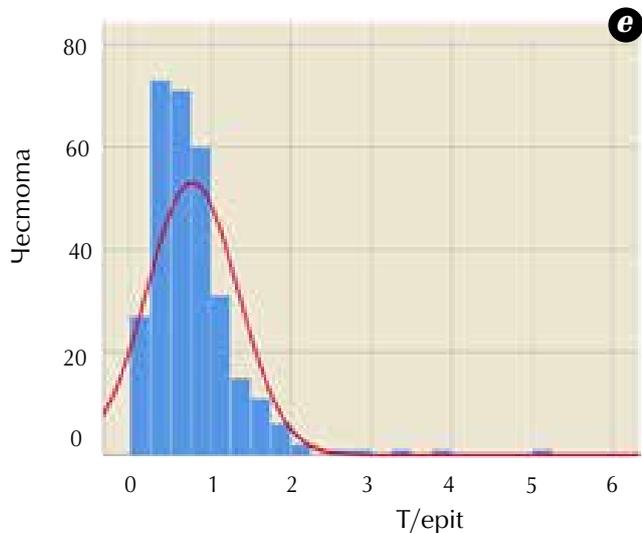
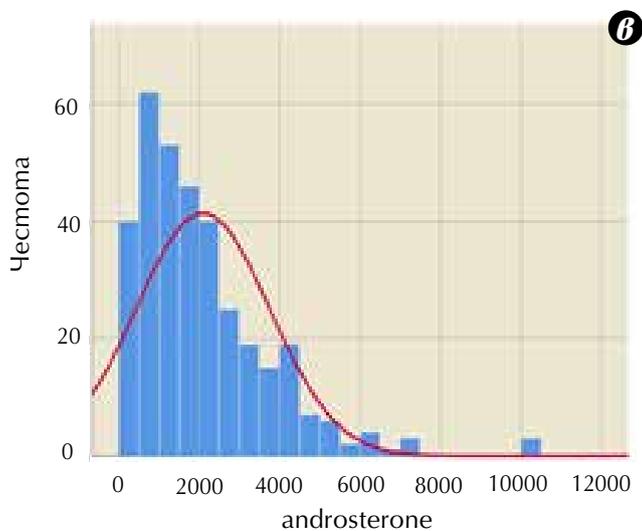
Предварителният анализ на данните показва, че има множество стойности (-1) и (-2), които се налага да бъдат отстранени от извадката.



Фигура 3.

Честотно разпределение на жените по 5a-androstanediol, $p < 0.001$ (а); 5b-androstanediol, $p < 0.001$ (б); androsterone, $p < 0.001$ (в); epitestosterone, $p < 0.001$ (з); etiocholanolone, $p < 0.001$ (г); T/epiT, $p < 0.001$ (е); testosterone, $p < 0.001$ (ж).





Изчисляването на референтните стойности се осъществява по два способа – параметричен и непараметричен. Статистически по-достовоерен е параметричният метод, изискващ нормално разпределение. Проведеният анализ (графически изчислителен – тест на Колмогоров-Смирнов) показва, че при нито един от изследваните показатели няма нормално разпределение (Фиг. 2 и Фиг. 3).

В Таблица 1, поотделно за двата пола са представени намерените референтни стойности за 2,5^{-ия} и 97,5^{-ия} персентил, както и границите на 95% доверителен интервал (ДИ) на тези стойности. При почти всички признаци и за двата пола бяха използвани резултатите от подобрения непараметричния метод на програмата Refval v.4.11. Единствено при показателя Т/еріТ при жените се постигна нормализиране на разпределението и при него бе приложен параметричния способ.

Таблица 1. Референтни стойности на показателите 5 α -diol, 5 β -diol, А, еріТ, Etio, Т/еріТ и Т за двата пола.

Показател	Пол	Персентили	Референтни стойности	95% ДИ	
				Долна граница	Горна граница
5 α -androstanediol (ng/mL)	Мъже	0,025	9,630	7,774	11,400
		0,975	173,450	158,200	197,200
	Жени	0,025	2,504	1,708	3,950
		0,975	67,118	60,092	71,932
5 β -androstanediol (ng/mL)	Мъже	0,025	13,570	11,650	16,318
		0,975	504,700	478,556	564,700
	Жени	0,025	5,070	3,225	6,315
		0,975	206,150	176,455	259,699
Androsterone (ng/mL)	Мъже	0,025	427,130	339,781	584,728
		0,975	7481,750	6970,875	8340,000
	Жени	0,025	214,995	168,726	317,158
		0,975	6338,546	5205,053	7244,645
Etiocholanolone (ng/mL)	Мъже	0,025	280,900	230,676	357,236
		0,975	5439,184	4832,168	6228,000
	Жени	0,025	173,560	123,705	261,362
		0,975	4865,412	4246,000	6742,000
Testosterone (ng/mL)	Мъже	0,025	1,570	1,332	2,138
		0,975	118,295	103,298	125,800
	Жени	0,025	0,742	0,660	0,882
		0,975	21,401	17,696	24,264
Epi-testosterone (ng/mL)	Мъже	0,025	3,420	2,874	4,173
		0,975	95,540	86,132	107,686
	Жени	0,025	1,274	1,110	1,490
		0,975	29,505	26,336	32,084
Т/еріТ	Мъже	0,025	0,073	0,064	0,081
		0,975	4,234	4,003	4,585
	Жени	0,025	0,109	0,062	0,158
		0,975	1,994	1,725	2,354

ДИ – доверителен интервал.

Решението на проблема с липсата на нормалност на честотното разпределение на емпиричните данни е възможно чрез използване на математически техники за неговото нормализиране. Проблемът с екстремните стойности се решава с тяхното отстраняване. И двете опции са налице в считаната за стандарт в областта на клиничната лаборатория програма Refval. В приложената в настоящото проучване версия на тази програма Refval v.4.11, допълнително има разработен подобрен вариант на непараметрично определяне на референтните граници, в случаите когато разпределението на емпиричните данни не може да бъде приведено към нормалното. Това се наложи при 13 от общо 14 случая.

Обсъждане

Измерването на нивата на андрогенните стероиди в урината е диагностичен метод, използван в клиничната ендокринология за диагностициране на ензимни дефекти в стероидогенезата. В областта на антидопинговата стратегия, уринният стероиден профил служи за откриване на злоупотреба със забранени в спорта субстанции. Анаболните андрогенни стероиди са най-злоупотребяваният клас забранени вещества, като тестостеронът, синтезиран и пречистен първо от Leopold Ruzicka и Adolf Butenandt през 1935 г. (22, 23), понастоящем има водеща роля при положителните за допинг случаи. В началото на 90-те години на миналия век, появата на пазара на някои ендогенни стероиди (в т.ч. дехидроепиандростерон, 4-андростендион, дихидротестостерон и 5-андростендиол) като хранителни добавки улесни достъпа до тези про-хормони по различни способы. Доказването на злоупотреба с тестостерон е проблематично, тъй като синтетичният тестостерон е неразличим от ендогенния чрез прилагане на рутинни скринингови методи като газова хроматография – мас спектрометрия. Метаболизмът на тестостерона и на про-хормоните индуцира промени в плазмените и уринните концентрации на самия тестостерон, както и на неговите метаболити (1, 2, 24).

Определянето на гранична (cut-off) стойност за тестостерон в урината, обаче, не е достатъчно информативен метод за детекция на екзогенен внос, защото се наблюдават големи интер- и интра-индивидуални вариации в уринните му концентрации. Например, в нашата извадка при мъжете тестостеронът в уринните проби варира от 1,570 (95% ДИ: 1,332-2,138) ng/mL до 118,295 (95% ДИ: 103,298-125,800) ng/mL,

а при жените – от 0,742 (95% ДИ: 0,660-0,882) ng/mL до 21,041 (95% ДИ: 17,696-24,264) ng/mL. В Ламуно-американска популация в проучване на Martínez-Brito D. и сътр., при мъжете референтният интервал е 4-181 ng/mL, а при жените – 2-54 ng/mL (10). В Анти-допинговата лаборатория в Катар, измерените стойности за 97,5 перцентил на тестостерон са доста сходни с нашите – при мъжете са 113 (95% ДИ: 102-128) ng/mL, а при жените – 29 (95% ДИ: 21-39) ng/mL (25). Дизайнът и методите на изследване и статистически анализ на цитираното популационно проучване на Saad K. и сътр. (25) за установяване на референтни стойности за ендогенни стероиди са сходни с нашите.

През 80-те години на миналия век беше открито, че употребата на тестостерон променя съотношението на тестостерон глюкуронид към епитестостерон глюкуронид (T/E₁T) в урината (26). Епитестостеронът е естествено срещан се биологично неактивен епимер на тестостерона, който остава относително постоянен в урината. Първоначално, на база популационни изследвания, е предложена гранична стойност 6,0 за отношението T/E₁T като маркер за употреба на синтетичен тестостерон. През 2004 г. (TD2004EAAS), тази гранична стойност е занижена до 4,0. Според данните от няколко лаборатории, средното съотношение T/E₁T варира от 0,9 до 1,6 за здрави юноши и мъже. В Олимпийската аналитична лаборатория на Университета в Калифорния, Лос Анжелис (UCLA) е установено, че средното съотношение T/E₁T е 1,1 (средно 0,9), като в приблизително 99,6% от уринните проби е <4,0, а в 99,8% е <6,0 (5).

От повече от десетилетие е известно, че съотношението T/E₁T в урината е значително по-ниско при определени етнически групи. Това наблюдение е ограничило ефективността на популационно базираните му гранични стойности като скринингов тест за употреба на тестостерон. Така, в сравнение с данните при Кавказка раса, при азиатска популация мъже стойностите на съотношението са намерени по-ниски (27).

Циркулиращите концентрации на стероидните хормони се контролират от субфамилия на уридин дифосфо (UDP)-глюкуронозил трансферазите – UDP-глюкуронозил трансфераза 2B (UGT2B), улесняваща отделянето на стероидите с урината чрез реакции на глюкуронизация, които правят стероидните молекули по-хидрофилни. UGT2B17 е основният ензим от субфамилията UGT2B, който конюгира глюкуронид към тестостерона, дихидротестостерона и андростерона в черния дроб и тъканите. Лица, хомозиготни за делеция на UGT2B17 гена (del/del) нямат или са

с незначителни количества тестостерон глюкуронид в урината, докато екскрецията на двата основни тестостеронови метаболита, андростерон глюкуронид и етиохолаболон глюкуронид, е малко по-ниска или сходна на тази при лицата с един (ins/del) или два (ins/ins) алела на гена UGT2B17. UGT2B17 полиморфизмът не е свързан с вариации в серумните концентрации на тестостерон (27). Допълнителни проучвания разкриват, че големите разлики в концентрациите на тестостерон в урината в различни популационни проучвания са свързани именно с делеционния полиморфизъм на UGT2B17 гена (27, 28).

Установено е, че честотата на обичайния делеционен полиморфизъм на UGT2B17 гена се различава между етническите групи – по-често срещан е при азиатци и при бялата раса, отколкото при афро-американците (19). Според сравнителното проучване на Jacobson и сътр., мъже, хомозиготни за полиморфизма с UGT2B17 делеция, имат изключително ниски до неоткриваеми концентрации на тестостерон в урината и този генотип е 7 пъти по-често срещан при мъжете в Корея (66,7%) отколкото в Швеция (9,3%). Концентрациите на епитестостерон са сходни при 2-те етнически групи, независимо дали имат ниски или високи концентрации на тестостерон в урината (27).

За по-добро анализиране на съотношението T/E₁₇ на базата на генотипизиране, Schulze и сътр. (28) идентифицира мъже с 2 (ins/ins), 1 (ins/del), или 0 (del/del) копия на UGT2B17 гена и изследва стероидните им профили в урината след i.m. инжекция на тестостерон енантат. Очаквано, базалните концентрации на тестостерон в урината и T/E₁₇ са значимо по-ниски за групата del/del. Средните стойности на T/E₁₇ са съответно 0,14; 1,4 и 2,3 за del/del, ins/del и ins/ins групи, съответно. Базалните концентрации на епитестостерон не се различават между отделните групи. След прилагане на тестостерон, средната стойност за T/E₁₇ в групата del/del се увеличава до 5,3; при 40% от участниците, обаче, не достига до 4,0. За разлика от тази група, в ins/del и ins/ins групи средното съотношение T/E₁₇ нараства до 50,4 и 100, респективно. Концентрациите на епитестостерон в урината остават по-ниски във всички групи, но не се различават между отделните групи. Когато се приложат стандартите на WADA с гранична стойност 4,0 за T/E₁₇, 94% от участниците в групата del/del имат фалшиво отрицателен резултат на 2-ри ген, 41% – на 6-ти ген и 71% на 11-ти ген след прилагането на тестостерон. Генотип-специфична гранична стойност 1.0 за T/E₁₇ при del/del лица дава фал-

шиво отрицателен резултат в 43% от случаите на 2-ри ген и елиминира всички фалшиво отрицателни резултати на 6-ти и 11-ти ген (28). Тези резултати показват, че генотип-специфични гранични стойности могат да повишат ефективността на тестването на съотношението T/E₁₇. За съжаление, понастоящем е трудно и скъпо лабораториите да включат генетични анализи в своите рутинни тестови процедури и да скринират всеки спортист за делеции в UGT2B17 гена. Алтернативен подход е да се използва ниското съотношение T/E₁₇ в урината <0,2 като маркер на del/del полиморфизма. Това, обаче, би било проблематично, тъй като погрешно би класифицирало спортисти, злоупотребили с комбинация от тестостерон и епитестостерон (за понижаване стойността на T/E₁₇), като носители на del/del полиморфизъм. В тези случаи се изисква или генотипизиране, или други тестове за откриване на допинг с епитестостерон, например съотношението на епитестостерона към 5-андростен-3 β ,17 α -диол (29) или 13C/12C изотопно съотношение на епитестостерон (30).

В нашата страна не е провеждано проучване за честотата на UGT2B17 делеционния полиморфизъм. Предполага се, че честота при българска популация е относително по-ниска, приближаваща се към съобщаваната в проучвания при Кавказката раса. Референтният обхват на T/E₁₇ за мъжете в настоящата репрезентативна извадка е от 0,073 (95% ДИ 0,064-0,081) до 4,234 (95% ДИ 4,003-4,585), а за жените – от 0,109 (95% ДИ 0,062-0,158) до 1,994 (95% ДИ 1,725-2,354). Може да се спекулира, че лицата с по-ниските стойности са носители на делеционния полиморфизъм на UGT2B17 гена. В проучването на Martínez-Brito D. и сътр., при мъжете референтният интервал на T/E₁₇ е 0,09-5,62, а при жените – 0,12-3,76 – долните граници са сходни, но горните са по-високи (10).

Генотипно-специфичните гранични стойности на съотношението T/E₁₇ биха били особено полезни, когато установяват индивидуални базални стойности. Концепцията се основава на наблюдението, че съотношението T/E₁₇ при един индивид обикновено варира под 30%, докато вариабилността между отделните индивиди е значително по-голяма. Индивидуалните резултати за T/E₁₇ от най-малко 3 теста се използват за установяване на базална стойност, а резултати, които се различават значително от последната, са доказателство за използване на синтетичен тестостерон. Този подход може да бъде използван за откриване на употреба на тестостерон при лица с делеционен полиморфизъм на UGT2B17 гена и да доведе до отпадане на

необходимостта от генетично изследване. Наличието на норми за българска популация мъже и жени на най-експлоатираното съотношение на анаболните стероиди в урината ще спомогне и по отношение позиционирането на индивидуалните базални стойности при спортисти.

Що касае другите андрогенни стероиди – андростерон, етиохоланолон, 5 α -и 5 β -андростандиол, намерените от нас референтни стойности за двата пола могат да бъдат сравнени с други проучвания при отделни етноси и проведени в различни лаборатории, използващи газова хроматография-мас-спектрометрия за анализ на уринните проби според стандартите на WADA.

В заключение, установените национални норми за андрогенни стероиди в урината при репрезентативна популационна извадка мъже и жени във възрастта 16-18 години ще служат най-вече

за целите на биологичните паспорти на спортистите и контрола върху злоупотребата с екзогенни анаболни стероиди въз основа на индивидуалните стероидни профили – базални и при проследяване по време на и извън състезания. Но, референтните граници на стероидите могат да служат и като база за откриване на ендогенна патология – ензимни дефекти в стероидогенезата, андроген-продуциращи тумори, различни хиперандрогенни състояния при жени и други ендокринно-обменни заболявания, които създават затруднения в клиничната практика. Проучванията могат да бъдат разширени с определяне на норми за други съотношения между отделните стероиди, които са информативни за екзогенен внос на стероиди или ендогенни нарушения; извършване на сравнителни статистически анализи със сходни популационни проучвания при други етноси.

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

Assessment of Referent Values of Androgenic Steroids in Urine of Bulgarian Population at 16-30 Years of Age

Sheytanova, Tanya Z.¹, Zarkova, Violeta L.¹, Orbetzova, Maria M.², Genchev, Gencho D.³

¹ Doping Control Laboratory, Antidoping Centre

² Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases, „Sveti Georgy“ University Hospital, Department of Endocrinology, Medical Faculty, Medical University, Plovdiv

³ Department of Healthcare Economics, Faculty of General Healthcare, Medical University, Sofia

Address for correspondence:

Prof. Dr. Maria Orbetzova
Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases,
„Sveti Georgy“ University Hospital
15A „V. Aprilov“ Str., 4000 Plovdiv, Bulgaria
e-mail: morbetzova@abv.bg

Received: 24. 05. 2020

Accepted: 02. 06. 2020

Abstract

Androgenic steroids are widely spread amongst athletes and their use in different forms is a major problem in the contemporary world of sports. The Program of the World Anti-Doping Agency (WADA) for biological passports for athletes introduces a standardized module (so-called „steroid profile“) for each athlete, which allows the identification of exogenously taken anabolic androgenic steroids (EAAS) on the Prohibited List. It has been proved that the steroid profile depends on sex, age, physical activity, diet and ethnicity.

Aim: Determination of the referent values of steroids in the urine of a representative excerpt of a Bulgarian population of clinically healthy men and women 16-30 years old, sporting in their free time, with a view to establishing national norms of „steroid profile“ indices.

Materials and Methods: The study was carried out in the period 2016-2017 and involved 1189 persons (840 males – 70,6%; 349 females – 29,4%), 16-30 years old, clinically healthy and recreationally sporting. Geographically, the groups of participants are uniformly distributed within the country. In the urine samples, the following indices have been recorded: testosterone (T), epitestosterone (EpiT) and their ratio (T/EpiT), androsterone (A), etiocholanolone (Etio), 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol (5 α -diol), 5 β -androstane-3 α ,17 β -diol (5 β -diol). Gas-chromatography with mass-spectrometry was used to qualitatively assess the steroids.

Results: The referent values of T, EpiT, T/EpiT, A, Etio, 5 α -diol, 5 β -diol have been determined. The range of 2,5-97,5 percentile with 95% confidence interval (CI) of the examined steroid profile components of the both sexes was separately presented.

Conclusion: The created national database of the steroid-profile indices would be used to compare the individual results of the „biological passport“ of the young generation of Bulgarian athletes, as well as for their prolonged follow-up in- and out-of-competition, in order to eliminate wrong interpretations of deviations that may occur

Key words: anabolic androgenic steroids; Program of athletes' biologic passports; steroid profile; referent values; gas-chromatography with mass-spectrometry.

Introduction

Anabolic androgenic steroids are widely spread amongst athletes and their use in different forms is a major problem in the contemporary world of sports (1, 2). The determination of the origin of the anabolic steroids – endogenous (physiological) or exogenous (pharmaceutical), is complex in that, in addition to their biological effects, these substances are a popular instrument for the enhancement of physical performance and results in sport. (3). The official ban on their use in sport requires strong efforts and resources for the development of universal screening strategies for proving their presence. In the fight against doping in sport and providing uniformity in doping control, an independent international organization – the World Anti-Doping Agency (WADA) was established in 1999. Despite achieving good results, presently the discovery of the deviations in the urine concentrations of the endogenous steroids, due to exogenous introduction, continues to be one of the greatest challenges facing the WADA-accredited anti-doping laboratories.

The term „Athlete’s Biological Passport“ was suggested for the first time at the beginning of 2000 by scientific units, which identify selected hematologic indices (blood doping markers) as a tool for the determination of an individual hematologic profile. After its establishment, WADA has launched activities to fully develop, harmonize and validate this concept. As a result of these activities, official operative guidelines and mandatory standards, known as the Program of Athlete’s Biological Passport, were published for the first time in 2009 (4). These standards for the preparation of biological passports do not replace the application of the traditional analytical methods for testing of certain indices, but rather add to the methods with a view to elaboration and reinforcement of the anti-doping strategies as a whole.

Within the Program framework, a standardized method for uncovering the misuse of androgenic steroids via the study of certain indices in urine samples is also included. The steroid module (so called „steroid profile“) aims to identify endogenous anabolic androgenic steroids (EAAS), when exogenous and other anabolic agents (substances) on the Prohibited List have been administered. In 2014, the ABP steroid module was introduced and the laboratory methods match the requirements of WADA’s TD2014EAAS (5).

In the WADA Program, the steroid profile is defined as a totality of known endogenous substances, structurally linked to testosterone, its biosynthetic precursors and metabolites, used in the anti-doping protocols for a follow-up of the administration of anabolic androgenic steroids. In the steroid profile, the following markers are included: 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol

(5 α -diol); 5 β - androstane-3 α ,17 β -diol (5 β -diol); androsterone (A); etiocholanolone (Etio); testosterone (T); epitestosterone (EpiT) and their ratio (T/EpiT) (4). WADA recommends referent limits for the concentrations of the indices of the urine steroid profile and some ratios between them, which are markers for the use of testosterone and its precursors (5). Hence, urine concentrations of T or EpiT higher than 200 ng/ml, or of A or Etio higher than 10000 ng/ml, or T/EpiT over 4, are generally accepted as atypical deviations (5).

It has been proved that the steroid profile is affected by sex, age, physical activity, diet and ethnicity (6-8). The last fact is exceptionally important, since data about differences in the referent range of key steroid indices, between both different ethnic populations and distinct laboratories, are accumulated in the literature (9). As an example, the concentrations of T, epiT, A, Etio, DHEA, 5 α -diol u 5 β -diol in the Latin-American population are 1,6-1,9 higher than those in the Caucasian population (10). Besides, significant variations are found in the expression of the enzyme uridine diphosphate (UDP)-glucuronosyltransferase 2B17 (UGT2B17), which has an important role in the testosterone metabolism in people (it catalyzes the transfer of the UDP-glucuronic acid to testosterone molecule, in order to increase its renal excretion) (11, 12), both intra-population and between populations, due to the diverse distribution of the polymorphism with deletion of the UGT2B17 gene (13). Persons with UGT2B17 deletion(s) have higher serum levels of T (by 15%) and lower excretion of T in urine (by ~ 90%) (15-17). Additionally, the UGT2B17 deletion is linked to a lower T/EpiT ratio, which is a routine marker for testosterone-misuse uncovering at doping control (18, 19). The establishment of our own national referent ranges of the steroid-profile components would differentiate the ethnic variations.

The present study was aimed at determining the referent values of urine steroids in a representative excerpt of the Bulgarian population of clinically healthy males and females aged 16-30 years, recreationally sporting (in their free time), with the view of establishing national norms of the steroid profile indices. Based on reliable statistical analyses, this national database would be useful for comparison of the individual results of the „biological passport“ of the young generation Bulgarian athletes, and also for a long-lasting follow-up of the steroid profile in- and out-of-competition, in order to eliminate wrong interpretations of established deviations. „Fair Play“ and the protection of the health of athletes are the basic principles of the National Anti-doping Program in Bulgaria.

Material and Methods

The study was carried out in the period 2016-2017 and involved 1189 persons (840 males – 70.6%; 349 females – 29.4%), 16-30 years old, clinically healthy and non-professionally (recreationally) sporting in their free time. As a total number of the target age-interval, this excerpt matches the representability requirements. The necessary number of cases guaranteeing maximal statistical error not-greater than 3%, of the Bulgarian population in the age range 16-30 years, is 1067, based on the data for the quoted period of the National Statistics Institute (20).

The participants in the study complied with the following inclusion criteria: recreational sporting; free-diet regimen without purposive diets limiting calories and the intake of certain nutrients; lack of acute and clinically important chronic diseases; lack of use of medications and nutritional supplements that could affect steroid-hormones levels and metabolism not less than 3 months prior to the enrolment in the investigation. Geographically, the groups of participants are uniformly distributed throughout the country.

The samples were collected in compliance with the requirements of the WADA International Standard for Testing and Investigations (21) and were analyzed in the Doping Control Laboratory of the Antidoping Centre of the Ministry of Youth and Sports. Urine samples with low specific gravity <1,004 were not analyzed. Urine samples with established bacterial contamination were not used. In all other samples, the obtained steroid concentrations were corrected to specific gravity 1.020 (TD2014EAAS). The following indices were analyzed: testosterone (T); epitestosterone (EpiT) and their ratio (T/EpiT); androsterone (A); etiocholanolone (EtiO); 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol (5 α -diol); 5 β -androstane-3 α ,17 β -diol (5 β -diol).

Description of the laboratory settings:

Gas-chromatography with mass-spectrometry (GC/MS) was used to qualitatively assess the steroids after hydrolysis, liquid-liquid extraction and derivatization (TD2014EAAS). One mL of urine was hydrolysed with β -Glucuronidase (E. coli K 12) at pH=7,50 oC for 1 h. Afterwards, liquid-liquid extraction (LLE) with tertiary-butyl-methyl ester (t-BME) was performed at pH 9,6. The separated organic phase was evaporated to dry, dehydrated at vacuum and derivatized with 50 μ l MSTFA/NH₄I/2-ME (500:1:3). d5-Etiocholanolone, d3-Epitestosterone and d3-Testosterone were used as internal standards (ISTD).

Chromatograph separation and quantification

The samples were analyzed by gas-chromatograph with mass-selective detector Agilent Technologies

7890A/5975C. A gas-chromatograph column Agilent DB-1MS (20 m x 0,180 μ m x 0,18 μ m) – 100% Dimethylpolysiloxane, was used. The injection volume for all samples was 3 times 2 μ l. The temperature gradient of the oven begins at 190 °C and a hold of 3 min, then heated to 218 °C by a step of 2 °C/min and a 3-minute hold. The second gradient step is an increase by a step of 2 °C/min up to 230 °C, without any retention. The third gradient step is of 20 °C/min up to 300 °C, with a hold of 6 min. Helium at a flow rate of 1 mL/min was used as the carrier gas. The operation mode of the detector was SIM, in case of ionization with electron impact (70 eV).

Detected compounds were Androsterone (m/z 434), Etiocholanolone (m/z 434), 5 α -Androstane-3 α ,17 β -diol (m/z 436), 5 β -Androstane-3 α ,17 β -diol (m/z 436), Epitestosterone (m/z 432), Testosterone (m/z 432), d5-Etiocholanolone (m/z 439), d3-Epitestosterone (m/z 435), d3-Testosterone (m/z 435). A 5-level calibration curve was used to quantify the compounds.

Statistical analysis: The data were set up and processed via the Refval v.4.11 program, considered to be the laboratory standard. After removal of the extremal values, the distribution type was determined and, if not normal, it was converted to normal via mathematical techniques. Afterwards, the referent values were assessed via the parametric method. In the cases where the distribution of the empirical data could not be converted to normal, an improved variant of non-parametric determination of the referent limits was used.

Results

For the period 2016-2017, the „steroid profile“ has been determined at 1189 clinically healthy and recreationally sporting persons 16-30 years old, 840 (70,6%) males and 349 (29,4%) females (Fig. 1).

Preliminary data analysis revealed that there are a number of values (-1) and (-2), which have to be removed from the excerpt. The calculation of the referent values was accomplished by using two methods – parametric and non-parametric. The parametric method is statistically more reliable, but it requires a normal distribution. The analysis done (graphic and computing – Kolmogorov-Smirnov test) have shown that none of the investigated indices has a normal distribution (Fig. 2 and Fig. 3).

Another obstacle for the reliable calculation of the referent limits are the values referred to as extremal values. The performed analysis revealed that participants of both sexes have a number of such values at all indices.

Figure 1.

Sex distribution of the study participants.

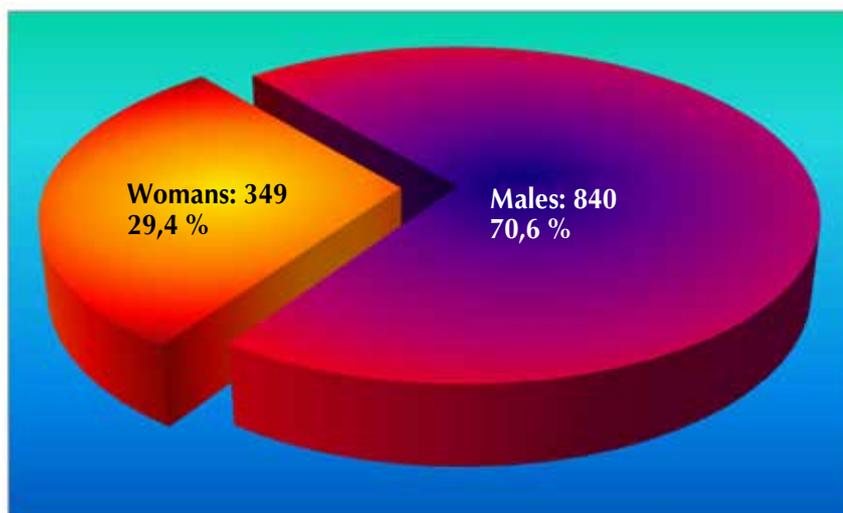
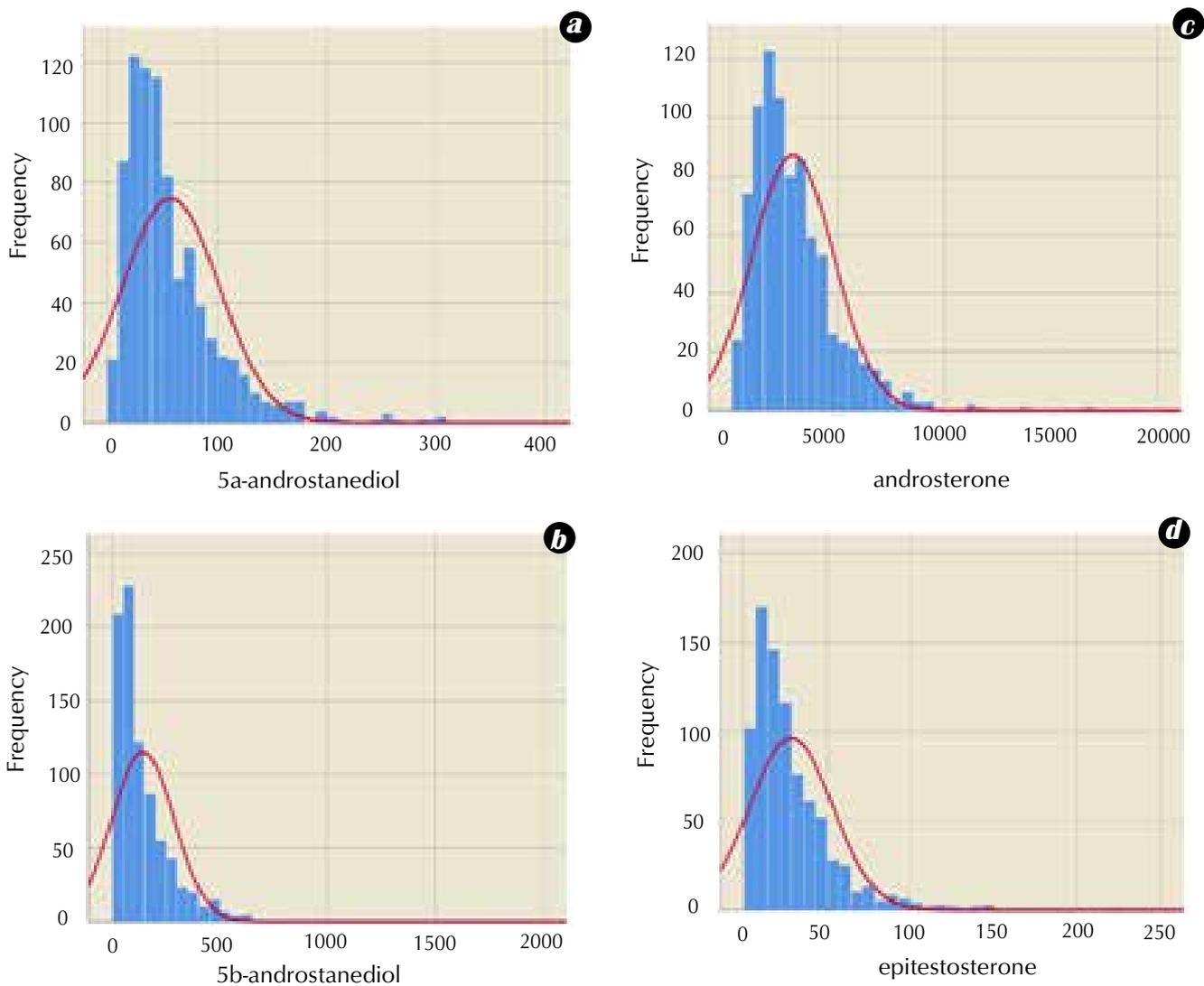
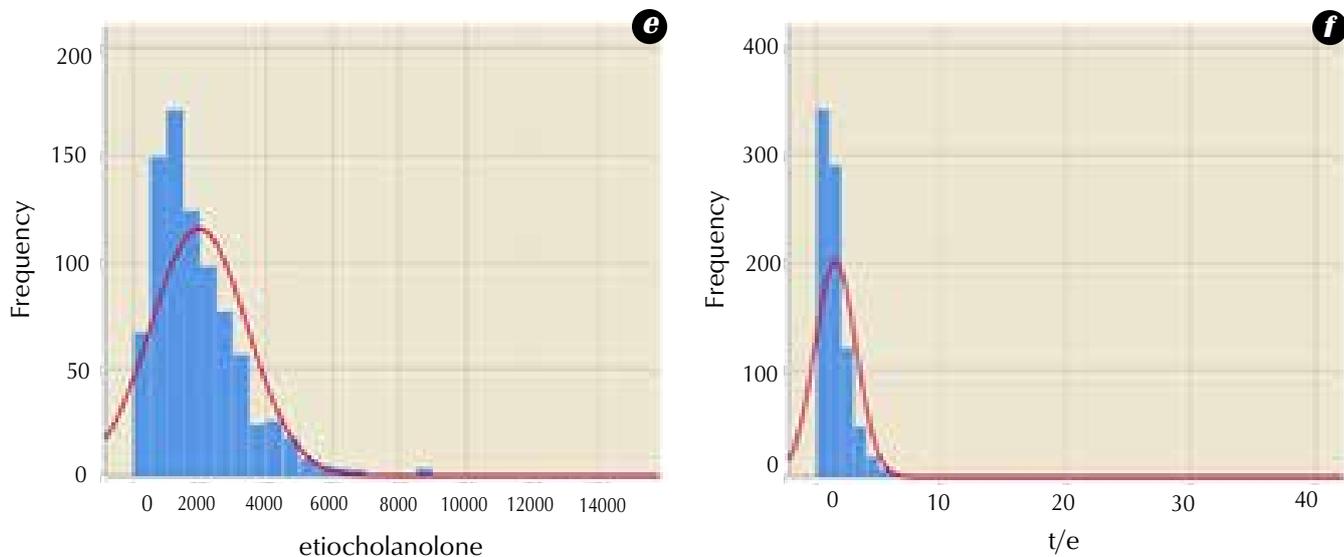


Figure 2.

Frequency distribution of male participants by 5 α -androstanediol, $p < 0,001$ (a); 5 α -androstanediol, $p < 0,001$ (b); androsterone, $p < 0,001$ (c); epitestosterone, $p < 0,001$ (d); etiocholanolone, $p < 0,001$ (e); T/epiT, $p < 0,001$ (f); testosterone, $p < 0,001$ (g).





The solution to the problem about the lack of normality of the empiric-data frequency distribution is possible via the use of mathematical techniques for its normalization. The problem of the extremal values is resolved with their removal. Both options are present in the Revfal programme that is considered to be the clinical laboratory standard. In this study, we have applied Revfal v. 4.11, a version in which an improved variant for non-parametric determination of the referent limits has been additionally developed, for cases where the empiric-data distribution could not be adjusted to the normal. This had to be imposed in 13 cases, out of 14 cases totally.

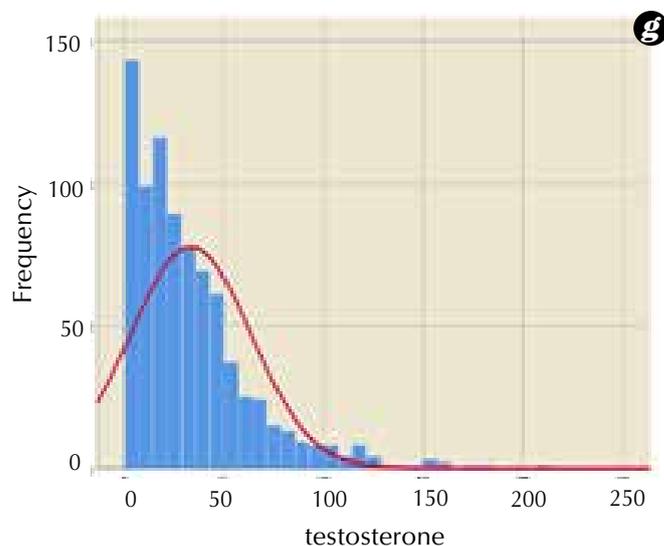
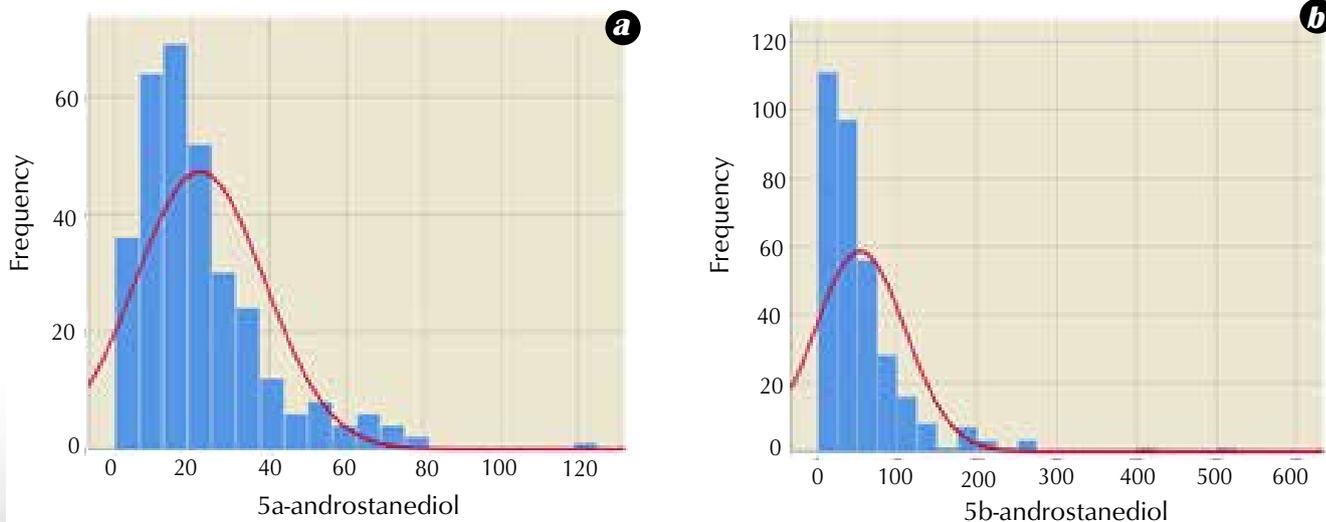
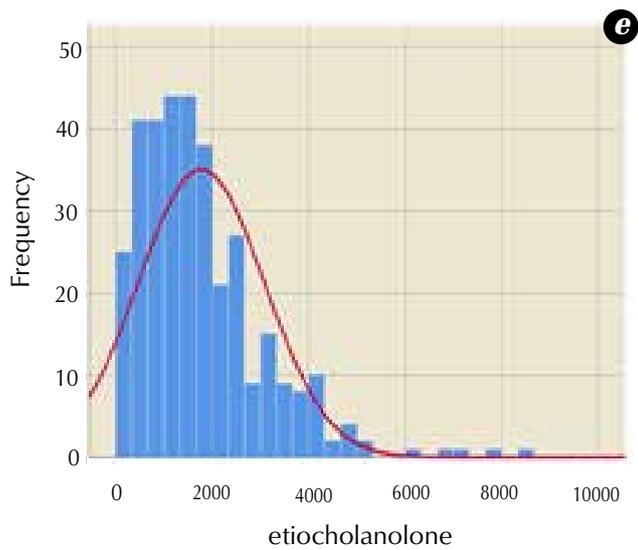
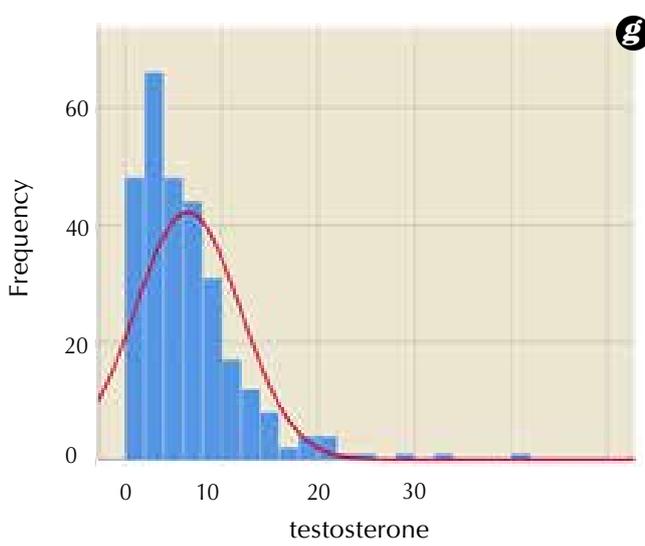
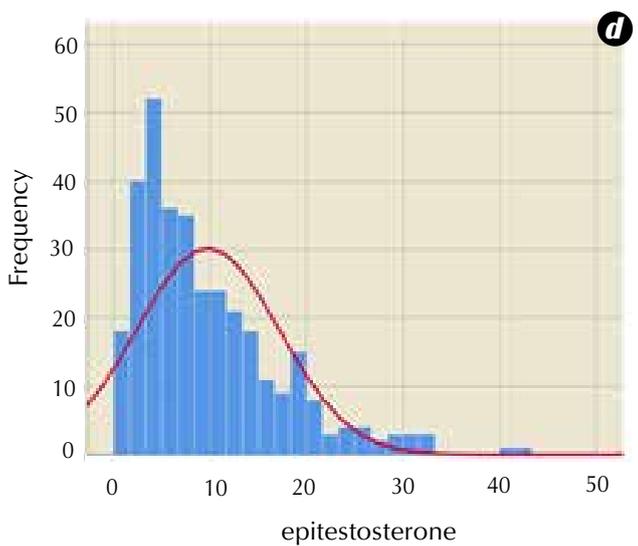
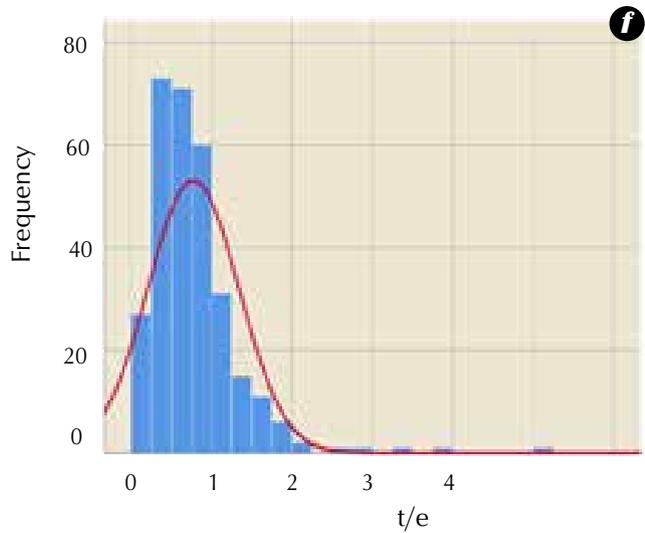
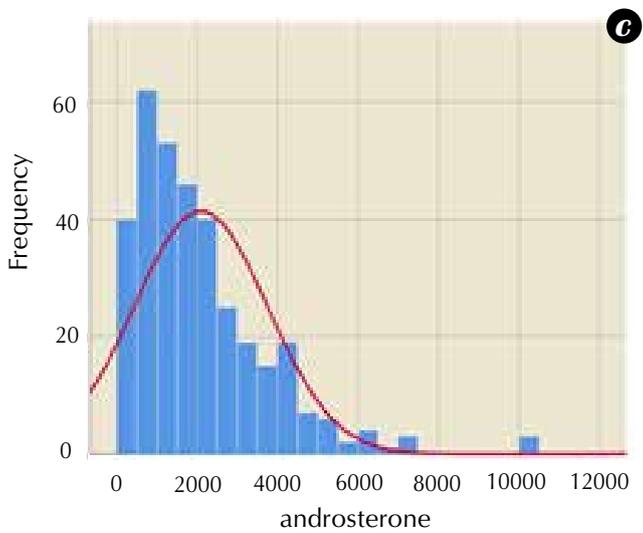


Figure 3.

Frequency distribution of female participants by 5 α -androstanediol, $p < 0,001$ (a); 5 β -androstanediol, $p < 0,001$ (b); androsterone, $p < 0,001$ (c); epitestosterone, $p < 0,001$ (d); etiocholanolone, $p < 0,001$ (e); T/epiT, $p < 0,001$ (f); testosterone, $p < 0,001$ (g).





In Table 1, the referent values for the 2,5 and 97,5 percentiles, as well as the limits of 95% confidence interval (CI) of these values, are presented separately for the both sexes. At nearly all indices for both sexes, the results of the improved non-parametric method of the program Refval 4.11 have been used. Only at the T/epiT index of the females, distribution normalization has been attained, and the parametric method has been applied to it.

Table 1. Referent values of the indices 5 α -diol, 5 β -diol, A, Etio, T, epiT, and T/epiT for the both sexes.

Index	Sex	Percentile	Referent values	95% CI	
				Lower limit	Upper limit
5 α -androstanediol (ng/mL)	Male	0,025	9,630	7,774	11,400
		0,975	173,450	158,200	197,200
	Female	0,025	2,504	1,708	3,950
		0,975	67,118	60,092	71,932
5 β -androstanediol (ng/mL)	Male	0,025	13,570	11,650	16,318
		0,975	504,700	478,556	564,700
	Female	0,025	5,070	3,225	6,315
		0,975	206,150	176,455	259,699
Androsterone (ng/mL)	Male	0,025	427,130	339,781	584,728
		0,975	7481,750	6970,875	8340,000
	Female	0,025	214,995	168,726	317,158
		0,975	6338,546	5205,053	7244,645
Etiocolanolone (ng/mL)	Male	0,025	280,900	230,676	357,236
		0,975	5439,184	4832,168	6228,000
	Female	0,025	173,560	123,705	261,362
		0,975	4865,412	4246,000	6742,000
Testosterone (ng/mL)	Male	0,025	1,570	1,332	2,138
		0,975	118,295	103,298	125,800
	Female	0,025	0,742	0,660	0,882
		0,975	21,401	17,696	24,264
Epitestosterone (ng/mL)	Male	0,025	3,420	2,874	4,173
		0,975	95,540	86,132	107,686
	Female	0,025	1,274	1,110	1,490
		0,975	29,505	26,336	32,084
T/epiT	Male	0,025	0,073	0,064	0,081
		0,975	4,234	4,003	4,585
	Female	0,025	0,109	0,062	0,158
		0,975	1,994	1,725	2,354

CI – Confidence Interval

Discussion

Measurement of the androgenic-steroids levels in urine is a diagnostic method, used in clinical endocrinology for the diagnosis of enzyme defects in steroidogenesis. In the field of anti-doping strategy, the urine steroid profile serves for the uncovering of the misuse of substances prohibited in sport. Anabolic Androgenic Steroids are the most strongly misused class of banned substances. Testosterone, being first synthesized and purified by Leopold Ruzicka and Adolf Butenandt in 1935 (22, 23), presently has a leading role in doping-positive Adverse Analytical Findings. At the beginning of the 1990's certain endogenous steroids (including dehydroepiandrosterone, 4-androstenedione, dihydrotestosterone, and 5-androstenediol) were marketed as nutritional supplements, enabling access to these pro-hormones. Proving testosterone misuse is problematic, since synthetic testosterone is indistinguishable from the endogenous one by the application of routine screening methods like gas chromatography - mass spectrometry. The metabolism of testosterone and of pro-hormones induces changes in the plasma and urine concentrations of testosterone itself, as well as of its metabolites (1, 2, 24).

Nevertheless, the determination of the testosterone cut-off value in urine is not a sufficiently informative method for exogenous-input detection because large inter- and intra-individual variations in its urine concentrations are observed. As an example, in our excerpt, testosterone in urine samples of males varies from 1,570 (95% CI: 1,332-2,138) ng/mL to 118,295 (95% CI: 103,298-125,800) ng/mL, and of females - from 0,742 (95% CI: 0,660-0,882) ng/mL to 21,041 (95% CI: 17,696-24,264) ng/mL. In a study by Martínez-Brito D. et al. on a Latin-American population, the referent interval is 4-181 ng/mL in males and 2-54 ng/mL in females (10). In the Qatar Doping Control Laboratory, the testosterone measured values for 97,5 percentile are rather similar to our results - they are 113 (95% CI: 102-128) ng/mL at the males and 29 (95% CI: 21-39) ng/mL in females (25). The design and the methods of research and statistical analysis of the quoted population study of Saad K et al. (25) for determining the referent values of endogenous steroids are similar to ours.

In the 1980's, it was found that testosterone use changes the urine ratio of testosterone glucuronide to epitestosterone glucuronide (T/EpiT) (26). Epitestosterone is natural biologically inactive testosterone epimer, which remains relatively constant in the urine. Initially, on the basis of population studies, a limit value of 6,0 was suggested for T/EpiT ratio as a marker for synthetic-testosterone use. In 2004 (TD2004EAAS), this limit value was reduced to 4.0. According to the data from several laboratories, the mean T/EpiT ratio

for healthy youths and males varies from 0,9 to 1,6. In the Olympic Analytical Laboratory of the Californian University in Los Angeles (UCLA), it has been established that the mean T/EpiT ratio is 1,1 (mean 0,9), being < 4,0 in about 99,6% and < 6,0 in 99,8% of the urine samples (5).

It has been known for more than a decade that the T/EpiT ratio in urine is significantly lower in certain ethnic groups. This observation has limited the efficacy of population-based cut-off values of the ratio as a screening test for testosterone use. Thus, in the Asian male population the ratio values are found to be lower, compared to the data of the Caucasian race (27).

Steroid-hormones circulating concentrations are controlled by a subfamily of uridine diphosphate (UDP)-glucuronosyl transferases - UDP-glucuronosyl transferase 2B (UGT2B), which facilitates the steroids excretion with urine via glucuronisation reactions that make steroid molecules more hydrophilic. UGT2B17 is the basic enzyme of the UGT2B subfamily that conjugates a glucuronide to testosterone, dihydrotestosterone and androsterone in the liver and tissues. Individuals, homozygotes for deletion of the UGT2B17 gene (del/del), do not have or have insignificant quantities of testosterone glucuronide in urine, whereas the excretion of the two major testosterone metabolites androsterone glucuronide and etiocholanolone glucuronide is slightly lower or similar to that of persons with one (ins/del) or two (ins/ins) alleles of the UGT2B17 gene. The polymorphism of the latter is not related with variations of testosterone serum concentrations (27). Additional studies revealed that the great differences in testosterone urine concentrations in diverse population-investigations are related to the polymorphism of the UGT2B17 gene (27, 28).

It has been established that the frequency of the usual deletion polymorphism of the UGT2B17 gene differs among ethnic groups - it is more frequent in the Asiatic and Caucasian races than in Afro-Americans (19). According the comparative investigation of Jacobson et al., males, homozygote for the polymorphism with UGT2B17 deletion, have extremely low, up to undetectable, testosterone concentrations in urine; this genotype is 7 times more frequent in males in Korea (66,7%) than in Sweden (9,3%). The epitestosterone concentrations of the two ethnic groups are similar, independent of whether their testosterone concentrations in urine are low or high (27).

For better analysis of the T/EpiT ratio on the basis of genotyping, Schulze et al. (28) identified males with 2 (ins/ins), 1 (ins/del), or 0 (del/del) copies of the UGT2B17 gene and examined their steroid profiles in urine following i.m. injection of testosterone enantate. As expected, the basal testosterone concentrations in urine and T/EpiT were significantly lower for the del/del group. The mean values of T/EpiT are 0,14, 1,4 and 2,3 for the del/del, ins/del and ins/ins groups, respectively.

Epitestosterone basal concentrations did not differ among the separate groups. After testosterone administration, the mean T/EpiT value in the del/del group was increased up to 5,3; yet, in 40% of the participants, it did not attain 4,0. In contrast to this group, in ins/del and ins/ins groups the mean T/EpiT ratio increased to 50,4 and 100, respectively. Epitestosterone concentrations in urine remained lower in all groups, but there was no intergroup difference. When WADA standards with cut-off value of 4,0 for T/EpiT were applied, 94% of the participants in the del/del group had a false negative result on the 2nd day, 41% – on 6th day and 71% on the 11th day after testosterone administration. Genotype-specific cut-off value of 1,0 for T/EpiT for del/del persons produced a false negative result in 43% of the cases on day 2 and eliminated all false negative results on day 6 and day 11 (28). This data showed that genotype-specific cut-off values could enhance the effectiveness of the T/EpiT-ratio testing.

Unfortunately, it is currently both difficult and expensive for the laboratories to include genetic analyses in their routine testing procedures and to screen every athlete for deletions in the UGT2B17 gene. An alternative approach might be the use of the low T/EpiT ratio in urine $< 0,2$ as a marker of the del/del polymorphism. However, this could be problematic, since it would wrongly classify athletes who have misused with a combination of testosterone and epitestosterone (for reducing the T/EpiT value) as carriers of del/del polymorphism. In these cases, genotyping or other tests for uncovering doping with epitestosterone are needed, for example epitestosterone/5-androsten-3 α ,17 α -diol ratio (29) or 13C/12C epitestosterone isotope ratio (30).

Studies on the frequency of the UGT2B17 deletion polymorphism have not been conducted in our country. It is supposed that in the Bulgarian population this frequency is relatively lower, close to the frequencies reported in studies of the Caucasian race. The referent range of T/EpiT for males in the present representative excerpt is from 0,073 (95% CI 0,064-0,081) to 4,234 (95% CI 4,003-4,585), and for females – from 0,109 (95% CI 0,062-0,158) to 1,994 (95% CI 1,725-2,354). It might be speculated that the persons with lower values are carriers of the deletion polymorphism of the UGT2B17 gene. In the study of Martínez-Brito D. et al. in Latino-Americans, the referent T/EpiT interval is 0,09-

5,62 for males and 0,12-3,76 for females, i.e. the lower limits are similar, but the upper limits are higher (10).

Genotype-specific „cut-off“ values of the T/EpiT ratio would be particularly useful, when establishing individual basal values. This conception is grounded in the observation that the T/EpiT ratio of an individual person usually varies less than 30%, whereas the variability between separate persons is much greater. The individual results for T/EpiT, from 3 tests at least, are used for the establishment of a basal value, and results that differ significantly from the latter, are evidence for use of synthetic testosterone. This approach could be applied for the uncovering of testosterone use by persons with deletion polymorphism of the UGT2B17 gene and result in eliminating the necessity of gene-examination. The availability of norms for the Bulgarian male and female population of the most exploited ratio of anabolic steroids in urine would help as regards to the positioning of the individual basal values of athletes.

With reference also to the other androgenic steroids – androsterone, etiocholanolone, 5 α - and 5 β -androstadiol, the referent values for both sexes, established by us, could be compared with other investigations of separate ethnic populations and conducted in different laboratories, which use gas chromatography-mass spectrometry for analysis of urine samples according to WADA standards.

In conclusion, the established national norms for androgenic steroids in urine, in a representative population sample of males and females, 16-18 years old, would serve most of all for the objectives of the Athletes' Biological Passports and the control on the misuse with exogenous anabolic steroids, based on individual steroid profiles – basal and at a follow-up in- and out-of-competitions. Besides, the referent limits of the steroids could also serve as a base for the uncovering of endogenous pathology – enzyme defects in steroidogenesis, androgen-producing tumors, different hyper-androgenic states of women and other endocrine-metabolic diseases, which cause difficulties in clinical practice. The investigations could also be extended to determine norms for other ratios between the separate steroids, which are informative for exogenous administration of steroids or endogenous disorders as well as conducting comparative statistical analysis with similar population investigations in other ethnic groups.

1. **Fitch KD.** Androgenic-anabolic steroids and the Olympic Games. *Asian J Androl* 2008; 10: 384.
2. **Kicman AT, Gower DB.** Anabolic steroids in sport: Biochemical, clinical and analytical perspectives. *Ann Clin Biochem* 2003; 40: 321.
3. **Saudan C, Baume N, Robinson N, Avois L, Mangin P, Saugy M.** Testosterone and doping control. *Brit J Sport Med* 2006; 40: i21.
4. **World Anti-Doping Agency.** Athlete Biological Passport. *Operating Guidelines & Compilation of Required Elements. Version 5.0*, October 2014.
5. **World Anti-Doping Agency (2004)** Reporting and evaluation Guidance for testosterone, epitestosterone, T/E ratio and other endogenous steroids. Technical Document TD2004EAAS. Available at: www.wada-ama.org [10 July 2012].
6. **de la Torre X, Segura J, Yang Z, Li Y, Wu M.** Testosterone detection in different ethnic groups. Recent Advances on dope analysis. Proceeding of the 14th Cologne Workshop in dope Analysis 1996, *Sport und Buch Straub: Köln*, 1997, pp. 71.
7. **Mareck U, Geyer H, Opfermann G, Thevis M, Schänzer W.** Factors influencing the steroid profile in doping control analysis. *J Mass Spectrom* 2008; 43: 877.
8. **Kicman A, Cowan DA.** Subject-based profiling for the detection of testosterone administration in sport. *Drug Test Anal* 2009; 1: 22.
9. **Donike M, Mareck-Engelke U, Rauth S.** Statistical evaluation of longitudinal studies, Part 2: the usefulness of subject based reference ranges in steroid profiling, Recent Advances in doping analysis (2). Proceeding of the 12th Cologne Workshop on Dope Analysis 1994, *Sport und Buch Straub: Köln*, 1995, pp. 157.
10. **Martínez-Brito D, Correa Vidal MT, de la Torre X, García-Mir V, Ledea Lozano O, Granda Fraga M.** Reference ranges for the urinary steroid profile in a Latin-American population. *Drug Testing Anal* 2013; 5(8):619-626. doi: 10.1002/dta.1448.
11. **Beaulieu M, Levesque E, Hum DW, Belanger A.** Isolation and characterization of a novel cDNA encoding a human UDP-glucuronosyltransferase active on C19 steroids. *J Biol Chem* 1996; 271(37): 22855-22862.
12. **Sten T, Bichlmaier I, Kuuranne T, Leinonen A, Yli-Kauhalauma J, Finel M.** UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 2B7 and UGT2B17 display converse specificity in testosterone and epitestosterone glucuronidation, whereas UGT2A1 conjugates both androgens similarly. *Drug Metab Dispos* 2009; 37(2):417-423.
13. **Wilson W 3rd, Pardo-Manuel de Villena F, Lyn-Cook BD, Chatterjee PK, Bell TA, Detwiler DA, et al.** Characterization of a common deletion polymorphism of the UGT2B17 gene linked to UGT2B15. *Genomics* 2004; 84(4):707-714.
14. **Yang TL, Chen XD, Guo Y, Lei SF, Wang JT, Zhou Q, et al.** Genome-wide copy-number-variation study identified a susceptibility gene, UGT2B17, for osteoporosis. *Am J Hum Genet* 2008; 83(6):663-674.
15. **Jakobsson J, Ekstrom L, Inotsume N, Garle M, Lorentzon M, Ohlsson C, et al.** Large differences in testosterone excretion in Korean and Swedish men are strongly associated with a UDP-glucuronosyl transferase 2B17 polymorphism. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(2):687-693.
16. **Swanson C, Mellstrom D, Lorentzon M, Vandenput L, Jakobsson J, Rane A, et al.** The uridine diphosphate glucuronosyltransferase 2B15 D85Y and 2B17 deletion polymorphisms predict the glucuronidation pattern of androgens and fat mass in men. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(12):4878-4882.
17. **Juul A, Sorensen K, Aksglaede L, Garn I, Rajpert-De Meyts E, Hullstein I, et al.** A common deletion in the uridine diphosphate glucuronosyltransferase (UGT) 2B17 gene is a strong determinant of androgen excretion in healthy pubertal boys. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94(3):1005-1011.
18. **Anielski P, Simmchen J, Wassill L, Ganghofner D, Thieme D.** Epidemiological investigation of the UGT2B17 polymorphism in doping control urine samples and its correlation to T/E ratios. *Drug Testing Anal* 2011; 3(10):645-651.
19. **Starcevic B, Butch AW.** Genetic variations in UDP-glucuronosyl transferase 2B17: implications for testosterone excretion profiling and doping control programs. *Clin chem* 2008; 54(12):1945-1947.
20. **National Statistical Institute.** Demographic and social statistics. [Национален Статистически Институт. Демографска и социална статистика].
21. **World Anti-doping Agency (WADA).** The world antidoping code. Endogenous anabolic androgenic steroids, measurement and reporting, technical document TD2014EAAS, Montreal, Canada (2014). www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/Technical_Documents/.
22. **Butenandt A, Hanisch G.** Über Testosteron. Umwandlung des Dehydroandrosterons in Androstendiol und Testosteron; ein Weg zur Darstellung des Testosterons aus Cholesterin. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologie und Chemie* 1935; 237: 89-97.
23. **Ruzicka L, Wettstein A.** Synthetische Darstellung des Testikelhormons Testosteron (Androsten 3-on-17-ol). *Helvetica Chimica Acta* 1935; 18: 1264-1275.
24. **Van Renterghem P, Van Eenoo P, Geyer H, Schänzer W, Delbeke FT.** Reference ranges of urinary concentrations and ratios of endogenous steroids, which can be used as markers of steroid misuse, in a Caucasian population. *Steroids* 2010; 75:154.
25. **Saad K, Vonaparti A, Athanasiadou I, Saleh A, Abushareeda W, Alwahaibi A, et al.** Population Reference Ranges of Urinary Endogenous Sulfate Steroids Concentrations and Ratios as Complement to the Steroid Profile in Sports Antidoping. *Steroids* 2019; 152: 108477. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.108477>.
26. **Donike M, Adamietz B, Opfermann G, Schanzer W, Zimmermann J, Mandel F.** Die Normbereiche für Testosteron- und Epitestosteron-Urinspiegel sowie des Testosteron-/Epitestosteron-Quotienten. In: I.-W. Franz, H. Mellerowicz, W. Noack eds. *Training und Sport zur Prävention und Rehabilitation in der technisierten Umwelt.* Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo, 1985, pp. 503-508.
27. **Jakobsson J, Ekstrom L, Inotsume N, Garle M, Lorentzon M, Ohlsson C, et al.** Large differences in testosterone excretion in Korean and Swedish men are strongly associated with a UDP-glucuronosyl transferase 2B17 polymorphism. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:687-693.
28. **Schulze JJ, Lundmark J, Garle M, Skilving I, Ekstrom L, Rane A.** Doping test results dependent on genotype of UGT2B17, the major enzyme for testosterone glucuronidation. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:2500-2506.
29. **Dehennin L.** Detection of simultaneous self-administration of testosterone and epitestosterone in healthy men. *Clin Chem* 1994; 40: 106-109.
30. **Aguilera R, Hatton CK, Catlin DH.** Detection of epitestosterone doping by isotope ratio mass spectrometry. *Clin Chem* 2002; 48: 629-636.

Ефективност в реални клинични условия и методи на лечението на диабет за Балканския регион – данни от проучването RECAP-DM BALKAN STUDY в България

Тотомирова, Цветелина Ц.¹, Арнаудова, Мила В.¹, Владева, Стефка В.²,
Лефтеров, Ивайло Н.³ Джурев, Калин К.⁴

¹Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, ВМА, София

²Клиника по Ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ „Каспела“, Пловдив

³Отделение по Ендокринология, 5 МБАЛ, София

⁴Мерк, Шарп и Доум България

Адрес за кореспонденция:

Д-р Цветелина Тотомирова

Клиника Ендокринология и болести на обмяната

София, бул. Св. Г. Софийски 3, Военно-медицинска академия, 15 етаж

e-mail: cvet@gbg.bg

Подаване: 19. 02. 2020

Приемане: 21. 04. 2020

Резюме

Дизайн: Многоцентрово, обсервационно, кръстосано проучване, включващо пациенти със захарен диабет тип 2 (ЗД тип 2) на лечение със сулфонилурейни производни (СУП) като монотерапия или в комбинация с метформин през последните 6 месеца преди включване в проучването – RECAP-DM (real-life effectiveness and care patterns of diabetes management), българско рамо.

Цел: Да се оцени честотата на нежеланите реакции при терапията със СУП като хипогликемия и промяна в телесното тегло сред български пациенти със ЗД тип 2. Да се оцени адекватността на гликемичния контрол.

Материали и методи: Българското рамо на проучването RECAP-DM са включени 149 пациента с установен ЗД тип 2, изключени са 14 поради несъответствие, като ефективният брой пациенти в крайния анализ е 135 – 57 (42,2%) мъже и 78 (57,8%) жени. Средната възраст е 66,1±10,2 г. Средната продължителност на заболяването е 10,0±6,9 г. 58 (43%) пациенти са на монотерапия със СУП и съответно 77 (57%) пациенти са на двойна комбинирана терапия (метформин + СУП). Пациентите са получили специфични въпросници относно придържане към терапията, грижа за себе си, случаи на хипогликемия, повишаване на теглото и страх от това, както и стандартно изследване на страха от хипогликемия с помощта на въпросник (HFS-II Questionnaire Worry Subscale).

Резултати: Според критериите на Американската Диабетна Асоциация (ADA) добър контрол по отношение на HbA_{1c} (HbA_{1c} <7%) имат 54,8% от пациентите; по отношение на кръвната захар на гладно (FPG <7,2 mmol/l) – 36,1%; постигане и на двете – 24,4%. Според критериите на Международната Диабетна Федерация (IDF) за оптимален гликемичен контрол (HbA_{1c} < 6,5%; FPG < 6,1 mmol/l) резултатите придобиват съответно следния вид: HbA_{1c} < 6,5% имат 36,3% от пациентите, FPG < 6,1 mmol/l – 16,7% от пациентите, а постигане и на двете се установява при 12 пациента (8,0%). 24,4% от пациентите съобщават, че са имали симптоми на ниска кръвна захар през последните 6 месеца. 78,8% са обезпокоени от симптомите на хипогликемия през този период. При 29,6% е налице наддаване на телесно тегло през последната година. 81,3 % от пациентите съобщават за страх от симптомите на хипогликемия.

Заклучение: Хипогликемичните епизоди са важен проблем в хода на лечение със СУП при пациентите със ЗД тип 2. Честотата и тежестта на хипогликемията се свързва с повишен страх от хипогликемия. Необходимо е прецизиране на терапията от лекуващите екипи с оглед постигане на оптимална ефективност и безопасност за пациентите.

Ключови думи: сулфонилурејни производни (СУП), хипогликемия, захарен диабет тип 2

Въведение

Въпреки че дълго време лечението на захарния диабет (ЗД) беше насочено само към намаляване на гликемичните нива, през последните години се наложи мнението, че за добър контрол е необходимо оптимално повлияване както на HbA_{1c}, така и избягване на хипогликемичните епизоди и овладяване на глюкозната вариабилност (1,2). Хипогликемичните епизоди при ЗД тип 2 по правило се срещат по-рядко в сравнение с тип 1. В същото време тази честота не е малка и в различни проучвания, особено такива, използващи продължително глюкозно мониториране, се регистрират 47% неразпознати хипогликемии при ЗД тип 2, като близо 74% от тях са по време на сън (3). Някои проучвания показват дори по-лоши резултати – 83% неразпознати хипогликемии при ЗД тип 2, като 54% са по време на сън (4).

По същество хипогликемията е сравнително често усложнение при лечението на ЗД, което може да доведе до нефатални и фатални последици, да стане причина за неоптимално повлияване на лечението и като цяло да влоши качеството на живот на пациента. Установено е, че рискът за хипогликемия нараства с напредване на възрастта, с увеличаване на продължителността на заболяването, при тежки съпътстващи заболявания като бъбречна недостатъчност, хипотиреоидизъм и други. Друг фактор, повлияващ честотата на хипогликемиите, е непознаването на характерните им симптоми, както и непреприемането на мерки за тяхната превенция. Хипогликемиите, страхът от тях и опитът да бъдат избегнати с повишен прием на храна, са ключов фактор, ограничаващ постигането на оптимален гликемичен контрол (5). Поднормени нива на кръвната захар са редки при медикаментозно нелекувани пациенти. Честотата им е най-силно изявена сред пациентите, лекувани с инсулин и сулфонилурејни производни (СУП).

Основна цел на проучването RECAP-DM (real-life effectiveness and care patterns of diabetes management) е да се оцени честотата на нежеланите реакции при терапията със СУП като

хипогликемия, оценявана от докладваните от пациентите резултати. Оценява се също увеличаването на телесното тегло и доколко страничните ефекти от лечението притесняват пациентите. Другата основна цел е оценката на гликемичния контрол. Адекватен гликемичен контрол се определя според съвременните препоръки на международните диабетни организации (за адекватен гликемичен контрол според Международна Диабетна Федерация (IDF) се приема HbA_{1c} <6,5%, кръвна захар на гладно (FPG) <6,1 mmol/l (6), а според Американска Диабетна Асоциация (ADA) – HbA_{1c} <7%, FPG <7,2 mmol/l (7).

Като вторична цел се поставя определяне на връзката между демографските и медицинските фактори, свързани с различна степен на хипогликемия и гликемичен контрол.

RECAP-DM е проведено през 2015 г. сред страните в Балканския регион (България, Хърватия, Сърбия и Словения). В настоящото изложение се представят данните от България.

Материали и методи

Пациентите са подбрани според определените *включващи критерии* както следва: пациенти, диагностицирани със ЗД тип 2 (според критериите на ADA); над 30 годишна възраст при поставяне на диагнозата ЗД тип 2; провеждащи лечение със СУП (като монотерапия или в комбинация с метформин) за най-малко 6 месеца преди проучването (което е проследено според амбулаторните листове за поне 90 дни прием); налично клинично досие в здравния център; медицинските пациентски досиета да съдържат минималните основни данни и пациентите да се контролират главно в здравния център; правилно попълване на въпросника (след като е получено изрично информирано съгласие); пациентите са на амбулаторно лечение.

Като *изключващи критерии* се посочват: ЗД тип 1, бременни жени/жени с гестационен ЗД; пациенти, които са приемали или приемат DPP4-инхибитори, GLP-1 рецепторни агонисти, меглитиниди, пиоглитазон и инсулин през последните 6

месеца преди проучването; пациенти, за които би било невъзможно попълването на въпросника във всяка възможна форма, поради каквато и да било причина; пациенти, които вече участват в клинично изпитване или друг вид клинично проучване; невъзможност или нежелание да се подпише информираното съгласие; решение на изследователя, че пациентът не трябва да участва в проучването.

В деня на начало на проучването, всички участващи пациенти се подлагат на изследване на FPG и HbA_{1c} чрез взимане на кръвна проба. Измерва се телесното тегло на пациента. Попълват се въпросници относно честотата и въздействието на хипогликемичните епизоди, промяната на телесното тегло при провежданата терапия, самооценка на провежданото лечение през последните 6 месеца (придържане към назначената терапия, удовлетвореност, качество на живот, тревожност, страх и др.).

Българското рамо включва 149 пациента с установен ЗД тип 2, избрани съгласно включващите и изключващите критерии. След първоначалната обработка на данните е установено, че общо 14 пациенти не са изпълнили критериите за включване (n=13) или критериите за изключване (n=1). Тези пациенти са изключени от крайния анализ и ефективният брой пациенти, включени в българския набор от данни, е 135.N

Проучването включва 57 (42,2%) мъже и 78 (57,8%) жени, като 76 (56,3%) от пациентите са над 65 г. Средната възраст на пациентите в изпитването е 66,1±10,2 г. Средната продължителност на заболяването е 10,0±6,9 г. 106 (78,5%) от пациентите са с установен ЗД над 5 г. Средната възраст на поставяне на диагнозата е 56,0±6,3 г..

По време на посещенията пациентите са получили специфични за проучването въпросници - относно общо придържане към терапията, обща грижа за себе си, случаи на хипогликемия, повишаване на теглото и страх от това и стандартното изследване на страха от хипогликемия с помощта на въпросник (HFS-II Questionnaire Worry Subscale).

Резултати

Хипогликемия

33 пациента (24,4%) съобщават, че са имали симптоми на ниска кръвна захар през последните 6 месеца. Двама от тези пациенти отговарят с „не“ на всички последващи въпроси относно хипогликемия. Анализът на останалите 31 пациента показва, че 61,3% съобщават за поява на леки хипогликемични симптоми за този период, 29,0% съобщават за средно-тежки симптоми и 9,7% за тежки симптоми. 81,3% съобщават за обезпокоеност от симптомите на хипогликемиите през този период. 42,4% избягват въпроса как се справят с

преодоляването на хипогликемията. Хипогликемичните епизоди ограничават пациентите в ежедневието им. При 41,5% от пациентите ограничението е поради притеснения, че нямат възможност за реакция - не носят сладка напитка или др. Същият брой пациенти дори чувстват дискомфорт от излизане от къщи, а 31,1% се притесняват от объркване пред приятели или обществото. Пациентите се безпокоят и от това, че хипогликемичният епизод може да се случи, когато са сами (50,4%) и че няма да има някой, който да помогне в създамата се ситуация. Пациентите споделят и опасения, че при хипогликемичен епизод може да причинят катастрофа, да наранят себе си или околните, да попречат на ежедневни обичайни дейности.

Страхът от хипогликемии е оценен със специфичен въпросник: HFS-II Questionnaire Worry Subscale. Въпросникът HFS-II Questionnaire Worry Subscale се състои от 18 въпроса с оценки в отговорите вариращи от 0 до 4 точки (по-високите стойности означават по-изразен страх от хипогликемия) с възможен общ сбор от 0 до 72 точки. Пациенти с липсващи отговори не са включени в крайния анализ. Така, общият брой включени пациенти е 123. Не е определена гранична стойност, която би била най-показателна за клинично значим страх от хипогликемия, оценен с HFS-II WS. Найос и съпр. предлагат използването на критерия EI (elevated item), който показва силна връзка със субоптимално благосъстояние на пациента. Критерият EI се изпълнява при пациенти, които имат повишен резултат ≥ 3 [често/много често] на повече от един въпрос от HFS-II WS (8). При 15,6% от пациентите в България (21 от 135) е установено, че изпълняват EI критерия.

Гликемичен контрол

Гликемичен контрол се дефинира спрямо препоръките на ADA (6) или спрямо тези на IDF (7). Среден HbA_{1c} на наблюдаваната група е 7,3±1,9%, а средната стойност на измерената FPG е 8,4±3,0 mmol/l. Двама пациенти от наблюдаваната група (1,9%) са имали FPG под 3,9 mmol/l.

Според критериите на ADA за оптимален гликемичен контрол разпределението на пациентите е както следва: HbA_{1c} <7,0% - 74 пациента (54,8%); FPG <7,2 mmol/l - 39 пациента (36,1%), а постигане и на двете (HbA_{1c} <7,0% и FPG <7,2 mmol/l) се установява при 33 пациента (24,4%). Ако проследим изискванията на IDF за оптимален контрол резултатите придобиват следния вид: HbA_{1c} <6,5% - 49 пациента (36,3%), FPG <6,1 mmol/l - 18 пациента (16,7%), и двете (HbA_{1c} <6,5% и FPG <6,1 mmol/l) са постигнати при 12 пациента (8,0%) (Фиг.1).

Телесно тегло

Средното телесно тегло на изследваната популация е $83,5 \pm 17,6$ кг, а средният индекс на телесна маса (ИТМ) е $29,8 \pm 5,8$ кг/м². Разпределението според ИТМ е както следва: с ИТМ $\geq 18,5$ до < 25 кг/м² – 17,8%; ИТМ ≥ 25 до < 30 кг/м² – 40,0%; ИТМ ≥ 30 до < 35 кг/м² – 25,2%; ИТМ ≥ 35 кг/м² – 17,0%. (Фиг. 2).

Промените по отношение на телесното тегло са важен аспект в лечението със СУП. Около 50% от пациентите съобщават за поддържане на стабилно телесно тегло година преди проучването, а при 20% е регистрирана редукция. 29,6% от запитаните пациенти (n=40) съобщават, че са регистрирали наддаване на телесно тегло през последната година. При 55,0% от пациентите наддаването е пог 5 кг, при 32,5% наддаването е 5-9 кг, а при 12,5% наддаването е над 10 кг. Три четвърти от пациентите (~ 80%) се притесняват от тези промени в телесното тегло.

Промяна на терапията

До началото на изследването: 58 (43%) от пациентите са лекувани с 1 активна субстанция, а 77 (57%) – с 2 активни субстанции. Използваните СУП са Gliclazide, Glimperiride или Glipizide; всички пациенти на двойна комбинирана терапия с изключение на един (n=76) са приемали метформин; другият пациент е използвал акарбоза.

На първа визита терапията е променена при 53 пациента (39,2%). Около 40% от промените включват прецизиране на дозата, а останалите – промяна или добавка на медикаменти, като добавянето на или замяната с DPP-4 инхибитор е била най-честата промяна.

Обсъждане

Данните от проведеното проучване могат да бъдат анализирани в два основни аспекта – от една страна реална оценка на гликемичния контрол при пациенти със ЗД тип 2 в България с внимание върху хипогликемичните епизоди, отношението на пациентите към това, повишаването на телесното тегло при лечение със СУП, а от друга – съпоставка със сходни данни в балканския регион.

Средната честота на хипогликемичните епизоди в проучването AP (Asia-Pacific) RECAP-DM е 35,8% (95% CI 33,8–37,8%) (9) и съответно 38,4% (95% CI 34,0–42,8%) в проучването EU RECAP-DM (10). Честотата на съобщаваните епизоди е варирувала между 24,2% (за Германия) до 53,6% (за Великобритания) (11). В Българското рамо 24,4% от пациентите съобщават, че са имали симптоми на ниска кръвна захар през последните 6 месеца. Причините за различията

са нееенородни. Вероятно недоброто познаване на хипогликемичната симптоматика води до неразпознаването на епизодите, с което последните биват определяни от пациента по-скоро като дискомфорт, прилошаване и т.н., без да бъде оценен реалният проблем. От друга страна е възможно недостатъчният стремеж към оптимален гликемичен контрол от страна на пациентите – поддържането на по-високи гликемии, определени като задоволителни, да води и до по-редки реални хипогликемични епизоди.

Моделът на логистична регресия е използван за анализ на две променливи. Първият модел изследва асоциацията на добрия гликемичен контрол (оценен като наличен или липсващ според критериите на ADA, 2011) с 10 демографски/обща пациентски характеристики. Резултатите показват, че FPG и страхът от покачване на телесното тегло сигнификантно се асоциират с добрия контрол (OR 0,49, 95% CI: 0,33–0,67; OR 0,13, 95% CI: 0,04–0,43; съответно). Изследването на асоциацията на хипогликемичните епизоди през последните 6 месеца с добрия гликемичен контрол не показва сигнификантна зависимост.

Страхът от хипогликемия представлява категорично допълнителна психологическа бариера върху постигането на гликемичния контрол и придържането към терапията. Много пациенти не винаги могат да разпознаят или да си спомнят симптомите на хипогликемия или могат да имат ограничени познания за самата хипогликемия, поради това е възможно реалните хипогликемични инциденти да са повече от докладваните.

Както отбелязахме 15,6% от българските пациенти отговарят на E1 критерия, което съответства на неоптимално благосъстояние на пациента. Съществува статистически значима разлика в оценката на HFS резултатите между пациентите с и без хипогликемични епизоди (средна разлика 5т, 95% CI 2-11, $p=0,0021$, тест на Mann-Whitney). Не се установява сигнификантна разлика между стойността на E1 критерия, за тези които съобщават за хипогликемичен епизод през последните 6 месеца и тези, при които липсва хипогликемия. Като цяло нашите резултати повтарят резултатите от балканското проучване RECAP-DM, както и резултатите по отношение хипогликемиите в редица други изследвания (11,12).

Пациентите, които са докладвали хипогликемични събития, показват по-голям страх от тях, спрямо тези, които не са докладвали. Пациентите, които са докладвали тежки епизоди на хипогликемия, изпитват по-голям страх от тези, които са докладвали не толкова тежки случаи.

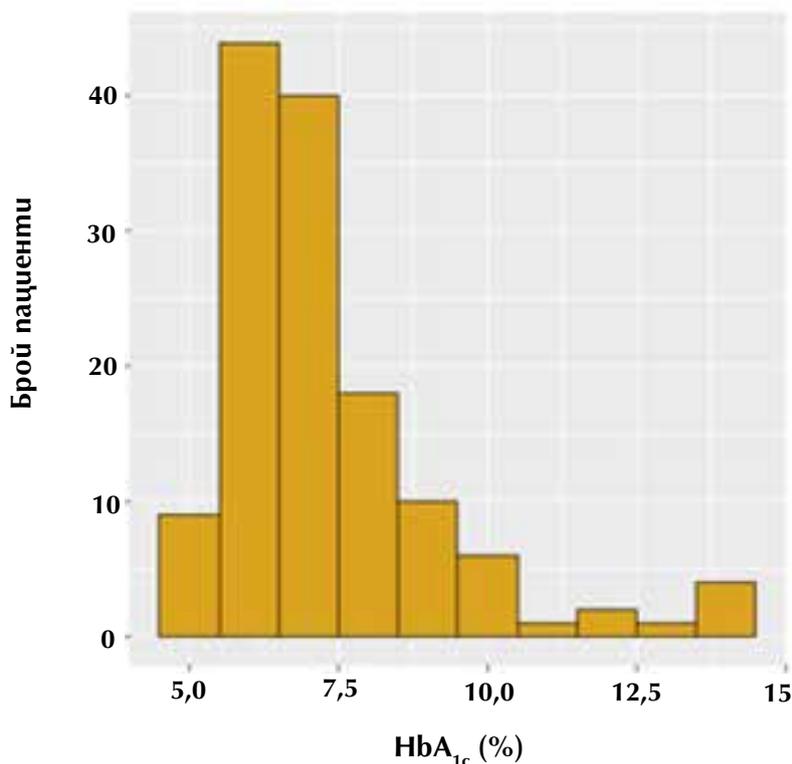
Лечението със СУП често води до увеличаване на теглото с около 2 кг в зависимост от

Таблица 1.

Характеристика на пациентите.

Основни характеристики	Средна стойност (SD)/n (%)
Възраст (години) ≥ 65 години	66,1 (10,2) 76 (56,3%)
Пол Женски Мъжки	78 (57,8%) 57 (42,2%)
HbA _{1c} (%) HbA _{1c} < 7,0% HbA _{1c} < 6,5%	7,3 (1,9) 74 (54,8%) 49 (36,3%)
Плазмена глюкоза на гладно (mmol/l) FPG < 7,2 mmol/l (n=108) FPG < 6,1 mmol/l (n=108)	8,4 (3) 39 (36,1%) 18 (16,7%)
Телесно тегло (кг)	83,5 (17,6)
ИТМ (кг/м ²)	29,8 (5,8)
Продължителност на диабета (години) Възраст при диагнозата (години)	10,0 (6,9) 56,0 (9,3)
Пушачи	22 (16,3%)

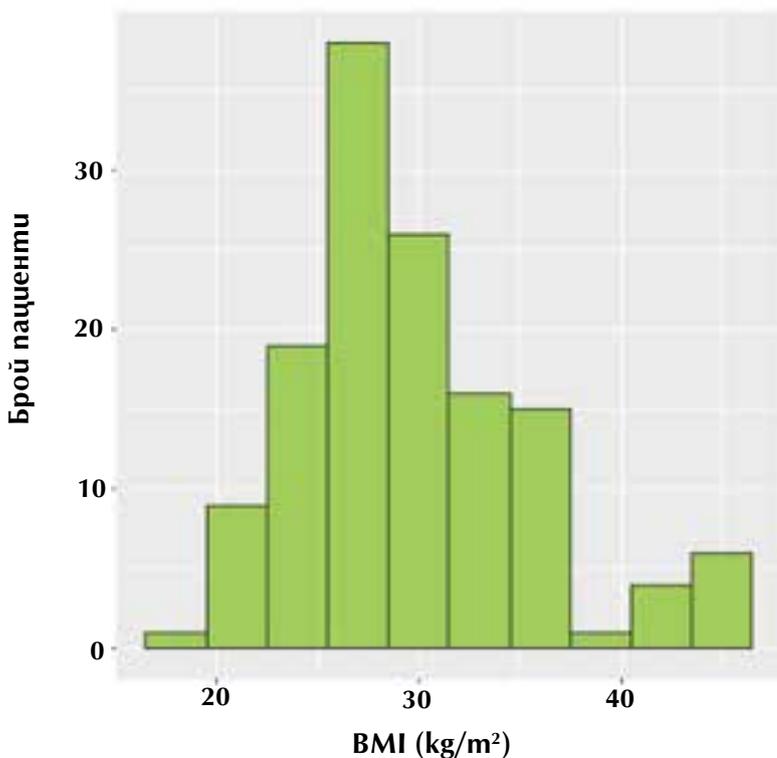
Фигура 1. Разпределение на пациентите според HbA_{1c}.



изходното ниво на HbA_{1c} и 2 до 3 пъти по-високи нива на хипогликемия отколкото лечението с други орални антидиабетни лекарства.

Промените по отношение на телесното тегло, както отбелязахме, са важен аспект в лечението със СУП. Над четвърт от изследваните пациенти (26,6%) в нашето проучване отбелязват наддаване на телесно тегло през последната година. Този факт е очакван, но с неблагоприятни последици по отношение на контрола, т.к. при пациентите със ЗД тип 2, които по правило са с неоптимални параметри на телесното тегло, всеки излишен килограм е свързан с влошаване на инсулиновата резистентност, съпътстваща заболяването.

Интерес представлява и подходът на значима част от лекарите при среща с пациента и оценката на терапията му. При само 40% от пациентите дозата на СУП е променена с цел постигане на оптимален резултат. Тази инертност в терапевтичния подход е необходимо да бъде повлияна и преодоляна. В лечението на пациенти със ЗД тип 2, все по-голямо значение има назначаването на пато-



Фигура 2.

Разпределение на пациентите според ИТМ.

генетично ориентирани класове медикаменти като инкретин базираната терапия и SGLT-2 инхибиторите. Това са медикаменти, които освен подобрения в гликемичния контрол носят и допълнителни благоприятни ефекти (сърдечно-съдови ползи, намаляване на телесното тегло, редукция в хипогликемиите и т.н.) (13).

Известен недостатък на провежданото изследване е ретроспективният му характер. Оценката на хипогликемичните епизоди и тяхната тежест е субективна и в голяма степен повлияна от индивидуалната чувствителност на пациента, степента му на познание относно хипогликемичните симптоми, възможността да разпознава тези епизоди и да ги диференцира от други състояния на общо разположение. Липсата на оценка на симптоматиката с кореспондиращо ниво на гликемиите (най-малко чрез използване на глюкомер) поражда суспекция по отношение на точната честота на хипогликемичните епизоди.

От друга страна, точно тези отбелязани недостатъци са и предимство в някои отношения при изследване на посочените групи пациенти. В ежедневието си пациентите със ЗД тип 2 рядко използват глюкомер и чисто субективната оценка на хипогликемиите е от ключово значение за разпознаването на такъв епизод и предприемане на съответни мерки за овладяването му и предотванване от по-нататъшни последици.

Обобщение

Въпреки добре документирани проблеми, свързани с безопасността на терапията със СУП като хипогликемия и нагдване на тегло, има голям брой пациенти, които приемат тези лекарства в България като монотерапия или като част от комбинирана терапия. Макар че по-новото поколение СУП показват по-ниска честота на хипогликемични епизоди, нашите данни потвърждават, че употребата им е свързана със значителен риск от хипогликемия.

Неоспоримо е, че честотата и тежестта на хипогликемията при лекувани със СУП, пациенти са свързани с повишен страх от хипогликемия.

Необходима е промяна в мисленето на клиницистите и съобразяване с тези данни, когато предписват СУП, както и задължително информиране на пациентите за риска от хипогликемия. Неутрални по отношение на телесното тегло медикаменти с нисък риск за хипогликемия като инкретин-базираната терапия и SGLT-2 инхибиторите представляват ценна терапевтична възможност, която може да помогне на пациентите да постигнат и поддържат добър гликемичен контрол и по този начин да се намалят свързаните с диабета усложнения в България.

The Real-Life Effectiveness and Care Patterns of Diabetes Management Study for the Balkan Region – a Report on the Bulgarian Dataset

Totomirova¹, Tzvetelina T., Arnaudova¹, Mila V., Vladeva², Stefka V., Lefterov³, Ivaylo N., Djurov⁴, Kalin K.

¹ Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases, MMA, Sofia

² Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases, University Hospital Kaspela, Plovdiv

³ Department of Endocrinology, 5 MHAT, Sofia

⁴ Merck, Sharp and Dome, Bulgaria

Address for correspondence:

Tzvetelina Totomirova, MD

Clinic of Endocrinology and metabolic diseases

Sofia, St. G. Sofijski str. 3, Military medical academy, 15fl.

e-mail: cvet@gbg.bg

Submitted: 19. 02. 2020

Accepted: 21. 04. 2020

Abstract

Design: A multicenter, observational, crossover study RECAP-DM (real-life effectiveness and care patterns of diabetes management) (Bulgarian arm) involving patients with type 2 diabetes mellitus (type 2 DM) treated with sulphonylurea (SU) as monotherapy or in combination with metformin 6 months before study participation.

Aim: To evaluate the incidence of adverse events of SU therapy such as hypoglycaemia and to assess the change in weight among Bulgarian ts were evaluated at the final analysis – 57 (42,2%) men and 78 (57,8%) women. Mean age – 66,1 ± 10,2 years. Average disease duration was 10,0 ± 6,9 years. 58 (43%) patients were on monotherapy with SU and 77 (57%) patients on dual therapy (metformin + SU). Patients received questionnaires regarding adherence, self-care, hypoglycaemic episodes, weight gain and fear, and the standardized HFS-II Questionnaire Worry Subscale.

Results: According to the American Diabetes Association (ADA) criteria, 54.8% were well controlled with an HbA_{1c} of <7%, and based on fasting plasma glucose (FPG < 7,2 mmol/l) – 36,1%. Based on both criteria, 24,4% achieved good control. According to the International Diabetes Federation (IDF) criteria for optimal control (HbA_{1c} <6,5%; FPG < 6,1 mmol/l), the results are as follows: based on HbA_{1c} – 36,3%, based on fasting plasma glucose – 16,7%, and based on both criteria in 12 patients (8,0%) reached optimal control. 24,4% of patients reported symptoms of low blood sugar in the last 6 months. 78,8% were concerned about the symptoms of hypoglycemia during this period. There was weight gain in 29,6% for the last year period. 81,3% of patients reported anxiety about the symptoms of hypoglycemia.

Conclusion: Hypoglycaemic episodes are an important side effect of SU treatment in patients with type 2 diabetes. The incidence and severity of hypoglycaemia has been associated with an increased fear of lowering of blood glucose. Precise adjustment in therapy is required by each physician to achieve optimal efficacy and safety for patients.

Key words: sulphonylurea, hypoglycemia, diabetes mellitus type 2

Introduction

For a long time, the treatment of type 2 diabetes mellitus (DM) was aimed at reducing glycemic levels only. However, recently it has been argued that good control requires both optimal HbA_{1c} response and avoidance of hypoglycaemic episodes and control of glucose variability (1,2). Hypoglycemic episodes in type 2 DM are generally less common compared to type 1 diabetes. At the same time, this frequency is not low and in various studies, especially those using continuous glucose monitoring, 47% of unrecognized hypoglycaemia was detected in type 2 DM, with nearly 74% during sleep (3). Some studies show even worse results – 83% of unrecognized hypoglycemia in type 2 DM, with 54% during sleep (4).

Hypoglycaemia is a relatively common complication when treating diabetes which can lead to non-fatal as well as fatal consequences, can cause suboptimal response to treatment and can generally lead to impaired quality of life. The risk of hypoglycaemia is found to correlate with advancing age, with increasing disease duration and with severe comorbid conditions such as renal failure, hypothyroidism etc. Another factor affecting the incidence of hypoglycaemia is the lack of knowledge of symptoms, as well as failure to take preventive measures. Hypoglycemia, the fear of it and the attempt to avoid lowering of blood glucose with increased food intake are key factors that limit the achievement of optimal glycemic control (5). Hypoglycemia are rare in drug-naïve patients and the incidence is higher in patients treated with insulin or sulphonylurea (SU).

The *primary objective* of the RECAP-DM (real-life effectiveness and care patterns of diabetes management) study was to assess the incidence of side effects of SU therapy, such as hypoglycemia, evaluated by patient-reported outcomes and weight gain, as well as by how much patients were bothered by these side effects. Another primary objective was to assess the adequacy of glycemic control. Adequate glycemic control is determined according to current recommendations of international diabetic organizations (adequate glycemic control according to International Diabetes Federation (IDF) is HbA_{1c} <6,5%, fasting plasma glucose (FPG) below 6,1 mmol/l (6), and according to American Diabetes Association (ADA) – HbA_{1c} <7%, FPG below 7,2 mmol/l (7).

The *secondary objective* was to determine the relationship between demographic and medical factors associated with varying degrees of hypoglycemia and glycemic control.

RECAP-DM was conducted in 2015 in the countries in the Balkan region (Bulgaria, Croatia, Serbia and Slovenia). In this article we present the Bulgarian dataset.

Materials and methods

Patients were selected according to pre-defined *inclusion criteria*: patient diagnosed with type 2 diabetes mellitus (DM) (according to the ADA criteria); ≥30 years at the time of type 2 DM diagnosis; treatment with SU (as monotherapy or in combination with metformin) for at least 6 months prior to enrollment (as evidenced by filled prescriptions for at least a 90-day supply); patient has his/her clinical record in the healthcare center; patient's medical records include the minimum core data; patient is primarily managed in the healthcare center; patient properly completes the questionnaires (after having given consent); outpatient patient.

The *exclusion criteria* were: type 1 DM, pregnant women/women with gestational diabetes; patients who received or are currently treated with DPP4 inhibitors, GLP-1 receptor agonists, meglitinides, pioglitazone and insulin during the 6 months prior to enrollment; patients who are unable to complete the questionnaire for whatever reason; patients already participating in a clinical trial or other type of clinical trial; inability or unwillingness to sign the informed consent; the investigator's decision that the patient should not participate in the study.

In the beginning of the study, the adequacy of glycemic control was assessed by measuring FPG and HbA_{1c}. The patient's body weight was measured. Questionnaires about incidence and impact of hypoglycaemic episodes, therapy related weight change, self-assessment of treatment during the last 6 months (adherence to prescribed therapy, satisfaction, quality of life, anxiety, fear, etc.) were completed.

The Bulgarian arm included 149 patients with type 2 DM, selected according to the inclusion and exclusion criteria. After initial data processing, it was found that 14 patients did not meet the inclusion criteria (n=13) or the exclusion criteria (n=1). These patients were excluded from the final analysis and the effective number of patients included in the Bulgarian dataset was 135.

The study included 57 (42,2%) men and 78 (57,8%) women, with 76 (56,3%) of patients over 65 years of age. The mean age was 66,1±10,2 years. The mean duration of DM was 10,0±6,9 years. 106 (78,5%) of the patients had DM over 5 years. The mean age at diagnosis was 56,0±6,3 years (Table 1).

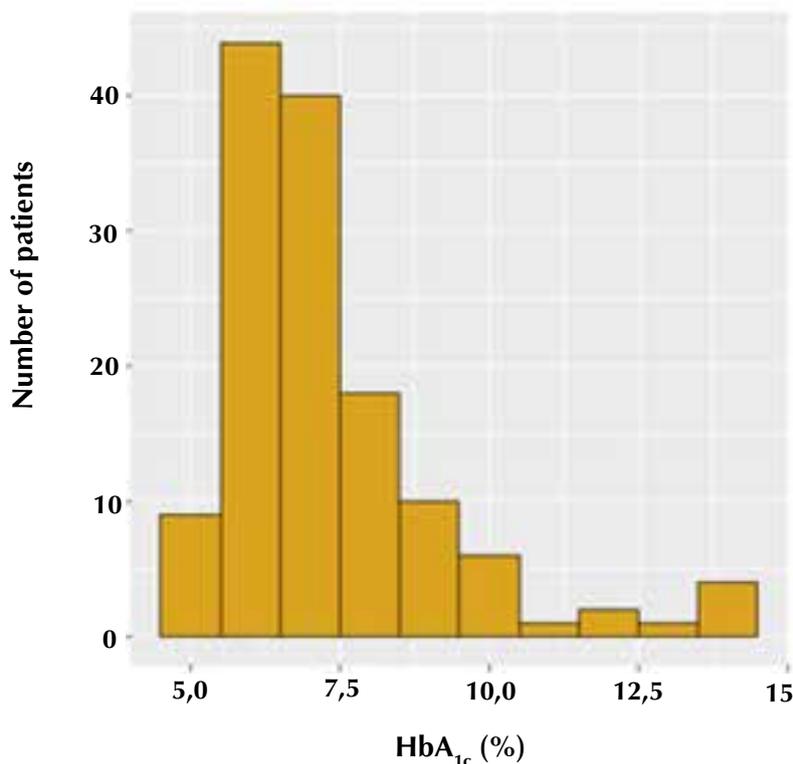
During study visits patients received study-specific questionnaires – general adherence to therapy, general self-care, experience of hypoglycaemia, weight gain and fear of weight gain, and the standard Hypoglycemia Fear Survey II Worry Subscale (HFS-II WS) on fear of hypoglycemia.

Table 1.

Patients characteristics

Baseline characteristics	mean (SD)/ n (%)
Age (years) ≥ 65 years	66,1 (10,2) 76 (56,3%)
Sex Female Male	78 (57,8%) 57 (42,2%)
HbA _{1c} (%) HbA _{1c} < 7,0% HbA _{1c} < 6,5%	7,3 (1,9) 74 (54,8%) 49 (36,3%)
Fasting plasma glucose (FPG) (mmol/L) FPG < 7,2 mmol/l (n=108) FPG < 6,1 mmol/l (n=108)	8,4 (3) 39 (36,1%) 18 (16,7%)
Body weight (kg)	83,5 (17,6)
BMI (kg/m ²)	29,8 (5,8)
Duration of diabetes (years) Age at diagnosis (years)	10,0 (6,9) 56,0 (9,3)
Smoking	22 (16,3%)

Figure 1. Patient distribution based on HbA_{1c}.



Results

Hypoglycemia

Thirty three patients (24,4%) reported having had symptoms of low blood sugar over the last 6 months. However, 2 of these patients answered „No“ to all subsequent related items (effectively „denying“ any hypoglycaemic episodes). Analysis of the remaining 31 patients showed that 61,3% reported mild hypoglycaemic symptoms during this period, 29,0% reported moderate symptoms, and 9,7% – severe symptoms. 81,3% reported anxiety about the symptoms of hypoglycemia during this period. 42,4% avoided the question about coping with a hypoglycaemic episode. Hypoglycaemic episodes limit patients' daily routine – 41,5% due to concerns that they could not react appropriately – do not carry a sugar, sugar drink, etc., the same number of patients even feel uncomfortable when leaving home, and 31,1% worry about confusion in front of friends or at public places. Patients are also worried, that the hypoglycaemic episode could happen when they are alone (50,4%) and that there will be no one to help.

Patients also share fears that a hypoglycaemic episode may cause a car accident, injury or interfere with daily routine activities.

Fear of hypoglycemia was assessed by a specific questionnaire: HFS-II Questionnaire Worry Subscale. The HFS-II Questionnaire Worry Subscale consists of 18 questions with scores ranging from 0 to 4 points (higher values indicate greater fear of hypoglycemia) with a possible total of 0 to 72 points. Patients with missing answers were not included in the final analysis. Thus, the total number of patients included in the analysis was 123. Up until now no definite cut-off score has been determined that would be most indicative of clinically relevant fear of hypoglycaemia as assessed by HFS-II WS score. However, Hajos et al. (8) suggest use of the EI (elevated item) criterion which supposedly shows a strong association with suboptimal patient well-being. EI criterion is fulfilled by patients who have an elevated score (≥ 3 [Often/Very often]) on more than one HFS-II WS item (8). Among the study participants from Bulgaria, 21 out of 135 (15,6%) were found to fulfil the EI criterion.

Glycemic control

Glycemic control was defined according to the recommendations of the ADA (6) or recommendations of the IDF (7). The mean HbA_{1c} of Bulgarian patients was $7,3 \pm 1,9\%$ and the mean FPG measured was $8,4 \pm 3,0$ mmol/l. Two patients in the observed group (1,9%) had FPG below 3,9 mmol/l.

According to ADA criteria, the distribution of patients in relation to glycemic control according to HbA_{1c} was as follows: HbA_{1c} $< 7,0\%$: 74 patients (54,8%); FPG $< 7,2$ mmol/l: 39 patients (36,1%) and both HbA_{1c} $< 7,0\%$ and FPG $< 7,2$ mmol/l was found in 33 patients (24,4%). If IDF requirements for optimal control were followed, the results are as follows: HbA_{1c} $< 6,5\%$: 49 patients (36,3%), FPG $< 6,1$ mmol/l: 18 patients (16,7%), both HbA_{1c} $< 6,5\%$ and FPG $< 6,1$ mmol/l was achieved in 12 patients (8,0%) (Fig. 1).

Body weight

The mean body weight was $83,5 \pm 17,6$ kg and the mean body mass index (BMI) was $29,8 \pm 5,8$ kg/m². BMI distribution was as follows: BMI $\geq 18,5$ to < 25 kg/m² - 17,8%; BMI ≥ 25 to < 30 kg/m² - 40,0%; BMI ≥ 30 to < 35 kg/m² - 25,2%; BMI ≥ 35 kg/m² - 17,0% (Fig. 2).

Changes in body weight are an important aspect of SU treatment. About 50% of patients reported maintaining a stable body weight a year prior to study enrollment, with 20% reporting a reduction. 29,6% of patients (n=40) reported weight gain in the last year. In 55,0% of patients, weight gain was below 5 kg, in 32,5% of patients, weight gain was 5-9 kg, and in 12,5% weight gain was above 10 kg. Three-quarters of patients (~ 80%) are concerned about these changes in body weight.

Therapy adjustment

At baseline: 58 (43%) of patients were treated with 1 active substance, 77 (57%) of patients were treated with 2 active substances. The sulfonylureas used were gliclazide, glimepiride or glipizide; all patients on dual therapy, except one (n=76) who was on acarbose, received metformin.

During the first visit the therapy was changed in 53 patients (39,2%). About 40% of the changes included dose adjustments and the remaining cases - change or addition of DPP4 inhibitor.

Discussion

The presented study data could be discussed in two main aspects - one being that the study represents a real assessment of glycemic control in patients with type 2 DM in Bulgaria with the focus on hypoglycemic episodes, patients' attitude to hypoglycemia and SU related weight gain. Another aspect is comparisons with data in the Balkan region as well as worldwide.

The average incidence of hypoglycaemic episodes in the AP (Asia-Pacific) RECAP-DM study was 35,8% (95% CI 33,8-37,8%) (9) and 38,4% (95% CI 34,0-42,8%) in the EU RECAP-DM study, respectively (10). The frequency of reported episodes ranged from 24,2% (for Germany) to 53,6% (for the UK) (11). In the Bulgarian arm, 24,4% of patients reported symptoms of low blood sugar over the past 6 months prior to enrollment. The reasons for these differences are heterogeneous. The poor knowledge of hypoglycaemic symptoms possibly leads to unrecognized episodes, with the latter being defined by the patient as discomfort, nausea, etc., without recognizing the real issue. On the other hand it is possible that the insufficient pursuit of optimal glycemic control by patients - namely maintenance of higher glycemia identified as satisfactory, may also lead to less frequent real hypoglycemic episodes.

Logistic regression modeling was employed for analysis of the two variables. The first model explored the association of good glycemic control (rated as yes or no by ADA 2011 criteria) with 10 variables. Fasting plasma glucose levels and fear of weight gain proved to be significantly associated with good control (OR 0,49, 95% CI: 0,33-0,67; OR 0,13, 95% CI: 0,04-0,43; respectively). The second model explored association of hypoglycaemic episode(s) during the last 6 months (yes/no) with 10 variables (full model), but did not demonstrate any significant association.

The fear of hypoglycemia was an additional psychological barrier to glycemic control and adherence. Many patients may not always recognize or remember the symptoms of hypoglycaemia or may have limited knowledge of the hypoglycaemia itself, so actual hypoglycaemic incidents may be greater than reported.

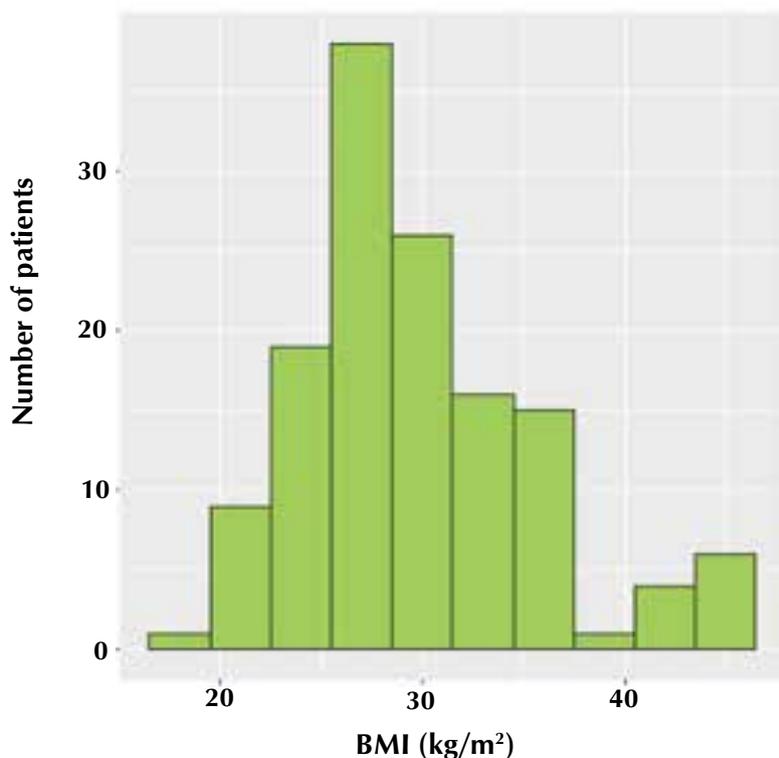


Figure 2.

Patient distribution based on BMI.

As noted, 15,6% of Bulgarian patients met the EI criterion, which corresponds to suboptimal patient well-being. There was a statistically significant difference in the assessment of HFS scores between patients with and without hypoglycemic episodes (mean difference 5 points, 95% CI 2-11, $p=0,0021$, Mann-Whitney test). No significant difference was found between the EI criterion value for patients reporting a hypoglycaemic episode in the last 6 months and those without hypoglycaemia. Overall, our data replicate the results from RECAP-DM Balkan study as well as the results for hypoglycemia in a number of other studies (11,12).

Patients who reported hypoglycaemic episodes showed a greater fear of lowering of blood glucose than those who did not report hypoglycemia. Patients who have reported severe episodes of hypoglycemia have a greater fear than those who have reported less severe cases.

Treatment with SU often leads to weight gain of about 2 kg depending on baseline HbA_{1c} and a two to three-fold higher rate of hypoglycaemia compared to other oral antidiabetic drugs.

Weight gain is an important aspect of SU treatment. In our study more than a quarter of patients (26,6%) reported weight gain in the last year prior to enrollment. This is an expected adverse event and has negative effects on glycemic control, as in patients with type 2 DM, who generally have suboptimal body weight parameters, each extra kilogram is associated with worsening of insulin resistance.

An interesting aspect of the study is also the physician's treatment approach when meeting the patient and evaluating his or her therapy – in 40% of patients, the dose of SU was changed to achieve an optimal glycemic control. There is clinical inertia in the management of patients with type 2 DM and it must be addressed and overcome. The use of classes of medications focused on pathogenic defects in type 2 DM such as incretin-based therapy and SGLT-2 inhibitors should be encouraged. Moreover, these drugs not only improve glycemic control, but have additional favorable effects (cardiovascular benefits, weight loss, reduced hypoglycemia, etc.) (13).

A certain limitation of the study is its retrospective nature. The assessment of hypoglycaemic episodes and their severity is largely influenced by the individual sensitivity of the patient, his or her degree of knowledge of the hypoglycemic symptoms, the ability to recognize these episodes and to differentiate them from other general conditions. The lack of evaluation of symptoms with a corresponding glycemic level (at least by using a glucose meter) raises suspicion regarding the exact incidence of hypoglycaemic episodes.

On the other hand, the above mentioned limitations could also be perceived as an advantage. Patients with type 2 DM rarely use a glucose meter in their daily lives, and a purely subjective assessment of hypoglycaemia is key to recognizing such an episode and taking appropriate measures for management and prevention of further consequences.

Conclusion

Despite well-documented safety issues related to SU therapy such as hypoglycemia and weight gain, there are a large number of patients taking these agents in Bulgaria, either alone or as part of combination therapy. Although the newer generations SUs are showing lower rate of hypoglycaemia episodes, our data confirms that their use is still associated with a significant risk of hypoglycaemia.

Undoubtedly, the incidence and severity of hypoglycaemia in patients treated with SUs is associated with an increased fear of hypoglycaemia.

Clinicians should be mindful of these findings when prescribing SUs and inform patients about the risk of hypoglycemia. Weight-neutral medications with low risk of hypoglycaemia such as incretin-based therapy and SGLT-2 inhibitors represent a valuable therapeutic option that may help patients to achieve and sustain improved glycemic control and thus reduce diabetes-related complications in Bulgaria.

References

1. **Monnier L, Colette C, Owens D.** The glycemic triumvirate and diabetic complications: is the whole greater than the sum of its component parts? *Diabetes Res Clin Pract* 2012; 95:303–311.
2. **Monnier L, Colette C, Dejager S, Owens DR.** Near normal HbA1c with stable glucose homeostasis: the ultimate target/aim of diabetes therapy. *Rev Endocr Metab Disord* 2016; 17:91–101.
3. **Chico A, Subira M, Vidai-Rios P, Novials A.** The Continuous Glucose Monitoring System Is useful for detecting unrecognized hypoglycemia in patients with type 1 and type 2 diabetes but is not better than frequent capillary glucose measurements for improving metabolic control. *Diabetes Care* 2003; 26:1153–1157.
4. **Weber KK, Lohmann T, Busch K, Donati-Hirsch I, Riel R.** High frequency of unrecognized hypoglycaemias in patients with Type 2 diabetes is discovered by continuous glucose monitoring. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2007; 115(8):491-494.
5. **Khattab M, Khader YS, Al-Khawaldeh A, Ajlouni K.** Factors associated with poor glycemic control among patients with type 2 diabetes. *J Diab and Its Compl* 2010, 24, 84–89.
6. **Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al; American Diabetes Association (ADA); European Association for the Study of Diabetes (EASD).** Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach. Position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*, 2012; 35: 1364–1379.
7. **Global Guideline for Type 2 Diabetes - International Diabetes Federation Guideline Development Group.** *Diabetes Res Clin Pract* 2014;104(1):1-52.doi: 10.1016/j.diabres. 2012.10.001
8. **Hajos RS, Polonsky W, Pouwer F, Gonder-Frederick L, Snoek FJ.** Toward defining a cutoff score for elevated fear of hypoglycemia on the hypoglycemia fear survey worry subscale in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2014; 37:102–108.doi: 10.2337/dc13-0971
9. **Chan SP, Ji LN, Nitiyanant W, Baik SH, Sheu WH.** Hypoglycemic symptoms in patients with type 2 diabetes in Asia-Pacific—real-life effectiveness and care patterns of diabetes management: the RECAP-DM study. *Diabetes Res Clin Pract* 2010; 89(2): e30–e32.
10. **Majanovic SK, Janez A, Lefterov I, Tasic S, Cikac T.** The Real-Life Effectiveness and Care Patterns of Diabetes Management Study for Balkan Region (Slovenia, Croatia, Serbia, Bulgaria): A Multicenter, Observational, Cross-Sectional Study. *Diabetes Ther* 2017; 8:929–940. Doi:10.1007/s13300-017-0288-x.
11. **Polonsky W, Fisher L, Hessler D, Edelman S.** Investigating hypoglycemic confidence in type 1 and type 2 diabetes. *Diab Technol and Ther* 2017;19:1, doi: 10.1089/dia.2016.0366.
12. **Wild D, von Maltzahn R, Brohan E, Christensen T, Clauson P, Gouder-Frederick L.** A critical review of the literature on fear of hypoglycemia in diabetes: implications for diabetes management and patient education. *Patient Educ Couns* 2007; 68:10–15.
13. **Davies MJ, D'Alessio DA, Fradkin J, Kernan WN, Mathieu C, Mingrone G, et al.** Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2018. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetologia* 2018; 61(12):2461-2498.doi:10.1007/s00125-018-4729-5.



Доц. д-р
**Владимир
Христов**
1943-2020

Доц. Владимир Христов завършва висшето си медицинско образование през 1969 г. в Медицински факултет на Медицинска Академия, София. Последователно работи като ординатор в Отделение по Вътрешни болести на ОРБ-Шумен (1970-1972), асистент в Клиника по Нефрология, ИСУЛ, София (1973-1976), асистент, ст. асистент, гл. асистент и доцент в Клиника по Ендокринология и метаболитни заболявания на УМБАЛ „Александровска“ в МУ, София (1976-1989) и като завеждащ тази клиника до пенсионирането си (2001-2009).

Като утвърден експерт той е национален консултант по ендокринология и председател на консултативния съвет по диабет към МЗ (2001-2003), консултант на НЗОК, председател на Научния съвет на МУ - София (1992-1998), член на Специализирания съвет по Ендокринология, Гастроентерология, Хематология и Клинична лаборатория към ВАК (1992 до закриването на структурата), член на Национален алианс „Живот за България“. Има над 250 научни статии в български и чуждестранни списания, 7 монографии и е съавтор в 5 учебника. Главен редактор е на сп. „Рп./Диабет и метаболизъм“, Зам. гл. редактор на сп. „Ендокринология“, член на редакционните колегии на сп. „Медицинска практика“, „Андрология“, „Наука Ендокринология“, „International Journal of Men’s Health and Gender“ и „Diabetes management“. Носител е на редица престижни награди – Почетен знак „Български лекар“ за висок професионализъм и лекарска етика (2003), наградата на МУ, София за научна и преподавателска дейност в областта на ВБ „Проф. Константин Чилов“ (2006), Man of the Year“ на Американски биографичен институт (2005) и др.

Доц. Христов бе изключителен лекар с много широка медицинска култура и информираност, за което способстват не само трите му специалности (Вътрешни болести, Нефрология и Ендокринология), владеенето на английски, немски и руски езици, специали-

защите му в Германия, Италия, Дания и САЩ и многото му участия на научни форуми, но и неговият непрекъснат стремеж към четене и знаене на най-новото в медицината, който предаваше и на нас.

Доц Христов си спомняме като увлекателен лектор и преподавател, умеещ да представи най-новото по достъпен и запомнящ се начин. Стремеше се да работи в най-новите области в развитието на медицината. Акцент в научните му интереси бяха социално-значимите незаразни заболявания – диабет, затлъстяване, метаболитен синдром и свързаните с тях ССЗ – особено ИБС, АХ и дислипидемия. Дисертационният му труд през 1982 г. е на тема „Артериална хипертония и захарен диабет“. Той създава института „Метаболитен синдром“ за изследване, профилактика и лечение на заболяването, което е един от най-големите проблеми на съвременното общество. Едва през последните години се заговори много активно и за бъбрека при диабет, а той бидейки и със специалност нефрология от 1976 г., разглеждаше задълбочено този въпрос от 40 години.

Много други аспекти, които днес добиват особена международна актуалност, той разглеждаше години по-рано в научните си публикации.

Като Началник на Клиниката той беше категоричен и безкомпромисен, но едновременно с това справедлив и много балансиран. Трудно ми е да си спомня момент на загуба на контрол, повишаване на тон или грубост. И въпреки това той внушаваше невероятен респект и уважение. Чужди му бяха дребнотемиеето, интригите и клюките. Горд съм, че съм негов ученик. Когато се пенсионира и аз поех щафетата от него, му предложих да остане в клиниката, за да може да предава опита си, защото той имаше още на какво да ни научи. Дори не си позволих да вляза една година в кабинета му.

Под негово ръководство израсна и се оформи една школа, която и днес продължава да развива неговите идеи и съм сигурен, че той беше щастлив и удовлетворен да вижда, че семената, които е посял, дадоха своите плодове. Затова на венеца от Клиниката по Ендокринология написахме „На учителя с признателност и благодарност“. Той инициира участието на Клиниката в проекти на Европейски съюз, в които е координатор за България: Етиология на захарен диабет тип 1 на епидемиологична база (EURODIAB ACE) 1991-1994 г., Превенция на диабет тип 2 в Европа чрез промяна в стила на живот, двигателна активност и диетичен режим (DE-PLAN) 2006-2008 г., Подготовка на специалисти в областта на превенцията на захарен диабет тип 2 (IMAGE), стартирал септември 2007 г.

Но освен тези професионални достижения има и една друга сфера на личността, за която дори повече мислим в момента, когато настъпва физическия край на тленното тяло. Доц. Христов беше един невероятен човек. Той винаги мислеше за всеки един от нас и имаше време да ни изслуша, при него винаги можеше да отидеш с проблема си и да разчиташ, че ще бъде решен. Той можеше да работи много, но и беше обърнат към живота и умееше му се наслаждава. На празненствата на Клиниката създаваше условия всеки да релаксира и се чувства приятно. Имаше много широка обща култура и ерудиция и беше истинско удоволствие да се общува с него.

Отиде си един голям лекар, учител и добър човек. Името му ще остане в светлите страници на българската медицина и в нашите души и сърца с признателност и благодарност.

Поклон пред паметта му!

Проф. Здравко Каменов, гм, дмн от името на Редколегията

Българско дружество по ендокринология *Bulgarian Society of Endocrinology*

Списание
ЕНДОКРИНОЛОГИЯ ISSN 1310-8131

Journal
ENDOCRINOLOGIA ISSN 1310-8131

Адрес на редакционната колегия:

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

Editorial Board address for correspondence:

Clinical Center of Endocrinology
„Acad. Iv. Penchev“, University Hospital 2,
Zdrave Str., 1431 Sofia, Bulgaria;
Prof. Maria Orbetzova, *Editor in Chief*
Tel (+359) 32602486;
Mobile (+359) 887771322,
E-mail: morbetzova@abv.bg

Списание „Ендокринология“, издание на Българското дружество по ендокринология, излиза в 4 книжки годишно. В него се отпечатват оригинални научни статии, описания на клинични случаи, обзори, рецензии, информация за проведени и предстоящи научни събития и други материали в сферата на клиничната ендокринология. Обзорните материали от български автори излизат на български език с резюме на български и английски език. Оригиналните 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 се предоставя с превод на английски език (с изключение на обзорите) на e-mail на главния редактор с придружително писмо на адреса на редакцията, подписано от авторите, с което потвърждават съгласието си за участие и декларират, че материалът не е отпечатван в други научни списания, освен като резюме на съобщение, изнесено на научен форум.

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

Структурата на статиите трябва да отговаря на следните изисквания:

Титулна страница

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

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

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

Резюме

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

Основен текст

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

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

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

Title page

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

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

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

Abstract

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

Main text

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

Tables and figures

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

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

Таблицы и илюстрации

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

Книгопис

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

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

References

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

Examples

Reference to a journal article:

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

If the original cited paper is in Bulgarian:

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

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

Примери:

Статия от списание:

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

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

Глава (раздел) от книга:

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

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

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

References to a book chapter:

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

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

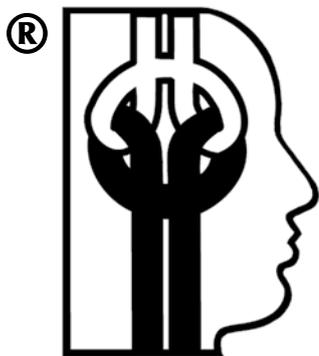
Address for sending the manuscripts and other editorial correspondence

Editorial Board Address for Correspondence:

Clinical Center of Endocrinology,
„Acad. Iv. Penchev“, University Hospital, 2
Zdrave Str., 1431 Sofia, Bulgaria;
Prof. Maria Orbetzova, Editor in Chief
Tel (+359) 32 60 24 86;
Mobile (+359) 887771322
E-mail: morbetzova@abv.bg

Адрес на редакционната колегия:

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



ЕНДОКРИНОЛОГИЯ

ENDOCRINOLOGIA

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

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

Главен редактор

Проф. 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
(2001-2017)
- EMBASE
- Bulgarian Citation Index
(since 1996)
- EBSCO
(since 2019)